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

GRAZIELE APARECIDA CHIUCHI GARCIA

Efeito do uso de enzimas proteolíticas na maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura

São José do Rio Preto

2007

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

GRAZIELE APARECIDA CHIUCHI GARCIA

Efeito do uso de enzimas proteolíticas na maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura

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

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto

2007

Garcia, Graziele Aparecida Chiuchi.
Efeito do uso de enzimas proteolíticas na maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura./ Graziele Aparecida Chiuchi Garcia. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2007.
154 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Queijo. 2. Queijo prato – Análise. 3. Baixa caloria (Alimentos) 4. Proteólise. 5. Fastuosaína. 6. Queijo - Inovações tecnológicas. 7. Queijo – Teor de gordura. I. Penna, Ana Lúcia Barretto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 637.33

GRAZIELE APARECIDA CHIUCHI GARCIA

Efeito do uso de enzimas proteolíticas na maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura

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

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna
Universidade Estadual Paulista

_____

Profa. Dra. Ariene G. F. Van Dender
Instituto de Tecnologia de Alimentos

_____

Profa. Dra. Elisa Helena Giglio Ponsano
Universidade Estadual Paulista

S. J. Rio Preto, 26 de Fevereiro de 2007.

Dedico ....

Aos meus pais, Valdecir e Antonio, à minha irmã Ana Carolina e ao Alex pelo incentivo e compreensão durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna pela oportunidade e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Hamilton Cabral pelos diversos auxílios e amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e Prof. Mauricio Boscolo pelo auxílio nas análises microbiológicas, de microestrutura e cromatográficas, respectivamente.

À Profa. Dra. Elisa Helena Giglio Ponsano pela colaboração nas análises de cor e textura e pelas sugestões durante o exame de qualificação e para a redação final da dissertação.

À Profa. Dra. Ariene G. F. Van Dender pelas sugestões para a redação final da dissertação.

Ao Prof. Roberto da Silva pelas sugestões feitas durante o exame de qualificação.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação pela amizade e ensinamentos.

Aos técnicos dos laboratórios do DETA: Ginaldo, José Jesuíno, Luiz, Newton e Tânia, e ao Luiz Roberto, do Centro de Microscopia Eletrônica, pelos diversos auxílios.

Às amigas Aline, Ana Cristina, Bruna, Carolina, Ellen, Raquel, Silvia e Thais pelo companheirismo e amizade em todos os momentos.

Ao Laticínio Salute pelo fornecimento do leite utilizado na fabricação dos queijos.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família e ao Alex pela paciência e incentivo para realização deste trabalho.

E principalmente a Deus por me dar força para buscar e alcançar meus objetivos.

RESUMO

O queijo Prato é fabricado por coagulação enzimática, adicionado de corante e complementado ou não pela ação de bactérias láticas específicas, podendo ser classificado como gordo e de média umidade. Atualmente, a procura por produtos lácteos com baixo teor de gordura vem aumentando, pois o consumo de gordura de origem animal apresenta relação com doenças coronárias e carcinogênicas. Além disso, para indivíduos que buscam a manutenção ou perda de peso corporal, o consumo de gordura deve ser restrito. Por outro lado, queijos com teor reduzido de gordura apresentam defeitos nas características sensoriais, no rendimento e na maturação, quando comparados aos queijos com teor integral. Para minimizar as alterações decorrentes da retirada da gordura, é necessário utilizar uma tecnologia que não altere a qualidade do produto final. Neste contexto, no presente trabalho estudou-se o uso da enzima proteolítica, fastuosaína, extraída do fruto verde do gravatá (*Bromelia fastuosa*) na maturação do queijo Prato com teor reduzido de gordura. Foram realizados 4 processamentos: um pelo método tradicional - sem adição de enzima fastuosaína (Processamento A, controle) e três pelo método modificado, nos quais se utilizaram diferentes concentrações de fastuosaína com diferentes atividades enzimáticas. O leite utilizado na fabricação dos queijos foi submetido a análises de densidade, gordura, extrato seco total, acidez, presença de antibiótico, *Salmonella*, contagem padrão em placas, coliformes totais e fecais, e os queijos foram submetidos a análises microbiológicas de bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras, *Escherichia coli*, coliformes totais e fecais, Estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Durante a maturação os queijos foram submetidos a análises de: extrato seco total, acidez, gordura, gordura no extrato seco, cinzas, nitrogênio e proteína total, nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6, (NS) em TCA 12%, tirosina, triptofano, sal, atividade de água, índices de extensão e profundidade da maturação, capacidade de derretimento, eletroforese, população de bactérias láticas, parâmetros de cor, perfil de textura, avaliação sensorial e microestrutura. As amostras dos queijos atenderam os padrões microbiológicos para alimentos, e ainda puderam ser classificados como de média umidade e "light". A adição de enzima promoveu, desde o primeiro dia, aceleração da maturação, sendo que nas amostras dos queijos modificados B e C, o tempo de maturação pôde ser reduzido em 15 dias. O uso de enzimas com baixa atividade enzimática (processamento B), resultou em maior proteólise e na melhoria das características físico-

químicas, sensoriais e de textura dos queijos. Os resultados apontam o uso da enzima proteolítica fastuosaína como uma interessante alternativa para melhoria da qualidade dos queijos Prato com teor reduzido de gordura.

Palavras chave: queijo Prato, alimentos de baixas calorias, proteólise, fastuosaína, desenvolvimento tecnológico.

ABSTRACT

Prato cheese is manufactured by enzymatic coagulation, with addition of colorings and complemented or not by the action of specific lactic bacteria, and it can be classified as semi-hard and fatty cheese. Currently, the demand for dairy products with low-fat content is increasing, therefore the consumption of animal fat is related to coronary and carcinogenic diseases. Moreover, for individuals that search for the maintenance or the loss of body weight, the intake of fat must be restricted. On the other hand, cheeses with reduced fat content present defects in sensory characteristics, both in the yield of low-fat cheese and in its ripening, when compared with full-fat product. To minimize the alterations due to the removal of fat, it is necessary to use a technology that does not modify the final quality of the product. In this context, in this work the addition of the proteolytic enzyme, fastuosain, extracted of the green fruit of gravatá (*Bromelia fastuosa*) on the ripening of the low fat Prato cheese was studied. Four batches of cheese were carried out. One of them was not modified - without addition of fastuosain enzyme (Process A, control) and three batches were added with different concentrations of fastuosain with different enzymatic activities. The milk used in the manufacture of the cheeses was submitted to the analyses of density, fat, total dry matter, acidity, presence of antibiotic, total and fecal coliforms, *Salmonella*, counting standard in plates and the cheeses were submitted to microbiological analyses of aerobic mesophilic bacteria, total and fecal coliforms, yeasts and molds, *Escherichia coli*, coagulase positive staphylococci, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. During the ripening the cheeses were submitted to the analyses of: total dry matter, acidity, fat, fat in the dry matter, ashes, nitrogen and total protein, soluble nitrogen (NS) in pH 4.6, (NS) TCA 12%, tyrosin, tryptophan, salt, water activity, ripening extension index and ripening depth index, melting capacity, electrophoresis, population of lactic acid bacteria, parameters of color, profile of texture, sensory evaluation and microstructure. The samples of cheeses attended the microbiological standards for foods, and the cheeses could be classified as of medium moisture and light. The enzyme addition promoted, since the first day, acceleration of cheese ripening. In samples of modified cheeses B and C, the time of ripening could be reduced in 15 days. The addition of enzyme with lower enzymatic activity (process B), resulted in greater proteolysis and improvement of the physico-chemical, sensory and texture characteristics of the cheeses. The

results have show that the addition of the proteolytic enzyme, fastuosain, as an interesting alternative to improve the quality of low-fat Prato cheeses.

Key-words: Prato cheese, low-calorie foods, proteolysis, fastuosain, technological development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Texturômetro TA-XT2 Stable Micro System 41

Figura 2 - Gráfico das medidas dos parâmetros de textura..... 42

Figura 3 - Cacho de *Bromelia fastuosa* (gravatá)..... 51

Figura 4 - Fluxograma dos processos de fabricação dos queijos Prato tradicionais e modificados. 58

Figura 5 - Ilustração do processo de fabricação dos queijos Prato..... 59

Figura 6 - Fluxograma operacional do processo de preparo das amostras para seleção dos provadores. 64

Figura 7 - Ficha de teste triangular. 65

Figura 8 - Ficha de avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana. 66

Figura 9 - lustração da análise morfo-estereológica. **.....** 68

Figura 10 - População de microrganismos nas amostras de queijos a 25ºC. 74

Figura 11 - População de microrganismos nas amostras de queijos a 37ºC. 75

Figura 12 - População de microrganismos nas amostras de queijo do processamento A. 76

Figura 13 - População de microrganismos nas amostras de queijo do processamento B. 76

Figura 14 - População de microrganismos nas amostras de queijo do processamento C. 77

Figura 15 - População de microrganismos nas amostras de queijo do processamento D. 77

Figura 16 - Capacidade de derretimento de amostras de queijo Prato com teor reduzido de gordura. 104

Figura 17 - Avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana, das amostras dos queijos tradicionais (Processamento A) aos 30 e 60 dias de maturação. 112

Figura 18 - Avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana, das amostras dos queijos modificados (Processamento B) aos 30 e 60 dias de maturação. 112

Figura 19 - Avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana, das amostras dos queijos modificados (Processamento C) aos 30 e 60 dias de maturação..... 113

Figura 20 - Avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana, das amostras dos queijos modificados (Processamento D) aos 30 e 60 dias de maturação..... 113

Figura 21 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato tradicional (A) aos 8 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O)..... 118

Figura 22 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato tradicional (A) aos 30 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 119

Figura 23 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato tradicional (A) aos 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 120

Figura 24 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato tradicional (A) aos 8, 30 e 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O)..... 121

Figura 25 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (B) aos 8 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 122

Figura 26 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (B) aos 30 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 123

Figura 27 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (B) aos 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 124

Figura 28 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (B) aos 8, 30 e 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O)..... 125

Figura 29 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (C) aos 8 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 126

Figura 30 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (C) aos 30 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 127

Figura 31 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (C) aos 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 128

Figura 32 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (C) aos 8, 30 e 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 129

Figura 33 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (D) aos 8 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 130

Figura 34 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (D) aos 30 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 131

Figura 35 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (D) aos 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 132

Figura 36 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (D) aos 8, 30 e 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O). 133

Figura 37 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras dos queijos Prato tradicional e modificados aos 8 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O)..... 134

Figura 38 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras dos queijos Prato tradicional e modificados aos 30 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O)..... 135

Figura 39 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras dos queijos Prato tradicional e modificados aos 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O)..... 136

Figura 40 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Urea – PAGE) dos queijos Prato tradicionais (A) e modificados (B, C e D) durante o período de maturação. L – Leite, 1; 15; 30; 45 e 60: Dias de maturação..... 139

Figura 41 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Urea – PAGE) dos queijos Prato tradicionais (A) e modificados (B, C e D) em cada período de maturação.... 140

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Requisitos microbiológicos de queijos de média umidade 27
Quadro 2 - Padrões de identidade e qualidade do leite pasteurizado tipo A 29
Quadro 3 - Definições físicas das características de textura 41
Quadro 4 - Ensaio enzimático e soluções utilizadas 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análises das amostras de leite padronizado, tipo A, utilizadas na fabricação dos queijos. 70

Tabela 2 - Análises microbiológicas das amostras de leite pasteurizado tipo A integral e desnatado..... 71

Tabela 3 - População de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* da cultura lática (antes da fabricação dos queijos) e nas amostras de queijo (durante o período de maturação), com incubações a 25ºC por 48 horas em aerobiose..... 73

Tabela 4 - População de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* da cultura lática (antes da fabricação dos queijos) e nas amostras de queijo (durante o período de maturação), com incubações a 37ºC por 48 horas em aerobiose..... 75

Tabela 5 - Resultados das análises microbiológicas dos queijos Prato tradicionais e modificados, no 1º dia de maturação..... 79

Tabela 6 - Caracterização físico–química das amostras dos queijos tradicionais (Processamento A – sem adição de enzima) durante a maturação..... 81

Tabela 7 - Caracterização físico–química das amostras dos queijos modificados (Processamento B – adição de enzima com atividade total de 607.500 U.) durante a maturação..... 82

Tabela 8 - Caracterização físico–química das amostras dos queijos modificados (Processamento C – adição de enzima com atividade total de 1.395.000 U.) durante a maturação. 83

Tabela 9 - Caracterização físico–química das amostras dos queijos modificados (Processamentos D – adição de enzima com atividade total de 1.822.500 U.) durante a maturação. 84

Tabela 10 - Comparação entre as características físico–químicas das amostras dos queijos dos diferentes processamentos. 85

Tabela 11 - Comparação entre as características físico–químicas das amostras dos queijos dos diferentes processamentos (continuação)..... 86

Tabela 12 - Comparação entre as características físico–químicas das amostras dos queijos dos diferentes processamentos (continuação). 87

Tabela 13 - Comparação entre as características físico–químicas das amostras dos queijos dos diferentes processamentos (continuação). 88

Tabela 14 - Caracterização dos parâmetros de cor das amostras dos queijos tradicionais e modificados aos 30 e 60 dias de maturação. 101

Tabela 15 - Caracterização do perfil de textura das amostras dos queijos tradicionais e modificados aos 30 e 60 dias de maturação. 103

Tabela 16 - Análise da capacidade de derretimento das amostras dos queijos tradicionais e modificados durante o período de maturação. 106

Tabela 17 - Comparação entre a capacidade de derretimento (%) das amostras dos queijos dos diferentes processamentos. 107

Tabela 18 - Número de respostas corretas no teste triangular (primeira seleção)..... 109

Tabela 19 - Número de respostas corretas no teste triangular (segunda seleção)..... 109

Tabela 20 - Avaliação sensorial das amostras dos queijos tradicionais e modificados aos 30 e 60 dias de maturação. 113

Tabela 21 - Análise quantitativa estereológica das proporções relativas (%) de proteína, gordura, cultura lática e outros componentes não identificados, aos 8, 30 e 60 dias de maturação. 115

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIAÇÕES

%	por cento
α	alfa
α_{s1}	alfa–s1-1
α_{s2}	alfa–s2
α_{s1}-CN f 24-199	alfa–s1-caseína fração 24-199
β	beta
β-CN f 29-209	beta-caseína fração 29-129
β-CN f 108-209	beta-caseína fração 108-209
γ_1	gama 1
γ_3	gama 3
κ	kapa
µl	microlitro
ηm	nanômetro
ºC	graus Celsius
A	área
a*	proporção das cores vermelha ou verde
Abs	absorbância
a_w	atividade de água
b*	proporção das cores amarela ou azul
$C_6H_{12}O_6$	glicose
Ca^{+2}	íon cálcio
CD	capacidade de derretimento
C/G	caseína/gordura
CL	cultura lática
cm	centímetro
cm^3	centímetro cúbico
CN	caseína
CO_2	dióxido de carbono
CPP	contagem padrão em placas

D	desnatado
DETA	Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos
Df	diâmetro final
Di	diâmetro inicial
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EST	extrato seco total
F	força
g	grama
g_f	grama-força
G	gordura
GES	gordura no extrato seco
GG	glóbulo de gordura
h	hora
H^+	íon hidrogênio
H_2	gás hidrogênio
H_2O	água
I	integral
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IEM	índice de extensão da maturação
IPM	índice de profundidade de maturação
KDalton	kilo Dalton
L	litro
L (análise de cor)	luminosidade
LDL	low density lipoprotein
Leu 192	leucina na posição 192
Met 106	metionina na posição 106
m^2	metro quadrado
mg	miligramas
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
mm/s	milímetros por segundo
MP	matriz protéica

nº	número
Na^+	íon sódio
NaCl	cloreto de sódio
$NaH_2PO_4.H_2O$	diidrogenofosfato de sódio monohidratado
NaOH	hidróxido de sódio
NMP	número mais provável
NNC	nitrogênio não caséico
NNP	nitrogênio não protéico
NO_2	dióxido de nitrogênio
NSLAB	non starter lactic acid bacteria
NS pH 4,6	nitrogênio solúvel em pH 4,6
NT	nitrogênio total
NS TCA	nitrogênio solúvel em TCA 12%
O	outros
OsO_4	tetróxido de ósmio
PAGE	gel poliacrilamida
pH	potencial hidrogeniônico
Phe105	fenilalanina na posição 105
rpm	rotações por minuto
S/U	sal/umidade
t	tempo
TCA	ácido tricloroacético
TEM	microscopia eletrônica de transmissão
ton	toneladas
TRIS	tris-hidroximetil aminometano
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
Tyr 193	tirosina na posição 193
U.	unidade de atividade
UFC	unidades formadoras de colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UR	umidade relativa
V	volts

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO 22
2 - OBJETIVOS 24
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 25
3.1 - Queijo 25
3.2 - Valor nutritivo do queijo 25
3.3 - O queijo Prato 26
3.4 - Processamento do queijo Prato 28
3.4.1 - Leite 28
3.4.2 - Coagulação 29
3.4.2.1 - Coadjuvantes para fabricação 30
3.4.2.1.1 - Culturas láticas 30
3.4.2.1.2 - Cloreto de cálcio 30
3.4.2.1.3 - Corante 31
3.4.2.1.4 – Coagulante 31
3.4.3 - Tratamento da massa 32
3.4.3.1 - Corte da massa 32
3.4.3.2 - Primeira mexedura 33
3.4.3.3 - Pré-cozimento 33
3.4.3.4 - Segunda mexedura 34
3.4.3.5 - Pré-prensagem 34
3.4.3.6 - Corte, enformagem e prensagem final 34
3.4.4 - Salga 35
3.4.5 - Embalagem 35
3.4.6 - Maturação 36
3.4.6.1 - Proteólise 36
3.4.6.2 - Glicólise 37
3.4.6.3 - Lipólise 38
3.5 - Aceleração da maturação 38
3.6 - Queijos com teor reduzido de gordura 39
3.6.1 - Características gerais 39

3.6.2 - Características de textura e sensorial 40
3.6.2.1 - Perfil de textura 40
3.6.2.2 - Avaliação sensorial 43
3.6.3 - Capacidade de derretimento 45
3.7 - Alternativas no processo tecnológico para melhoria das características do queijo com teor reduzido de gordura 46
3.7.1 - Uso de enzimas exógenas em queijos como estratégia de economia e qualidade..... 47
3.7.1.1 - Enzima fastuosaína 50
4 - MATERIAL E MÉTODOS 52
4.1 - Leite pasteurizado tipo A 52
4.2 - Preparo da cultura e contagem de microrganismos 53
4.3 - Enzimas proteolíticas do fruto verde de *Bromelia fastuosa* 53
4.3.1 - Obtenção do extrato bruto 53
4.3.2 - Concentração e estocagem das enzimas 54
4.3.3 - Ensaio enzimático 54
4.4 - Preparo dos queijos 55
4.5 - Análises microbiológicas 60
4.6 - Caracterização físico-química dos queijos tradicionais e modificados 60
4.7 - Caracterização dos parâmetros de cor 62
4.8 - Caracterização do perfil de textura dos queijos experimentais 62
4.9 - Capacidade de derretimento 62
4.10 - Avaliação sensorial 63
4.10.1 - Preparo da amostra e aplicação do teste 63
4.10.2 - Seleção do painel de provadores 64
4.10.3 - Treinamentos dos provadores 65
4.10.4 - Avaliação sensorial dos queijos Prato tradicionais e modificados 65
4.11 - Caracterização da microestrutura em microscópio eletrônico de transmissão – TEM 67
4.11.1 - Análise quantitativa estereológica 67
4.12 - Caracterização do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Urea – PAGE) 68
4.13 - Análise estatística dos resultados experimentais 69

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 70
5.1 - Caracterização das amostras de leite utilizadas para a fabricação dos queijos tradicionais e modificados 70
5.2 - Contagem de microrganismos 73
5.3 - Análises microbiológicas 78
5.4 -. Resultados da caracterização físico-química dos queijos tradicionais e modificados..... 80
5.5 -. Resultados da caracterização dos parâmetros de cor 100
5.6 - Resultados da caracterização do perfil de textura 102
5.7 - Resultados da capacidade de derretimento 104
5.8 - Resultados da avaliação sensorial 108
5.8.1 - Resultados da seleção do painel e treinamento dos provadores 108
5.8.2 - Resultados da avaliação sensorial dos queijos Prato tradicionais e modificados ... 110
5.9 - Caracterização da microestrutura por microscopia eletrônica de transmissão 114
5.10 - Resultados da caracterização do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Urea - PAGE) 137
6 - CONCLUSÕES 142
REFERÊNCIAS..... 143

1 – INTRODUÇÃO

O queijo Prato é o segundo tipo de queijo mais consumido no Brasil, com uma produção média anual de 70.000 toneladas (NARIMATSU et al., 2003). Do total de queijos produzido no Brasil em 2000, 375,1 ton, cerca de 23,5%, ou seja, 88,5 ton referem-se ao queijo Prato e suas variedades (Lanche, Estepe, Bola, Cobocó) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS, 2004).

O queijo Prato é classificado como queijo gordo, por apresentar de 26 a 29% de gordura. Porém, nas últimas décadas, a procura por produtos lácteos com baixo teor de gordura vem aumentando. Isto pode ser explicado pelo fato da gordura de origem animal apresentar relação com doenças coronárias e carcinogênicas (BERNER, 1993), pois um queijo com elevado grau de gorduras saturadas, aumenta os níveis de colesterol do sangue. Além disso, a crescente preocupação com a saúde tem levado pessoas a buscar alimentos com baixos teores de gordura, visando manter ou perder seu peso corporal.

A gordura participa de múltiplas funções no queijo. Uma redução no teor de gordura promoveria mudanças na textura quando comparado ao queijo tradicional e, conseqüentemente o produto se tornaria pouco atraente ao consumidor (KATSUDA et al., 1999).

As proteínas e o cálcio presentes no queijo ajudam no desenvolvimento físico e auxiliam no combate às cáries dentárias, uma vez que impedem a formação de ácidos que atacam e danificam o esmalte dos dentes. Além disso, o cálcio reduz o risco de osteoporose, pois é facilmente absorvido pelo organismo.

Estudos com queijo tipo Prato com teor reduzido de gordura mostraram que uma redução de 50% da gordura da matéria-prima resultou em uma redução aproximada de 30% em calorias e não se houve diferença significativa nas características de firmeza, elasticidade, coesividade e adesividade aos 45 dias de maturação dos queijos (KATSUDA et al., 1999).

A maturação do queijo Prato deve ser de no mínimo 25 dias para a ocorrência de reações bioquímicas que resultam no desenvolvimento do sabor, aroma e textura desejáveis dos queijos. A possibilidade de intensificar a maturação por meio do uso de enzimas exógenas (que não a renina), por ser o método mais direto, tem atraído atenção

considerável nos últimos 20 anos. Este método tem sido usado com sucesso para acelerar a maturação de queijos integrais (WILKINSON, 1993), mas também tem sido aplicado para o desenvolvimento de sabor em queijos com baixos teores de gordura (ARDÖ; MANSSON, 1990). Proteases e lipases são adicionadas para aumentar a taxa de proteólise ou lipólise, respectivamente no queijo (LAW, 1978). Peptidases também são adicionadas na tentativa de aumentar a concentração de aminoácidos livres bem como a proteólise total (SILVA, 1998).

Em estudos com queijo Prato adicionado de enzimas proteolíticas extraídos do fruto verde do gravatá, Leite; Pitarello; Penna (2003) observaram que os queijos em que se adicionaram enzimas apresentaram aos 15 dias de maturação, índices de proteólise superiores aos encontrados nos queijos sem adição de enzimas, aos 45 dias.

Frente a importância econômica e nutricional dos produtos lácteos, particularmente do queijo Prato, e a preocupação com a saúde, torna-se necessário o estudo para desenvolver tecnologias de fabricação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. Todavia é importante a garantia da qualidade e segurança do produto, além do desenvolvimento de um produto competitivo, inovador e saudável. Considerando que são poucos os trabalhos disponíveis na literatura sobre o uso de enzimas para melhorar características funcionais do queijo Prato, estudos neste sentido são uma importante contribuição ao setor de tecnologia de produtos lácteos nacional.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

- Estudar a aplicação da enzima proteolítica fastuosaína visando melhoria da qualidade do queijo Prato com teor reduzido de gordura.

2.2 – Objetivos Específicos

- Estudar o comportamento microbiológico da cultura lática durante a maturação;
- Avaliar a qualidade microbiológica e a classificação das amostras de queijo Prato com teor reduzido de gordura;
- Analisar os parâmetros físico-químicos e sensoriais, o perfil de cor e de textura, e a capacidade de derretimento do queijo Prato com teor reduzido de gordura;
- Caracterizar a microestrutura e o perfil eletroforético dos queijos elaborados conforme os diferentes processamentos.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Queijo

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

De acordo com a legislação o queijo Prato é classificado como gordo, devendo apresentar de 45,0 a 59,9% de matéria gorda no extrato seco, e de média umidade, devendo apresentar umidade variando de 36 a 46% (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997).

3.2 - Valor nutritivo do queijo

Os queijos são ricos em proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas A e D e minerais (cálcio, fósforo, magnésio). Queijos maturados contêm baixa quantidade de lactose. Desta forma, estudos demonstraram que os indivíduos que não digerem a lactose podem ingerir queijos, sem desenvolver os sintomas de intolerância (SUAREZ; ADSHEAD; FURNE, 1998; PRIBILA; HERTZLER; MARTIN, 2000).

Os queijos podem estimular o fluxo salivar que apresenta propriedades de redução de cáries e desmineralização e/ou promover a remineralização dos dentes através de cálcio e fósforo (KASHKET; DEPAOLA, 2002).

Sendo o queijo rico em cálcio, seu consumo pode minimizar a perda óssea relacionada com a idade, reduzindo os riscos de osteoporose. Também pode reduzir riscos de hipertensão e doenças cardíacas por reduzir o colesterol total e o colesterol

LDL do sangue, bem como dos níveis sangüíneos de homocisteína, um aminoácido ligado ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (OBARZANEK; SACKS; VOLLMER, 2001; APPEL; MILLER; JEE, 2000).

Sendo um produto de origem animal, os queijos contêm colesterol, e desta forma, nutricionistas recomendam os queijos brancos, que apresentam menor teor de gordura. A tendência industrial é o desenvolvimento de queijos com teor reduzido de gordura, mas com sabor e textura semelhantes aos dos queijos tradicionais.

3.3 - O queijo Prato

O queijo Prato foi introduzido na década de 20, na região sul de Minas Gerais, por imigrantes dinamarqueses. É originário dos queijos Dambo dinamarquês e Gouda holandês. No Brasil, a tecnologia de fabricação do queijo Prato foi adaptada às condições locais, o que explica as diferenças de textura e sabor em relação aos queijos que lhe deram origem.

Este queijo é fabricado por coagulação enzimática, adicionado de uma pequena quantidade de corante. É de massa semi-cozida, o que dá ao queijo uma característica mais elástica e, em função da maturação ser mais prolongada e de diferente especificidade, apresenta-se com um sabor menos ácido e cremoso. Tipicamente apresenta entre 42-44% de umidade, 1,6-1,9% de sal, pH de 5,2 a 5,4 e 26-29% de gordura (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). Os produtos apresentam características diferentes quanto ao formato e tamanho relacionadas ao tratamento do leite e condições de maturação. A variedade lanche é a que praticamente domina o mercado, apresentando-se em vários tamanhos, moldado na forma de tijolo ou paralelepípedo, pesando entre 0,5 e 3,0 kg. No caso do queijo Estepe há um desenvolvimento de bactérias do grupo propiônico que promovem o aparecimento de olhaduras. A variedade Cobocó apresenta-se na forma de um cilindro baixo (OLIVEIRA, 1986).

De acordo com a Portaria nº 358, de 4 de Setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), o queijo Prato é um queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas

coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias láticas específicas. É classificado como gordo e de média umidade.

Ainda de acordo com a legislação, o queijo Prato deve apresentar as seguintes características:

- Consistência: semidura, elástica.
- Textura: compacta, lisa, fechada com alguns olhos pequenos arredondados e/ou algumas olhaduras mecânicas.
- Cor: amarelo ou amarelo-palha.
- Sabor: característico.
- Odor: característico.
- Crosta: não possuir, ou com crosta fina, lisa, sem trincas.
- Olhaduras: algumas olhaduras pequenas, bem distribuídas, ou sem olhaduras.

O queijo Prato apresenta características próprias, as quais são adquiridas por meio do processo de maturação. Nesta etapa do processamento, realizada em condições de temperatura e umidade controladas, 12ºC e 70-85% UR (umidade relativa), ocorrem reações bioquímicas que provocam alterações de sabor, odor, textura e consistência (SILVA, 1998).

Os parâmetros de textura de um queijo maturado estão relacionados principalmente com a degradação das proteínas e influenciados por outros fatores, tais como: umidade, relação umidade/caseína, sal e atividade proteolítica e peptidolítica das culturas láticas (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

Em relação aos padrões microbiológicos, o queijo Prato, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) deve atender aos requisitos de queijos com média umidade (36%), de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1 - Requisitos microbiológicos de queijos de média umidade.

Microrganismos	**Tolerância para amostra indicativa**
Coliformes a 45ºC	10^3 UFC/g
Estafilococos coagulase positiva	10^3 UFC/g
Salmonela sp	Ausência/25g
Listeria monocytogenes	Ausência/25g

3.4 - Processamento do queijo Prato

3.4.1 - Leite

Para fabricação do queijo Prato o leite deve obedecer às exigências de qualidade e conservação para o leite pasteurizado, e tanto quanto possível ser livre de contaminação bacteriana ou por agentes químicos como antibióticos, herbicidas e pesticidas.

Microrganismos produtores de gás, como coliformes e esporulados do gênero *Clostridium*, podem causar problemas de estufamento de queijos (OLIVEIRA, 1986). Os antibióticos quando administrados ao gado podem passar ao leite, podendo inibir a sua coagulação ou alterar o tempo de maturação do queijo devido às alterações na microbiota lática (PERRY, 2004), as quais são responsáveis pelo desenvolvimento da acidez, aroma e sabor dos queijos.

A composição do leite exerce grande influência nas características do queijo. A gordura tem um papel importante na cor, na consistência e no sabor final do queijo (OLIVEIRA, 1986).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002), os padrões de identidade e qualidade para o leite pasteurizado tipo A estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Padrões de identidade e qualidade do leite pasteurizado tipo A.

Padrões	Integral	Semidesnatado	Desnatado
Gordura (g/100g)	Teor original	0,6 a 2,9	Máximo 0,5
Acidez (g ácido lático/100 ml)	0,14 a 0,18		
Sólidos não gordurosos (g/100g)	Mínimo 8,4*	*	
Contagem padrão em placas (UFC/ml)	n = 5; c = 2; m = 5,0 x 10^2; M = 1,0 x 10^3		
Coliformes – NMP/ml (30/35ºC)	n = 5; c = 0; m < 1		
Coliformes – NMP/ml (45ºC)	n = 5; c = 0; m = ausência		
Salmonella ssp/25 ml**	n = 5; c = 0; m = ausência		

Onde: n = número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente; c = número máximo aceitável de unidade de amostras com contagem entre os limites de m e M. * Teor mínimo de SNG, com base no leite integral. Para os demais teores de gordura, esse valor deve ser corrigido pela seguinte fórmula: SNG = 8,652 - (0,084 x G), onde SNG = Sólidos Não-Gordurosos, g/100g; G = Gordura, g/100g. ** Padrões microbiológicos a serem observados até a saída do estabelecimento industrial produtor.

Imediatamente após a pasteurização, o leite pasteurizado deve apresentar número mais provável (NMP) de coliformes a 30/35ºC menor do que 0,3 por ml da amostra.

Deve ser evitado tratamento térmico em temperaturas acima das mínimas exigidas para a pasteurização (72ºC por 15 segundos), pois tratamentos térmicos severos podem tornar o coágulo muito frágil, a ponto de impedir a coagulação enzimática. As características do coágulo não são prejudicadas desde que sejam evitadas temperaturas acima de 74ºC por tempos maiores que 20 segundos (OLIVEIRA, 1986).

3.4.2 – Coagulação

A coagulação do leite se deve basicamente à caseína, a qual perde a sua estabilidade em função de agentes físicos e/ou químicos, como a acidificação e a ação de enzimas proteolíticas (OLIVEIRA, 1986).

As micelas de caseína são constituídas de quatro frações protéicas principais, que são α_{s1}-caseína, α_{s2}-caseína, β-caseína e κ-caseína. A κ-caseína, embora represente somente 10 a 20% da caseína, exerce um importante papel protetor sobre as partículas

coloidais, evitando que se coagulem ou se precipitem em presença de cálcio solúvel. Na coagulação enzimática, a qual ocorre no queijo Prato, uma enzima proteolítica age sobre a fração κ-caseína destruindo sua capacidade protetora e as partículas coloidais se tornam instáveis em presença de íons de cálcio. O leite transforma-se em um gel, ou seja, coagula (OLIVEIRA, 1986).

3.4.2.1 – Coadjuvantes para fabricação

Após a pasteurização, o leite é resfriado a uma temperatura entre 32 e 35ºC e recebe os demais ingredientes, tais como: cultura lática, cloreto de cálcio, corante e coagulante.

3.4.2.1.1 - Culturas láticas

As culturas láticas têm a função de converter a lactose em ácido lático, o qual reduz o pH do sistema, auxilia na eliminação do soro durante o processo de fabricação e início da maturação, inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis e ajuda na ação do coalho na coagulação da massa (SCOTT, 1986).

A cultura lática utilizada para fabricação do queijo Prato é composta por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e/ou *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, sendo comercializada na forma liofilizada na qual um envelope de 50U pode ser utilizado para 500 L de leite.

3.4.2.1.2 - Cloreto de cálcio

No processo de coagulação do leite é importante a presença de cálcio solúvel, sob a forma ionizada (com duas cargas positivas), com a finalidade de suprir uma

possível deficiência deste, causada pelo processo de pasteurização do leite (FURTADO; WOLFSCHOON-POMBO, 1979).

A adição de cerca de 20 gramas de cloreto de cálcio para cada 100 litros de leite na forma de solução aquosa a 50%, pasteurizada e resfriada, permite uma redução no tempo de coagulação e aumento na firmeza da coalhada. O cálcio reage com os fosfatos do leite, transformando-se em fosfato tricálcico, liberando prótons H^+, e abaixando o pH do leite, há um aumento no teor de cálcio ionizado, de cálcio coloidal e da caseína micelar, o que provoca o crescimento da micela, a qual se torna mais estável, facilitando a coagulação do leite. Além disso, a adição de cloreto de cálcio melhora a capacidade de expulsão do soro da coalhada e aumenta o teor final de cálcio no queijo (FURTADO, 1991).

3.4.2.1.3 - Corante

A cor do queijo está relacionada à gordura do leite, estando sujeita a variações sazonais que são corrigidas pela adição de corantes (PERRY, 2004). A coloração amarela característica do queijo Prato é devida à adição do corante natural extraído da semente de urucum, uma árvore denominada *Bixa orellana*. O corante pode ser adquirido sob a forma de extrato alcoólico-alcalino, com concentração padronizada, de modo que uma dosagem de 5 a 10 ml de corante para 100 L de leite forneça a coloração desejada ao produto final (OLIVEIRA, 1986).

3.4.2.1.4 – Coagulante

O coalho tem a função de coagular a caseína presente no leite. A principal enzima utilizada do coalho é a renina, que é uma fosfoproteína de ação proteolítica presente no estômago de ruminantes jovens. Ela atua hidrolisando ligações peptídicas da caseína entre os aminoácidos (Phe105-Met106), transformando-a em *para*-caseína que precipita em presença de íons cálcio (Ca^{2+}), formando a coalhada (PERRY, 2004).

Além da renina, há outros exemplos de coagulantes como os produzidos a partir de microrganismos como *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei* e *Cryphonectria parasitica* e os produzidos a partir de vegetais, como das flores de *Cynara cardunculus*. O coagulante microbiano Chy-Max, comercializado pela Chr. Hansen é produzido a partir do processo conhecido com FPC (*Fermentation Produced Chymosin)* a partir do *Aspergillus niger* var. *awamori*, sendo composto por 100% de quimosina (NEVES-SOUZA; SILVA, 2005).

O coagulante destinado à produção do queijo Prato deve ser diluído em água antes de sua adição ao leite, ter uma atividade comprovada e ser adicionado em proporções suficientes para promover a coagulação do leite em 45 minutos (OLIVEIRA, 1986). A temperatura ótima de ação do coalho, por exemplo, é 40ºC, mas utilizam-se temperaturas mais baixas, em torno de 35ºC para evitar que a coalhada fique muito dura (PERRY, 2004).

3.4.3 - Tratamento da massa

3.4.3.1 - Corte da massa

A coagulação tem seu ponto final determinado em função da consistência do gel e ocorre em aproximadamente 45 minutos. Após a coagulação, a massa é cortada com o auxílio de liras verticais e horizontais (FURTADO; WOLFSCHOON-POMBO, 1979), com o objetivo de acelerar a saída do soro. No caso do queijo Prato, a massa é dividida em cubos com cerca de 0,4 a 0,5 cm de aresta, os quais permanecem submersos no soro que sai rapidamente do interior dos mesmos. Na formação da coalhada ocorre também a retenção da gordura. Com o passar do tempo, na superfície de cada cubo forma-se uma película elástica (INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES, 1977).

3.4.3.2 - Primeira mexedura

Para conservar os grãos individualizados e evitar que se formem grumos, é necessário mantê-los em constante movimento por meio de agitação. Esta deve ser lenta e contínua, procurando manter toda a massa (fase precipitante) dispersa no soro (fase aquosa), tornando-se mais intensa à medida que os grãos de massa ficam mais firmes. A duração da mexedura é de aproximadamente 20 minutos (OLIVEIRA, 1986).

3.4.3.3 - Pré-cozimento

A etapa de pré-cozimento visa: (i) acelerar e intensificar a dessora, já que as proteínas diminuem a capacidade de retenção de água, à medida que se eleva a temperatura; (ii) alterar a textura dando mais elasticidade à massa; (iii) controlar o desenvolvimento da cultura lática e inibir o crescimento de microrganismos contaminantes indesejáveis (OLIVEIRA, 1986; FURTADO, 1991).

No queijo Prato a temperatura de cozimento não deve ultrapassar 40ºC. O aquecimento é iniciado gradativamente, aumentando cerca de 1ºC a cada 3 minutos, por meio da adição de água quente à massa (processo direto) ou por meio da injeção de vapor na camisa do tanque (processo indireto) (FURTADO, 1991).

Adicionando-se água quente à massa, há maior remoção de lactose do grão (delactosagem). Durante a fabricação, o soro dilui-se pela adição de água e, devido à mudança no equilíbrio osmótico, mais lactose migra do grão para o soro. A água "lava" a massa, diminuindo seu teor de ácido lático. Com menor acidificação, o queijo tende a apresentar maior teor de umidade. Em geral, a adição de água quente é feita após a remoção parcial de cerca de 1/3 do soro (FURTADO, 1991).

O ponto final da massa é verificado quando os grãos se apresentarem ligeiramente firmes, secos, individualizados e quando pressionados demonstrarem boa coesão e elasticidade (FURTADO; WOLFSCHOON-POMBO, 1979).

3.4.3.4 - Segunda mexedura

Após o aquecimento, realiza-se uma agitação mais vigorosa da massa com a finalidade de eliminar o soro dos grãos até que estes atinjam a consistência considerada ideal. A acidificação nesta fase ocorre de forma mais lenta e o teor residual de lactose deixado na massa, regula o pH final do queijo um dia após a fabricação, e depende do teor de umidade final do grão. Esta etapa do processamento não deve ser demorada para que não se obtenha um queijo duro e com baixo teor de umidade (FURTADO, 1991).

3.4.3.5 - Pré-prensagem

A pré-prensagem consiste em submeter a massa a uma pressão visando extrair mais intensamente o soro e unir a massa em um bloco relativamente compacto. A pré-prensagem é efetuada por meio de placas metálicas movidas por pistões hidráulicos, com pressão até duas vezes superior ao peso estimado da massa existente no tanque, durante 20 minutos (SILVA, 1998).

3.4.3.6 - Corte, enformagem e prensagem final

Após a pré-prensagem, a massa é cortada em blocos e colocada em formas de plástico, com tamanhos e formatos desejados. A prensagem final do queijo Prato é efetuada em prensas coletivas com número determinado de formas, sob pressão que varia com o peso dos queijos, visando dar a forma, consistência e umidade requerida pelo produto, dentro de suas características intrínsecas (FURTADO; WOLFSCHOON-POMBO, 1979; OLIVEIRA, 1986).

3.4.4 - Salga

A salga tem como objetivos conferir sabor aos queijos, dar ao produto maior conservação, inibir ou retardar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e selecionar a flora normal do queijo (INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES, 1977).

Durante a salga, a diferença na pressão osmótica entre a salmoura e a massa faz com que parte da umidade da massa seja liberada, juntamente com soroproteínas, ácido lático e minerais dissolvidos, ao mesmo tempo em que o cloreto de sódio (NaCl) é absorvido. O pH e a concentração da salmoura são fatores importantes neste processo. Durante o processo de salga ocorre troca de íons cálcio (Ca^{2+}) por sódio (Na^{+}) nas moléculas de *para*-caseína, o que torna a massa mais macia. Se o pH estiver abaixo de 5,0 haverá mais íons hidrogênio (H^{+}) do que Ca^{2+} ligados às moléculas de *para*-caseína, havendo, portanto, incorporação insuficiente de íons Na^{+} e o queijo ficará duro e quebradiço. Se o pH estiver acima de 5,8 haverá excesso de íons Na^{+} na molécula de *para*-caseína após a troca iônica, deixando o queijo demasiado macio. Portanto, o pH ideal da salmoura é entre 5,2-5,3 (PERRY, 2004).

A salmoura deve apresentar concentração entre 18 e 23 % de NaCl, e temperaturas entre 10 e 14ºC. Estas condições facilitam a absorção do sal, mantêm um grau ótimo de dissolução da *para*-caseína, evita o crescimento de bactérias patogênicas e contaminações (PERRY, 2004).

3.4.5 - Embalagem

O queijo Prato fabricado no Brasil é geralmente comercializado em embalagem a vácuo, a qual controla inclusive a oxidação da gordura. A embalagem visa proteger os queijos contra invasão de microrganismos na crosta e perdas de umidade por evaporação na superfície externa, protegendo o queijo durante a maturação e armazenamento, e servindo de embalagem definitiva para comercialização (OLIVEIRA, 1986).

3.4.6 - Maturação

O queijo Prato antes de ser consumido deve ser maturado por um período entre 45 e 60 dias para adquirir suas melhores características (MINUSSI; FURTADO; MOSQUIM, 1995; PERRY, 2004). Este período é considerado muito longo e muitas indústrias não submetem o produto a tal tratamento. Algumas por não disporem de estrutura física e outras por razões econômicas.

A maturação é um processo enzimático que envolve uma série de modificações bioquímicas (proteólise, glicólise, lipólise e metabolismo de citrato) nos principais constituintes do coágulo, que ocorrem durante o processamento do queijo (MORENO et al., 2004). Ela ocorre em condições de temperatura e umidade controladas, provocando alterações de sabor, odor, textura e consistência (SILVA, 1998).

3.4.6.1 - Proteólise

A proteólise é considerada a principal reação de formação de peptídeos e aminoácidos livres durante a maturação (VISSER, 1993). As enzimas renina, plasmina (proteinase nativa do leite), quimosina ou outro agente coagulante (pepsina ou proteinases microbianas), proteinases e peptidases produzidas pela cultura lática e enzimas não provenientes da cultura (*non starter lactic acid bacteria* – NSLAB) contribuem para a proteólise, dando origem a compostos aromáticos voláteis (FOX, O'COONOR; McSWEENEY, 1996, WALLACE; FOX, 1997).

A proteólise do queijo, principalmente da caseína, pode ser dividida em três fases. A primeira fase está relacionada ao período antes da fabricação, onde a proteólise é proveniente da ação de proteinases naturais do leite e de origem microbiana. Durante a coagulação enzimática, ocorre a segunda fase da proteólise, onde enzimas proteolíticas com alta atividade em pH ácido, como a quimosina, atuam sobre a κ-caseína e hidrolisam a ligação entre os aminoácidos 105-106 (fenilalanina-metionina). A terceira fase ocorre durante o período de maturação, sendo realizada por enzimas coagulantes, enzimas naturais do leite, de bactérias láticas adicionadas, de fermento não lático (mofo,

leveduras) e de bactérias não desejadas, que são resistentes à pasteurização ou que ocorrem em queijos como contaminantes durante a fabricação (COSTA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998).

As mudanças na proteólise do queijo podem ser designadas pelos substantivos "extensão" e "profundidade". A "extensão", também conhecida como "índice de maturação", caracteriza a quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis acumuladas durante o processo, expressas como porcentagem de nitrogênio total. Baseia-se na precipitação isoelétrica da caseína em pH < 4,6, em uma amostra diluída de queijo e quantificação das substâncias solúveis por meio do método de Kjeldahl (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). A "profundidade" da proteólise abrange as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, como aminoácidos, oligopeptídeos e aminas, acumuladas durante o processo. Pode ser quantificada pelo teor de nitrogênio não-protéico, ou seja, as substâncias de baixo peso molecular que não se precipitam na presença de ácido tricloroacético a 12% (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

3.4.6.2 - Glicólise

O principal açúcar dos queijos é a lactose, e sua degradação por meio da fermentação lática, ocorre na maturação. Cerca de 98% da lactose é removida juntamente com o soro e a lactose residual é degradada por bactérias do próprio leite ou da cultura lática, produzindo ácido lático. O metabolismo da lactose residual é essencial para a formação de queijos de boa qualidade (FOX et al., 1997).

A relação sal/umidade (S/U) na massa do queijo influencia a velocidade do metabolismo: *Lactococcus cremoris* são mais sensíveis ao sal que os *Lactococcus lactis* e estes são mais sensíveis que as bactérias contaminantes. Em baixa concentração S/U, menor que 5% e baixa população contaminante, a lactose residual é convertida principalmente pelas bactérias láticas (FOX et al., 1997).

O ácido lático formado na fermentação do leite apresenta-se no queijo principalmente sob a forma de lactato, o qual serve de substrato para bactérias como *Propionibacterium* que fazem parte da microbiota de queijos como Emmental e Gruyère. Nestes tipos de queijos, a degradação da lactose ocorre via fermentação

propiônica, formando sais de ácidos propiônicos e acético, além de CO_2, o qual é responsável pela formação de olhaduras em queijos (PERRY, 2004). Em queijos com quantidades maiores que as normais de bactérias contaminantes do gênero *Clostridium*, a degradação da lactose ocorre paralelamente em uma outra rota, a fermentação butírica, na qual o lactato é transformado em butirato e há formação de dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio (H_2), responsáveis pelo estufamento dos queijos durante a maturação, defeito este conhecido com estufamento tardio (PERRY, 2004).

3.4.6.3- Lipólise

A lipólise, em geral, é muito limitada aos queijos de massa firme. Durante o processo de maturação ocorre a lipólise das gorduras com formação de ácidos graxos responsáveis pelo sabor de queijos maturados. Estas reações ocorrem por ação dos microrganismos presentes e/ou por meio de enzimas adicionadas para este fim, pois a lipase natural do leite não é ativa em valores de pH inferiores a 6,5 e é facilmente destruída pelo calor. Os principais ácidos formados são butírico, capróico, caprílico e láurico, sendo que a proporção varia de acordo com o agente lipolítico (COSTA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; PERRY, 2004).

3.5 - Aceleração da maturação

Para aumentar a velocidade das reações bioquímicas e químicas que ocorrem no período de maturação do queijo, é necessário utilizar uma tecnologia de aceleração que não altere a qualidade do produto final. Segundo Kirby (1989), os principais objetivos desejados com a aceleração da maturação são: incremento na margem de benefícios para os fabricantes, aumento da confiabilidade do desenvolvimento do sabor curado, compensação das mudanças de sabor produzidas pela introdução de tecnologia nova, incrementar a gama de produtos/sabores disponíveis para o consumidor.

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de acelerar o processo de maturação. Esta aceleração pode gerar economias em refrigeração e em trabalho, incentivar a produção de queijo em países em desenvolvimento, onde o investimento em estocagem poderia ser um fator limitante e contribuir para a diminuição do preço final do produto, uma vez que o custo de produção também seria menor (EL SODA, 1986).

Os métodos mais utilizados para acelerar o processo de maturação são: elevação da temperatura de maturação, adição de enzimas exógenas no coágulo, uso de culturas atenuadas geneticamente modificadas, adição de bactérias ácido-láticas não provenientes das culturas láticas como culturas adjuntas e adição de massa solubilizada ("slurry"), o qual contém bactérias, enzimas e cofatores (WALLACE; FOX, 1997).

3.6 - Queijos com teor reduzido de gordura

3.6.1 - Características gerais

A gordura é considerada um importante ingrediente para os aspectos sensoriais e fisiológicos dos alimentos, contribuindo para o sabor, cremosidade, aparência, aroma, odor, sensações de saciedades após as refeições, além de ouros atributos sensoriais como maciez, suculência, sendo determinante na textura dos alimentos (PINHEIRO; PENNA, 2004).

Queijos com teores reduzidos de gordura são caracterizados por apresentarem determinados defeitos não observados nos seus correspondentes feitos com teor integral, como por exemplo, corpo borrachento, fraca intensidade de sabor e propriedades funcionais inadequadas, alterações na firmeza, adesividade e palatabilidade (OLSON; JOHNSON, 1990b; SILVA et al., 2004).

Segundo o Regulamento Técnico Referente à Informação Nutricional Complementar (BRASIL, 1998), um produto para ser considerado "light" deve apresentar uma redução mínima de 25% em relação ao conteúdo comparativo de nutrientes.

A elaboração do queijo Prato a partir do leite com teor reduzido de gordura em 50% (1,7% de gordura) apresentou uma redução de 41,5% na gordura, um aumento de 10% de umidade e 16% de proteína, comparado ao controle. Não houve diferença no pH ($p>0,05$) e o teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 apresentou um aumento progressivo em ambos os queijos, ao longo do tempo de maturação, além de uma redução aproximada de 30% em calorias (KATSUDA et al., 1999).

3.6.2 - Características de textura e sensorial

3.6.2.1. Perfil de textura

Textura, do ponto de vista técnico, é a soma das sensações derivadas da degustação de um alimento, as quais englobam as sensações percebidas na cavidade oral, as propriedades mastigatórias, residuais e acústicas, ou ainda, é a reação do alimento frente à aplicação de forças. Para o consumidor, a textura mostra o grau de aceitabilidade do produto, pois é associada às propriedades sensoriais (CAMPOS et al., 1989).

A avaliação instrumental do perfil de textura pode ser realizada no texturômetro TA-XT2, mostrado na Figura 1 e as medidas dos parâmetros são realizadas conforme a Figura 2, onde: F = força, A = área entre os números especificados, t = tempo entre os números especificados.

As características instrumentais de textura foram definidas em termos físicos, conforme o Quadro 3. Estes parâmetros são determinados da seguinte forma:

- Dureza: valor referente à F2, conforme o gráfico;
- Fraturabilidade: valor referente à F3, conforme o gráfico;
- Adesividade: valor referente à A 3:4, conforme o gráfico;
- Elasticidade: valor obtido pela relação entre L 4:5/L 1:2;
- Coesividade: valor obtido pela relação entre A 4:6/A 1:3;
- Gomosidade: valor obtido por F2 x Coesividade;

- Mastigabilidade: valor obtido por Gomosidade x Elasticidade;
- Resiliência: valor obtido pela relação entre A 2:3/A 1:2.

Quadro 3 - Definições físicas das características de textura

Propriedades	Físicas
Primárias	
Dureza ou firmeza	Força necessária para produzir uma certa deformação.
Coesividade	Extensão a que um material pode ser deformado antes da ruptura.
Elasticidade	Velocidade na qual um material deformado volta à condição não deformada, depois que a força de deformação é removida.
Adesividade	Energia necessária para superar as forças atrativas entre a superfície do alimento e a de outros materiais com os quais o alimento está em contato.
Secundárias	
Fraturabilidade	Força pela qual o material fratura; um produto com alto grau de dureza e baixo grau de coesividade.
Mastigabilidade	Energia requerida para mastigar um alimento sólido até a deglutição; é o produto – dureza x coesividade x elasticidade.
Gomosidade	Energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido até este estar pronto para deglutição; é o produto de baixo grau de dureza x alto grau de coesividade.
Resiliência	Propriedade pela qual a energia armazenada em um corpo deformado é devolvida quando cessa a tensão causadora da deformação elástica

Adaptado de CIVILLE; SZCZESNIAK, 1973, citado por CAMPOS et al., 1989.

Figura 1- Texturômetro TA-XT2 Stable Micro System

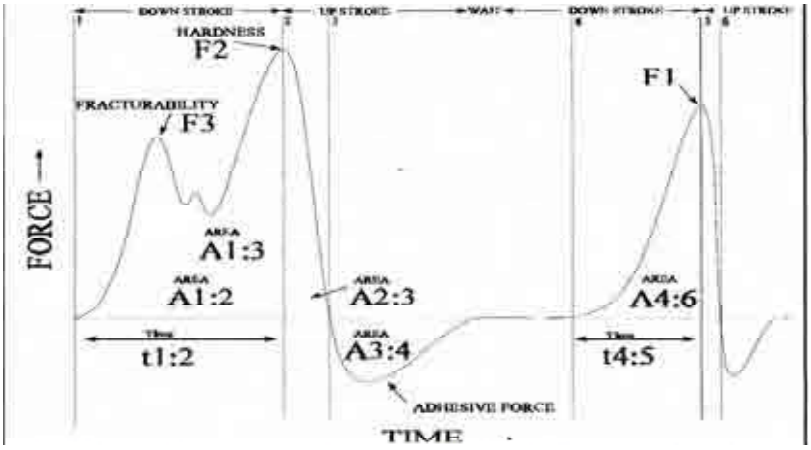


Figura 2 – Gráfico das medidas dos parâmetros de textura.

As características de textura de um queijo maturado estão relacionadas principalmente com a degradação das proteínas do queijo, influenciadas por outros fatores, tais como: umidade, relação umidade/caseína, sal e atividade proteolítica e peptidolítica das culturas láticas (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

Quando o teor de gordura é reduzido ocorrem modificações nas propriedades físicas do queijo, com alteração na firmeza, adesividade e palatabilidade (OLSON; JOHNSON, 1990a). Os queijos apresentam maior umidade e as proteínas contribuem para o desenvolvimento da textura e o conteúdo de sal na fase úmida do queijo, é menor (MISTRY, 2001).

Em queijos com teor reduzido de gordura, a água substitui a gordura, podendo atuar no interior da rede protéica, reduzindo sua resistência à deformação (JACK; PATERSON, 1992).

Katsuda et al. (1999) observaram que aos 45 dias de maturação, queijos com 3,4% e 1,7% de gordura apresentaram uma considerável redução na elasticidade, em comparação ao início do período, não se observando diferença significativa ($p>0,05$) entre ambos.

Baldini et al. (1998) observaram que a adesividade em queijo Prato comercial tende a aumentar com o tempo, porém, Katsuda et al. (1999) não observaram diferença ($p>0,05$) na adesividade entre queijos com 3,4 e 1,7% de gordura, aos 45 dias de maturação.

3.6.2.2. Avaliação sensorial

A análise sensorial é uma medida multidimensional que permite identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, identificar e quantificar as características sensoriais importantes, de forma rápida, além de identificar problemas particulares que não poderiam ser detectados por outros procedimentos analíticos (PENNA; HOFFMANN; BOZZETTI, 2002).

Frente à necessidade de comunicar a um público heterogêneo as principais características sensoriais de um queijo, além de facilitar a escolha entre os vários outros disponíveis, foi desenvolvido o modelo "Etana". Este modelo tem como objetivo descrever o perfil sensorial de queijos de maneira simples, usando um vocabulário específico, em um diagrama de radar, com 14 parâmetros sensoriais em uma escala de 5 pontos (PENNA; HOFFMANN; BOZZETTI, 2002).

Os parâmetros incluídos no modelo "Etana" foram definidos como:

- *Odor*: propriedade organoléptica perceptível no queijo por meio do órgão olfativo, cheirando as substâncias voláteis;
- *Aroma*: propriedade organoléptica perceptível por meio do retro-olfato antes da deglutição. Este estímulo é levado pela nuvem aromática liberada pela mastigação e guiado através do interior do nariz, pela respiração;
- *Doce*: gosto elementar provocado pelas soluções aquosas de substâncias como a sacarose ou frutose;
- *Ácido*: gosto elementar provocado pelas soluções aquosas de substâncias ácidas diluídas como ácido cítrico ou tartárico;
- *Salgado*: gosto elementar provocado pelas soluções aquosas de substâncias como cloreto de sódio;
- *Amargo*: gosto elementar provocado pelas soluções aquosas de substâncias tais como quinino e cafeína;
- *Adstringente*: sensação complexa referente à contração da mucosa da boca que, por exemplo, se produz com os taninos ou banana verde;
- *Picante*: sensação que se manifesta na boca como uma picada, podendo chegar até a dor;

- *Elasticidade*: habilidade de uma substância recuperar sua forma inicial e dimensões após ser submetido à pressão;
- *Firmeza*: resistência a uma dada deformação;
- *Friabilidade*: característica de a substância ser reduzida facilmente em pedaços;
- *Adesividade*: esforço necessário para prevalecer sobre forças que mantêm duas superfícies em contato;
- *Solubilidade*: sensação que se desenvolve quando a amostra se derrete muito rapidamente na saliva;
- *Umidade*: percepção da quantidade de água sentida na boca.

Queijos maturados com baixo teor de gordura apresentam sabor e aroma atípicos, que são associados com a diminuição nos níveis de ácidos graxos, como os ácidos hexanóico e butanóico e a metil cetona (BANKS; BRECHANY; CHRISTIE, 1989).

Os peptídeos amargos são formados pela ação de várias proteases na caseína. Quando estes peptídeos se acumulam em altas concentrações, devido à produção excessiva ou degradação inadequada por peptidases microbianas, ocorre o amargor em queijos, característica que também pode ser resultante de alguns aminoácidos, amidas, cetonas de cadeias longas e alguns monoglicerídeos (McSWEENEY, 1997).

O desenvolvimento de amargor é um defeito comum em queijos com baixo teor de gordura devido ao baixo conteúdo de sal e alta umidade. Compostos hidrofóbicos produzidos por proteólise são perceptíveis com a maior intensidade de amargor nestes queijos, uma vez que estes compostos são absorvidos pela gordura (OLSON; JOHNSON, 1990b).

Os ácidos graxos em cadeias curtas que são liberados por meio da atividade lipolítica contribuem para o sabor e aroma dos queijos. A gordura contribui na liberação destes compostos, porém, quando o conteúdo de gordura é diminuído, estes ácidos graxos estão presentes em menor quantidade e o queijo apresenta falta de sabor e aroma (MISTRY, 2001).

Freqüentemente, em queijos com teor reduzido de gordura, o pH diminui com o passar do tempo e este decréscimo resulta em um forte sabor ácido que tende a ser cada vez mais intenso (DRAKE et al., 1995).

O sabor de ranço em queijos com teor reduzido de gordura, fabricado em baixa temperatura de cozimento, pode ser resultado da alta umidade e de uma baixa proporção

de sal/umidade (DRAKE et al., 1995). Esta proporção é um indicador do verdadeiro conteúdo de sal na fase úmida do queijo, que, sendo baixa, pode resultar na proliferação de bactérias não pertencentes à cultura lática (NSLAB), aceleração de reações enzimáticas e alterações no metabolismo de bactérias da cultura.

Em estudos com queijo Prato com diminuição de 50% no teor de gordura, Katsuda et al. (1999) observaram que após 45 dias de maturação, o queijo Prato com baixo teor de gordura não apresentou diferenças significativas em relação ao aroma, coesividade, adesividade e mastigabilidade. Apresentou-se com melhor aparência, mais firme e elástico do que o queijo controle.

3.6.3 - Capacidade de derretimento

A capacidade de derretimento de queijos é um importante indicador de sua qualidade. As propriedades de derretimento são controladas pela composição do queijo no momento do aquecimento, sendo os teores de proteína, gordura, umidade, sal, cálcio, hidrólise protéica e extensão da hidratação da proteína, parâmetros importantes e que são influenciados pela variedade do queijo, as condições de processamento e grau de maturação (NONOGAKI; MONTEIRO; GIGANTE, 2004).

A capacidade de derretimento é importante para o queijo Prato, pois a aceitabilidade do consumidor a este produto está relacionada com características físico-químicas, sensoriais e funcionais adequadas (SANCHEZ, 1999).

Tunick et al. (1993) verificaram que houve necessidade de aumento do tempo de maturação para que o queijo Mussarela, com redução no conteúdo de gordura, apresentasse bom derretimento. Maiores conteúdos de gordura promoveram maior derretimento, sendo que esta característica aumentou durante o tempo de estocagem por um período de 60 dias, porém no queijo sem gordura, foram observadas poucas mudanças no derretimento no mesmo período.

O aumento na capacidade de derretimento durante o armazenamento pode ser relacionado mais à hidrólise secundária da proteína que à hidrólise inicial. Estudos com queijo Cheddar não encontraram associação entre a quebra da fração α_{s1}-caseína e o derretimento, mas relacionaram o aumento deste com a degradação da β-caseína

(BOGENRIEF; OLSON, 1995). Dave et al. (2003) sugeriram que a capacidade de derretimento é influenciada pela hidrólise contínua das frações α_{s1} e β-caseína em pequenos peptídeos e não da hidrólise inicial das proteínas intactas.

3.7 - Alternativas no processo tecnológico para melhoria das características do queijo com teor reduzido de gordura

O desenvolvimento de processos de fabricação de queijos com baixo teor de gordura envolve alterações nos processamento que incluem: mudanças de temperatura e tempo de cozimento, pH durante a fabricação e quantidade de sal (JOHNSON; CHEN, 1995), seleção de culturas láticas e uso de aditivos como estabilizantes e substitutos de gordura (MISTRY, 2001).

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

O desenvolvimento da textura nos queijos ocorre devido à quebra da α_{s1}-caseína durante a maturação (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987), que ocorre de forma inadequada nos queijos com baixo teor de gordura. O grau de hidrólise depende da umidade e do conteúdo de sal do queijo (MISTRY; KASPERSON, 1998). Altos valores de pH e menores temperaturas de cozimento normalmente utilizadas na fabricação de queijos com baixo teor de gordura, levam a uma menor retenção da quimosina e menor atividade da plasmina. Estas são as razões para uma menor quebra das proteínas durante a maturação (MISTRY, 2001).

Rodriguez et al. (1999) mostraram que queijos semiduros, com baixo teor de gordura, produzidos com leite concentrado por microfiltração apresentam qualidades sensoriais semelhantes às dos queijos tradicionais, pois se utilizando este procedimento ocorre maior retenção, cerca de 35%, das proteínas do soro.

Para o queijo Cheddar com baixo teor de gordura e pH entre 5,6 e 5,8, a lavagem do coágulo com água a 22ºC, ajuda na retenção da umidade e também pode arrastar ácidos e lactose, prevenindo uma queda inicial de pH, mas pode arrastar compostos

desejáveis que dariam sabor ao queijo (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1997). A lavagem do coágulo a 35ºC por 5 minutos maximizou a qualidade sensorial de queijos Cheddar com teor reduzido de gordura (DRAKE et al., 1995).

Um processo de fabricação do queijo com teor reduzido de gordura, combinando a lavagem do coágulo com outras modificações, como o uso de culturas adjuntas para acelerar o desenvolvimento de sabor, podem melhorar o queijo (DRAKE et al., 1995).

Culturas láticas, como *Lactococcus* mesófilos, selecionadas para fabricação de queijos com baixo teor de gordura sofrem autólise em baixas temperaturas de cozimento e alto teor de umidade (ARDÖ, 1997), liberando enzimas metabólicas e proteolíticas, ácidos nucléicos e aminoácidos (MORENO et al., 2004). Estas culturas apresentam baixa atividade proteolítica, porém alta atividade peptidolítica. *Lactobacillus casei* ssp. c*asei* é importante no desenvolvimento de propriedades funcionais do queijo Mussarela com baixo teor de gordura (MERRIL et al., 1996).

Alguns aditivos são utilizados como substitutos de gordura promovendo melhorias nas características sensoriais e funcionais do queijo. Entre eles destacam-se as gomas, carragenas, géis de celulose, gelatinas e produtos a base de amido. A celulose microcristalina é um componente funcional que forma uma partícula esférica para simular as características dos glóbulos de gordura. A fase aquosa é então estruturada para controlar o tipo de carragena que irá interagir diretamente com as micelas de caseína presentes nos ingredientes básicos do leite. A carragena dificulta a associação caseína-caseína promovendo uma textura mais macia (BULLENS; KRAWEZYH; GEITHMAN, 1994).

O amargor em queijos duros com baixo teor de gordura pode ser amenizado com o aumento do conteúdo de sal, para 4,5% na fase úmida do queijo, a fim de controlar a atividade microbiana (MISTRY; KASPERSON, 1998).

3.7.1 – Uso de enzimas exógenas em queijos como estratégia de economia e qualidade

O uso de enzimas para modificar as propriedades funcionais de proteínas tem uma promissora aplicação na indústria de alimentos. A grande vantagem do uso de

enzimas comparado com outros agentes inclui a sua especificidade e o fato de serem efetivas em baixas concentrações (MAHAJAN; DUA, 1998).

As enzimas proteolíticas promovem a hidrólise parcial da proteína alterando suas propriedades funcionais, tais como: solubilidade, emulsificação, geleificação, viscosidade, hidratação, sabor, entre outros (MAHAJAN; DUA, 1998).

A adição de enzimas exógenas para aceleração da maturação de queijos tem sido bastante estudada. É o método mais direto, onde as enzimas são adicionadas para aumentar a taxa de proteólise e/ou lipólise. Adicionam-se também peptidases para aumentar a concentração de aminoácidos livres, uma vez que o aumento da proteólise e o rápido desenvolvimento do sabor e aroma em queijos é obtido com um aumento na concentração destes aminoácidos (WALLACE; FOX, 1997).

A escolha do método de adição de enzimas aos queijos representa uma importante estratégia a ser considerada. Se as enzimas são adicionadas ao leite, a caseína é atacada prematuramente e pequenas partes da enzima são retidas na massa, o que aumenta o custo, além de inviabilizar o soro. A adição de proteinases ao leite também resulta em uma redução no rendimento do queijo e no aparecimento de defeitos de sabor durante a fabricação e no próximo estágio, a maturação.

A eficiência da adição de enzimas à coalhada para acelerar a maturação depende: (i) da dosagem da enzima, (ii) da proporção entre a atividade da peptidase e proteinase, (iii) da distribuição uniforme da enzima na coalhada, para evitar manchas avermelhadas oriundas da atividade proteolítica, (iv) da estabilidade da enzima, (v) do substrato específico, (vi) da quantidade de enzima perdida na prensagem e (vii) da temperatura de armazenamento do queijo (WILKINSON et al., 1992).

Entre os estudos realizados com utilização de enzimas na aceleração da maturação de queijos, observou-se que índices elevados de extensão da maturação foram obtidos pelos tratamentos enzimáticos no qual se utilizaram culturas tradicionais e enzimas exógenas (MINUSSI; FURTADO; MOSQUIM, 1995). A utilização de enzimas aumentou significativamente a concentração de substâncias voláteis nos queijos (EL-SONBATY et al., 2002).

Tye; Haard; Patel (1988) adicionaram uma protease bacteriana ao leite pasteurizado na fabricação do queijo Cheddar obtendo um produto maturado mais rapidamente que o queijo controle produzido tradicionalmente.

A adição de preparados comerciais de enzimas em queijo Ossau-Iraty, produzido no sudoeste da França, a partir de leite de ovelhas, cru ou pasteurizado, promoveu liberação de aminoácidos proporcionalmente à concentração de enzima empregada. Os níveis dos aminoácidos taurina, tirosina e valina não foram afetados pelo tratamento enzimático, enquanto que os níveis de serina, glicina, arginina e prolina diminuíram (IZCO et al., 2000).

A enzima proteolítica do fruto verde de gravatá (*Bromelia fastuosa*) foi testada por Leite; Pitarello; Penna (2003) para acelerar a maturação de queijo Prato integral, mostrando que os queijos em que se adicionou a enzima apresentaram aos 15 dias de maturação, índices de proteólise superiores aos encontrados nos queijos sem adição de enzimas, aos 45 dias. Silva (1998) observou que o uso da enzima Neutrase®, uma endoprotease produzida por *Bacillus subtilis*, em queijo Prato promoveu uma redução no tempo de maturação.

Um método utilizado para evitar a perda e a contaminação do soro por enzimas é o encapsulamento, que consiste em um sistema onde as enzimas são revestidas por gelatina, gordura de leite ou lipossomas de fosfolipídeos, que liberam as enzimas após a dessora quando a maturação se inicia (KIRBY, 1989). Law; King (1985) usaram lipossomas para adicionar proteinase neutra de *B. subtilis* ao leite para fabricação de queijo Cheddar e observaram que cerca de 90% das enzimas permaneceram na coalhada. Kailasapathy; Lam (2005) adicionaram enzimas encapsuladas ao leite, antes da adição do coalho para a fabricação de queijo Cheddar e observaram que todos os queijos tratados com enzimas encapsuladas apresentaram maiores índices de proteólise quando comparados ao queijo controle, sem adição de enzima.

Vários são os estudos em relação à utilização de enzimas para acelerar a maturação de queijos. Em alguns casos o uso desta tecnologia não alterou a qualidade do produto final, enquanto que em outros se obteve características indesejáveis. Frente a tal situação, nota-se que são necessários estudos mais aprofundados objetivando um produto com características típicas juntamente com os benefícios obtidos com este processo.

Além das melhorias das características físico-químicas e sensoriais do queijo Prato, o uso de enzimas proteolíticas pode diminuir o período de maturação dos queijos, fazendo que estes sejam comercializados com as características desejadas em um menor espaço de tempo e diminuição dos custos envolvidos no processo de maturação, como

energia e espaço físico. Além disso, a obtenção de enzimas extraídas de vegetais é um processo de baixo custo.

3.7.1.1 - Enzima fastuosaína

O gravatá (*Bromelia fastuosa*) é um fruto da família Bromeliaceae. É comestível, apresenta sabor ácido e picante, sendo consumido "in natura" ou na forma de licores e compotas. Os frutos são empregados na medicina caseira devido às propriedades terapêuticas de seu xarope nas afecções pulmonares como bronquite e asma e também como vermífugo (OLIVA NETO; CERON; ROMANELLI, 1986).

Romanelli; Torres-Queiroz; Ceron (1994) observaram que com o uso de L-cisteína 5mM como ativador, dobrou-se a atividade da enzima do fruto gravatá (Figura 3). Oliva Neto; Ceron; Romanelli (1986) mostraram que as espécies *Bromelia fastuosa* (gravatá) e *Ananas comosus* (abacaxi) apresentam composição química similar e que suas enzimas, fastuosaína e bromelina, respectivamente, possuem propriedades análogas.

A fastuosaína pertence ao grupo das cisteíno-peptidases, a qual possui uma cisteína e uma histidina no sítio ativo. A massa molecular da enzima foi estimada em 24 KDalton e a enzima apresentou atividade máxima em pH próximo ao neutro e temperatura entre 55-60ºC (CABRAL, 2001). Em uma concentração de 150mM de NaCl, a enzima apresenta atividade máxima (CABRAL, 2005).

Figura 3 - Cacho de *Bromelia fastuosa* (gravatá).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Leite pasteurizado tipo A

Para a caracterização do leite pasteurizado tipo A utilizado na fabricação dos queijos tradicionais e modificados foram feitas análises físico-químicas e microbiológicas, em triplicata, cujos métodos estão descritos a seguir:

- *Densidade:* foi determinada por meio do termolactodensímetro de Quevenne, que possui escala entre 1,015 a 1,040 g/cm^3, e corrigida para 15ºC em função da temperatura (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- *Teor de gordura:* foi determinado pelo método de Gerber (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- *Teor de extrato seco total (EST):* foi determinado de forma indireta utilizando os valores encontrados para os teores de gordura e densidade por meio do disco de Ackermann (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- *Acidez:* foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N e solução de fenolftaleína como indicador, sendo expressa em porcentagem de ácido lático (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- *Presença de antibióticos:* foi feita pelo Teste Snap^{TM} Beta Lactam (TRONCO, 1997).
- *Análises microbiológicas:* foi realizada a pesquisa de *Salmonella ssp.* (BRASIL, 2003);
- A contagem padrão em placas (UFC/ml) e a verificação da presença de coliformes a 30ºC e a 45ºC foram realizadas pelo laticínio Salute, fornecedor dos leites utilizados na elaborações dos queijos Prato, segundo a Instrução Normativa nº 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

4.2 - Preparo da cultura e contagem de microrganismos

As culturas de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (LL 50A, fornecida pela DSM Food Specialties Dairy Ingredients, Holanda), liofilizadas e congeladas, foram dissolvidas em 1000 ml de leite desnatado esterilizado e resfriado a 5ºC e distribuídas em recipientes de vidro estéreis, cobertas com glicerol (crioprotetor) e mantidas em congelador à temperatura de -18ºC. Na ocasião do uso, as mesmas foram descongeladas e inoculadas diretamente ao leite para a fabricação dos queijos.

Para avaliar a viabilidade das bactérias láticas, foram realizadas contagens da cultura mista de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, utilizadas na fabricação dos queijos Prato e também nos queijos durante o período de maturação, com 1, 15, 30, 45 e 60 dias, através de inoculação por profundidade em placas de Petri, utilizando-se o meio M17 Ágar. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas a 25ºC e 37ºC por 48 horas em aerobiose.

4.3 - Enzimas proteolíticas do fruto verde de *Bromelia fastuosa*

Os frutos de *Bromelia fastuosa* (gravatá) dos quais foi extraída a enzima proteolítica fastuosaína foram coletados na fazenda São Marcos, em São José do Rio Preto, no período de dezembro de 2005 a fevereiro de 2006. Após a coleta os frutos foram colocados em banho com água a 10-15ºC, selecionados, lavados, embalados em sacos plásticos e estocados a -20ºC.

4.3.1 - Obtenção do extrato bruto

Descascaram-se os frutos, retiraram-se as sementes e fibras, utilizando-se somente a polpa. Colocou-se a mesma em liquidificador com tampão de extração

acetato 70 mM, pH 4,5 e EDTA 5mM. Filtrou-se o extrato através de gaze e em seguida em um coador de malha fina. Para a clarificação, o filtrado foi transferido para tubos Falcon de 50 ml e centrifugados à 9.000 x g por 40 minutos a aproximadamente 1ºC, em centrífuga CR3i (Jouan, Saint-Herblain, França).

4.3.2 - Concentração e estocagem das enzimas

As enzimas foram concentradas em concentradores Centriplus-10 (Millipore, Billerica, EUA), em centrífuga refrigerada Spin IV (Incibrás, São Paulo, Brasil) a 3.000 x g a aproximadamente 4ºC. Depois de concentradas, as enzimas foram mantidas em congelador a temperatura de -18ºC, e em seguida liofilizadas em liofilizador LP3 (Jouan, Saint-Herblain, França). A enzima foi obtida e caracterizada por Cabral, 2001, e testada sua aplicação em queijo Prato integral por Leite; Pitarello; Penna, 2003.

4.3.3 - Ensaio enzimático

Antes da fabricação dos queijos com utilização da enzima fastuosaína, foram realizados ensaios da atividade enzimática, seguindo o protocolo de SARATH; DE LA MOTTE; WAGNER (1996), com modificações, conforme apresentado no Quadro 4.

O ensaio baseia-se na hidrólise de uma proteína (no caso, a caseína) que serve como substrato para a enzima. A hidrólise libera peptídeos contendo quantidades variáveis dos aminoácidos com grupos aromáticos [fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp)], os quais apresentam absorção de luz no comprimento de onda de 280 ηm (especificamente a tirosina e o triptofano). As proteínas são precipitadas pela adição de ácido tricloroacético e após centrifugação, o sobrenadante contendo aminoácidos aromáticos livres e pequenos peptídeos, apresenta absorção de luz UV proporcional à atividade da enzima.

Quadro 4 - Ensaio enzimático e soluções utilizadas.

Solução	Tubo Teste	Tubo Branco
Solução de enzima	50 mg de enzima/1,5 ml de tampão fosfato de sódio Volume = 50 µl	50 mg de enzima/1,5 ml de tampão fosfato de sódio Volume = 50 µl
Cloridrato de cisteína 0,005M	20µl	20 µl
Pré – incubar por 5 min. a 37ºC		
Tampão fosfato 50mM pH 7,0	50 µl	50 µl
Caseína 1% preparada em Tampão fosfato 50mM pH 7,0	800 µl	800 µl*
	Incubar por 20 min. a 37ºC	
TCA 10%	200 µl	200 µl

* Após a adição de caseína 1%, adiciona-se TCA 10% para interromper a reação enzimática.

Após a adição de TCA 10%, os tubos teste e branco foram centrifugados por 10 minutos a 9.300 x g em um microcentrífuga 5414D (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi submetido à leitura da absorbância em 280 ηm (Abs_{280}) em cubetas de quartzo utilizando um espectrofotômetro de duplo feixe Cary Scan 100 (Varian, Palo Alto, EUA).

A Unidade de Atividade (U) foi adotada segundo Baeza; Correa; Salas (1990), em que 1U corresponde ao aumento de Abs_{280} causado por 1 µmol Tyr/min, nas condições do ensaio.

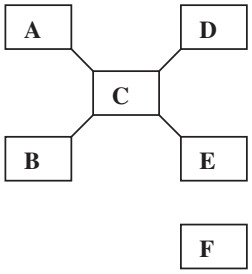
4.4 - Preparo dos queijos

Foram realizados 4 processamentos diferentes, sendo um pelo método tradicional e três pelo método modificado, com a adição da enzima proteolítica. Em cada processamento foram produzidos 5 queijos, como segue:

- *Controle*: sem adição de enzimas (Processamento A);
- *4 mg de fastuosaína/litro de leite* (Processamento B) com atividade enzimática total de 607.500 unidades de atividade (U.);
- *20 mg de fastuosaína/litro de leite* (Processamento C) com atividade enzimática total de 1.395.000 U.;

- *12 mg de fastuosaína/litro de leite* (Processamento D) com atividade enzimática total de 1.822.500 U.

Os queijos foram elaborados a partir de 25 litros de leite pasteurizado padronizado, sendo que a proporção entre leite integral e desnatado a ser utilizado no processamento foi calculada através do teor de gordura dos leites, utilizando-se o diagrama de Pearson, como segue:



- *A*: teor de gordura do leite integral
- *B*: teor de gordura do leite desnatado
- *C*: teor de gordura desejado no leite padronizado
- $D = C - B$: partes de leite integral a serem utilizadas
- $E = A - C$: partes de leite desnatado a serem utilizadas
- $F = D + E$: total de partes de leite padronizado. Por regra de três, calcula-se o volume de leite integral e desnatado para completar os 25 litros de leite padronizado.

A fabricação dos queijos foi realizada conforme mostram as Figuras 4 e 5, em um tanque mecanizado, com capacidade de 56L, dotado de controle de temperatura, na Planta Piloto do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, IBILCE, UNESP, com a utilização dos seguintes coadjuvantes técnicos.

- *Coagulante:* para a coagulação do leite (32ºC/45 min.) utilizou-se 1,25 ml de coagulante microbiano Chy-Max, fornecido pela Christian Hansen;
- *Corante:* foi utilizado 2,5 ml de corante vegetal comercial extraído do urucum.
- *Cultura lática:* foram utilizados 20 ml da cultura lática: *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (LL50 A);
- *Cloreto de cálcio:* foram utilizados 12,5 ml de cloreto de cálcio em solução a 50%;
- *Ácido sórbico:* foi utilizada solução de ácido sórbico (3g em 150ml de água destilada), fornecido pela Clariant S.A., como conservante, conforme permitido pela legislação;

- *Enzima fastuosaína:* foi pesada a enzima, conforme o experimento, diluída em 20 ml de água destilada, adicionada de 15,76 mg de cloridrato de L-cisteína (valor correspondente à concentração molar 0,005M), utilizado como ativador enzimático e incubada a 37ºC por 5 minutos;
- *Cloreto de sódio:* a salmoura foi preparada com cloreto de sódio comercial em concentração de 18%, seguida de pasteurização por 72ºC por 4 minutos. Em seguida foi resfriada e filtrada em dessorador.

Figura 4 - Fluxograma dos processos de fabricação dos queijos Prato tradicionais e modificados.

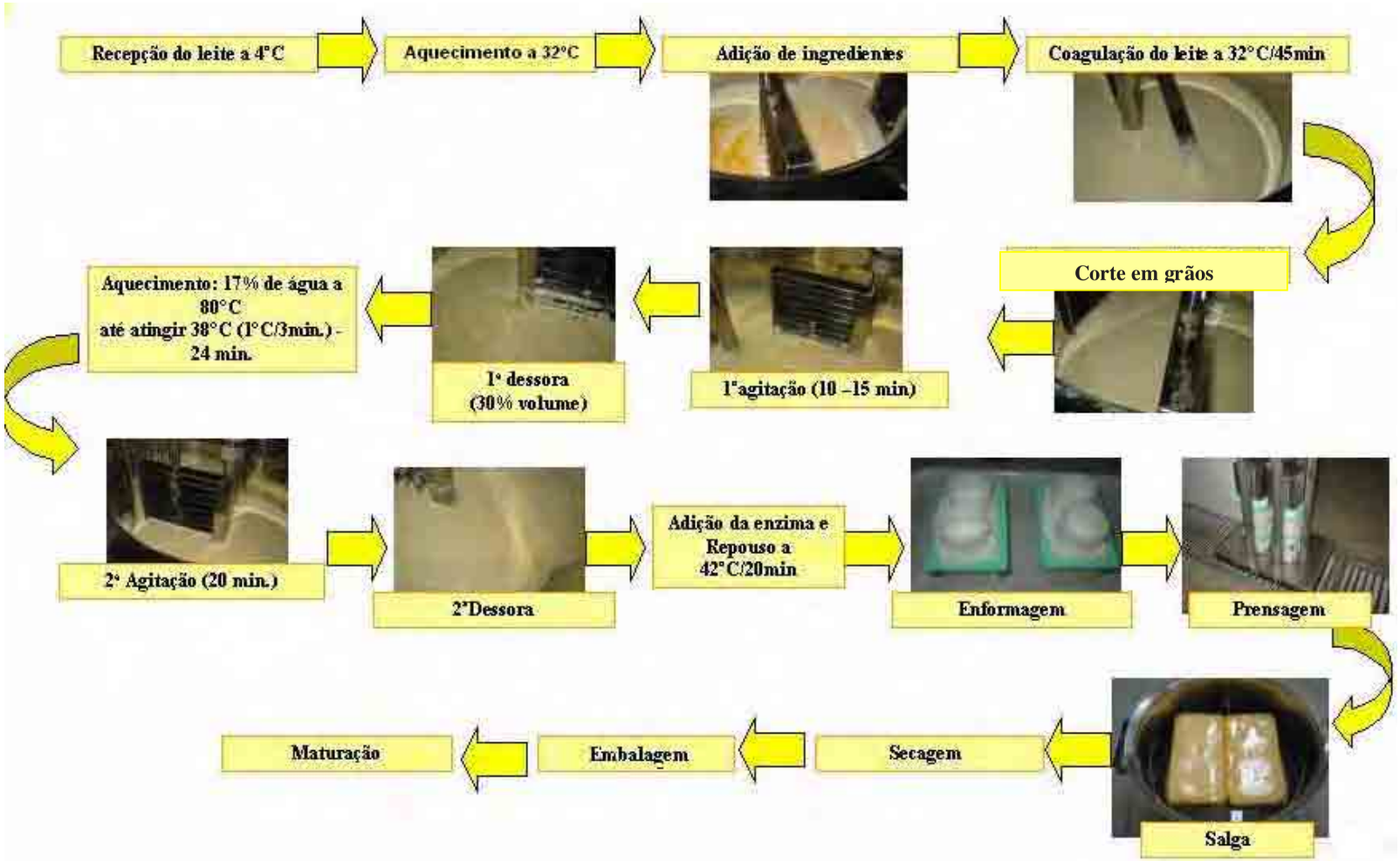


Figura 5 – Ilustração do processo de fabricação dos queijos Prato.

4.5 - Análises microbiológicas

Nos queijos com 1 dia de fabricação foram realizadas as análises microbiológicas (BRASIL, 2003):

- Contagem de bactérias aeróbias mesófilas;
- Enumeração de bolores e leveduras;
- Pesquisa de *Escherichia coli*;
- Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais;
- Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes fecais;
- Pesquisa de Estafilococos coagulase positiva*;*
- Pesquisa de *Salmonella sp*;
- Pesquisa de *Listeria monocytogenes*.

As quatro últimas análises constam dos padrões microbiológicos para queijos de média umidade (36%) e juntamente com as demais, foram realizadas para verificação da qualidade higiênica-sanitária dos produtos fabricados (BRASIL, 2001).

4.6 - Caracterização físico-química dos queijos tradicionais e modificados

As análises físico-químicas dos queijos foram realizadas em triplicata após 1, 15, 30, 45 e 60 dias de fabricação, de acordo com os métodos descritos a seguir:

- *Teor do extrato seco total (EST)*: foi determinado pela secagem em estufa a vácuo por 24 horas a 70ºC, conforme recomendado pela American Public Health Association (CASE; BRADLEY JR.; WILLIAMS, 1985);
- *Acidez:* foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- *Teor de gordura (G)*: foi determinado pelo método de Gerber–Van Gulik (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- *Teor de gordura no extrato seco (GES)*: foi calculado pela fórmula: %GES=(G/EST)x100;

- *Teor de cinzas*: foi determinado por incineração em mufla à 550ºC (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985);
- *Teor de nitrogênio total (NT):* foi determinado pelo método de Kjeldahl;
- *Teor de proteína total*: foi calculado multiplicando-se o valor do nitrogênio total por 6,38 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1997);
- *Teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) ou nitrogênio não caséico (NNC)*: foi determinado pela dosagem do nitrogênio total no filtrado obtido após precipitação isoelétrica das caseínas (SILVA et al., 1997);
- *Teor de nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA) ou nitrogênio não protéico (NNP))*: foi determinado pela dosagem de nitrogênio total no filtrado obtido após precipitação da totalidade das proteínas em presença do ácido tricloroacético a 12% (SILVA et al., 1997);
- *Índice de extensão da maturação (IEM)*: foi obtido pela relação entre os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio total (WOLFSCHOON-POMBO, 1983);

$$Extensão = \frac{Nitrogênio\ Não\ Caséico}{Nitrogênio\ Total} \times 100$$

- *Índice de profundidade de maturação (IPM)*: foi obtido pela relação entre os teores de nitrogênio solúvel em TCA 12% e nitrogênio total (WOLFSCHOON-POMBO, 1983);

$$Profundidade = \frac{Nitrogênio\ Não\ Protéico}{Nitrogênio\ Total} \times 100$$

- *Teores de tirosina e triptofano*: foram determinados na fração obtida por precipitação isoelétrica das caseínas (nitrogênio solúvel em pH 4,6), seguindo-se o método espectrofotométrico descrito por VAKALERIS; PRICE (1959). A leitura espectrofotométrica foi efetuada nos comprimentos de onda 270 e 290 ηm, e as concentrações de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) foram determinadas usando-se as seguintes equações:

  Tyr (mM/L) = (0,95 x A_{270} – 1,31 x A_{290}) x 2

  Tyr (mg/100g queijo) = Tyr mM/L x 453

  Trp (mM/L) = (0,307 x A_{290} – 0,020 x A_{270}) x 2

  Trp (mg/ 100g queijo) = Trp mM/L x 510,5
- *Teor de sal*: foi determinado pelo método de doseamento nas cinzas SILVA et al., (1997);

- *Atividade de água dos queijos (a_w)*: foi determinada pelo método descrito por VAN DENDER et al. (1995).

4.7 - Caracterização dos parâmetros de cor

As mudanças nos parâmetros de cor (L, a* e b* da escala CIELAB) foram obtidas para luz padrão D65 e observação a 10º, em triplicata, aos 30 e 60 dias de maturação, utilizando-se um espectrofotômetro portátil Hunter Lab Mini Scan XE Plus (Hunter Associates Laboratories, Reston, EUA), calibrado com padrões branco e preto (HARTE et al., 2003).

4.8 - Caracterização do perfil de textura dos queijos experimentais

O perfil de textura dos queijos tradicionais e modificados foi avaliado após 30 e 60 dias de maturação utilizando-se o texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra). As amostras de queijo foram cortadas em formato cilíndrico, com 2,5 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura. O procedimento adotado foi o de dupla compressão, utilizando-se um cilindro de acrílico (probe) de 4,5 cm de diâmetro, com velocidade de deslocamento de 2,0 mm/s e distância percorrida de 6,0 mm. Foram determinados os parâmetros: dureza, elasticidade, coesividade, mastigabilidade, gomosidade, adesividade, fraturabilidade e resiliência (GONZÁLEZ et al., 1998).

4.9 - Capacidade de derretimento

A capacidade de derretimento (CD) foi determinada após 1, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação, em triplicata, pelo método modificado de Schreiber, conforme descrito por Kosikowski; Mistry (1997), consistindo em retirar da peça de queijo um cilindro de

36 mm de diâmetro. Com o auxílio de um fatiador, foram cortados discos de 5 mm de espessura. As fatias foram colocadas em placas de Petri divididas em 8 áreas iguais por meio de diâmetros. Foram medidos 8 diâmetros iniciais (Di) da amostra e as placas foram transferidas para a estufa a 107ºC por 7 minutos (NARIMATSU et al., 2003) e a 130ºC por 10 minutos (NONOGAKI; MONTEIRO; GIGANTE, 2004). Posteriormente, as placas foram deixadas por 30 minutos à temperatura ambiente e os diâmetros finais (Df) de cada amostra foram medidos.

A capacidade de derretimento foi calculada por meio da seguinte equação:

$$\text{CD}\ (\%) = \frac{(Df^2 - Di^2)}{Di^2} x100$$

4.10 - Avaliação sensorial

4.10.1 - Preparo da amostra e aplicação do teste

Amostras comerciais de queijo Prato, dentro do prazo de validade, foram divididas de modo a se obter uma parte da amostra como padrão e outra parte submetida ao tratamento para adquirir amargor, sendo preparadas conforme a Figura 6 (adaptada de AUGUSTO; QUEIROZ; VIOTTO, 2005).

Os julgadores foram selecionados a partir de sessões de análise sensorial com 3 grupos de amostras diferentes, sendo apresentadas nas 6 possíveis combinações (AAB, ABA, BAA, BBA, BAB, ABB). As sessões de avaliação foram realizadas nos períodos da manhã (entre 9 e 11 horas) e tarde (entre 15 e 17 horas) em cabines individuais, com iluminação artificial. As amostras foram codificadas usando-se números de 3 dígitos, tomados ao acaso.

Os provadores receberam uma bandeja contendo as amostras, água e uma ficha de avaliação, conforme modelo apresentado na Figura 7.

4.10.2 - Seleção do painel de provadores

Para a seleção do painel de provadores foi utilizado um método de avaliação da sensibilidade de possíveis provadores por meio da detecção do sabor amargo em amostras de queijo tipo Prato, conforme proposto por AUGUSTO; QUEIROZ; VIOTTO (2005). Os possíveis provadores foram escolhidos ao acaso, entre alunos, docentes e funcionários do IBILCE, que realizaram quatro sessões com 3 testes de diferença cada uma. Os provadores foram selecionados conforme o número de acertos nos testes de diferença.

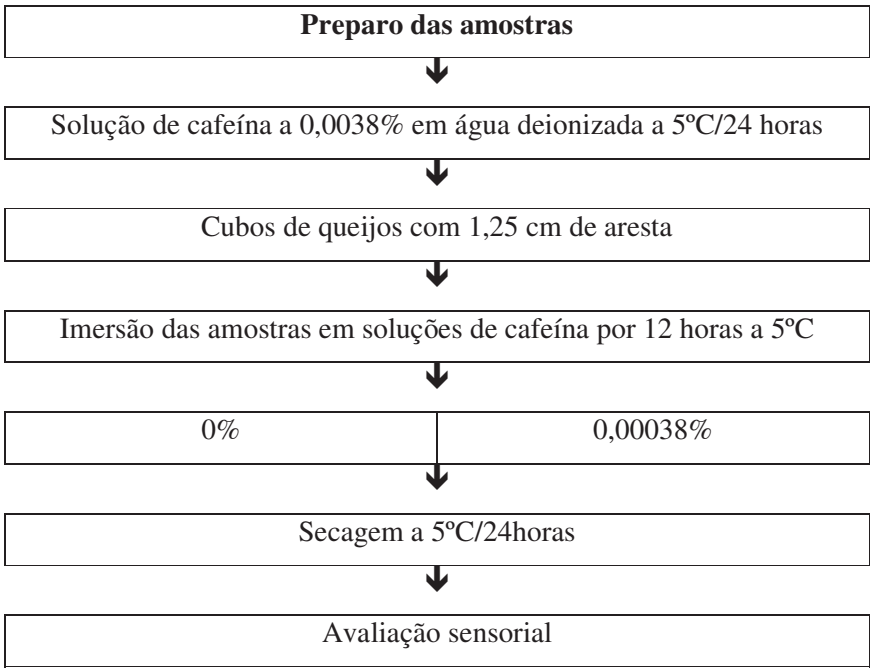


Figura 6 - Fluxograma operacional do processo de preparo das amostras para seleção dos provadores.

Nome: _____ Data: ____/____/____

Duas amostras são iguais e uma é diferente. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e faça um círculo na amostra diferente.

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Comentários:

_____

Figura 7 - Ficha de teste triangular.

4.10.3 - Treinamentos dos provadores

Os provadores selecionados, aqueles que apresentaram o número de respostas corretas correspondentes a uma significância de 0,05% no teste triangular, foram submetidos ao treinamento, no qual receberam amostras de diferentes tipos de queijos, (Gorgonzola, Provolone, Prato e Requeijão cremoso) de diferentes marcas comerciais e aprenderam a identificar e quantificar as características sensoriais que seriam analisadas nos queijos Prato tradicionais e modificados.

4.10.4 - Avaliação sensorial dos queijos Prato tradicionais e modificados

A avaliação sensorial foi realizada nas amostras de queijo tipo Prato tradicionais e modificados após 30 e 60 dias de maturação. Foram avaliadas as características de odor, aroma, doce, ácido, salgado, amargo, adstringente, picante, elasticidade, firmeza, friabilidade, adesividade, solubilidade e umidade, pelos provadores treinados,

utilizando-se o modelo Etana, desenvolvido por Bozzetti; Morara; Zanoni (GIOMO, 2001).

As avaliações sensoriais foram realizadas nos períodos da manhã (entre 9 e 11 horas) e tarde (entre 15 e 17 horas) em cabines individuais, com iluminação artificial. Os provadores receberam uma bandeja contendo a amostra, água e uma ficha de avaliação, conforme modelo apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Ficha de avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana.

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

A caracterização da microestrutura por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do IBILCE – UNESP, em amostras de queijo tipo Prato tradicionais e modificados após 8, 30 e 60 dias.

Os fragmentos de 0,2 mm de queijos, nos diferentes tempos, foram fixados em solução de glutaraldeído a 3% acrescida de 0,25% de ácido tânico em tampão Milonig pH 7,4 ($NaH_2PO_4.H_2O$ - diidrogenofosfato de sódio monohidratado, NaOH - hidróxido de sódio, $C_6H_{12}O_6$ - glicose, H_2O) durante 24 h (COTTA-PEREIRA; RODRIGO; DAVID FERREIRA, 1976). As amostras fixadas foram lavadas com tampão Milonig pH 7,4, e pós-fixadas em solução a 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão Milonig pH 7,4 durante 2 h. As amostras pós-fixadas foram lavadas duas vezes, 10 min cada, com água destilada e desidratadas em uma série graduada de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 15 min cada) e posteriormente em acetona 95% e absoluta três vezes por 15 min cada. As amostras desidratadas foram embebidas na resina Araldite® de baixa viscosidade (1:1 Acetona:Araldite®) durante 16h, seguida de infiltração em Araldite® por 2h a 37ºC e inclusão e polimerização também em Araldite® por 48 h em estufa a 60ºC. Os blocos foram seccionados em navalha de vidro a 500 ηm; após a escolha da área desejada e trimagem do bloco, foram feitas as secções ultra finas (80 ηm) em navalha de diamante, onde depois de coletados em grades de cobre 200 mesh, foram contrastadas por solução de acetato uranila a 2% e citrato de chumbo diluído em NaOH 0,02%. As secções foram examinadas sob microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 E (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) (adaptado de HARTE et al., 2003).

4.11.1 – Análise quantitativa estereológica

Para avaliação quantitativa da microestrutura das amostras, imagens de 5 campos histológicos de cada processamento dos queijos tipo Prato tradicionais e modificados após 8, 30 e 60 dias de maturação foram capturadas aleatoriamente. As

análises morfo-estereológicas foram obtidas segundo o método de Weibel (1978), no qual se utilizou um sistema-teste com 168 pontos e 84 linhas. A partir deste teste, obteve-se a proporção relativa (%) de proteínas, lipídeos, cultura lática e outros componentes não identificados. A referida proporção foi calculada baseando-se na coincidência dos pontos sobre o parâmetro contado, conforme Figura 9.

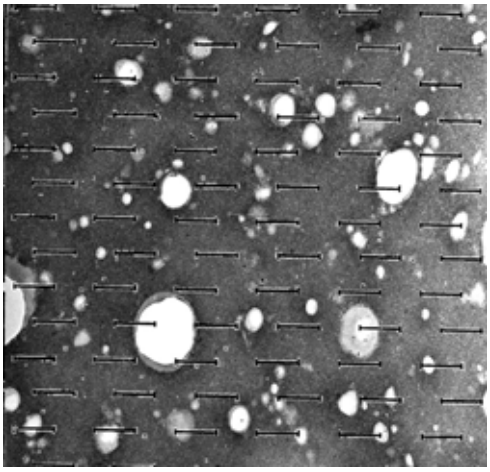


Figura 9 - Ilustração da análise morfo-estereológica.

4.12 - Caracterização do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Urea – PAGE)

As amostras foram coletadas após 1, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação e congeladas para posterior avaliação. A eletroforese em gel de poliacrilamida (Urea-PAGE) foi realizada nas amostras de queijo Prato tradicionais e modificados utilizando-se uma unidade vertical Mini Protean 3 (Bio-Rad®, Hercules, EUA), usando o método descrito por SHALABI; FOX (1987). Os extratos para eletroforese foram preparados dissolvendo-se 20 mg de amostra em 1 ml de tampão, preparado a partir de 1,50g de tris-hidroximetil aminometano (TRIS) e 84g de uréia em 150ml de água destilada, adicionado de ácido clorídrico até pH 6,7, para um volume final de 200ml. As amostras foram levadas a banho de aquecimento a 37ºC por 1 hora, após, adicionou-se 5µl de β-mercaptoetanol, seguido de aquecimento a 37ºC por 45 minutos. Finalmente,

adicionou-se uma pequena quantidade de azul de bromofenol. Aplicou-se 20 µl das amostras no gel, sendo estas separadas com 100V, até o corante azul de bromofenol atingir o final do gel. Os géis foram corados com Brillant Blue Colloidal durante um dia e descorados com água destilada.

4.13 - Análise estatística dos resultados experimentais

A análise de variância (ANOVA) dos resultados experimentais foi realizada a partir de um delineamento de blocos casualizados (DBC), com a utilização do teste de Tukey, considerando-se um nível de significância $p>0,05$, utilizando o programa computacional STAT, desenvolvido por BANZATTO; KRONKA, 1995.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Caracterização das amostras de leite utilizadas para a fabricação dos queijos tradicionais e modificados.

Após realização da análise do teor de gordura dos leites pasteurizados integral e desnatados, tipo A, foi realizada a padronização do teor de gordura. Este leite pasteurizado padronizado foi utilizado na fabricação dos queijos tradicionais e modificados, sendo que os resultados das análises, obtidos após a mistura, estão apresentados na Tabela 1.

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

Análises	**Processamentos**			
	A	**B**	**C**	**D**
Densidade (g/ml)	1,0318[d]	1,0323[b]	1,0333[a]	1,0322[c]
Gordura (%)	1,5[a]	1,3[b]	1,3[b]	1,5[a]
Extrato seco total (%)	9,96[c]	9,90[d]	10,15[a]	10,11[b]
Acidez (% ácido lático/100ml)	0,16[b]	0,16[b]	0,17[a]	0,16[b]
Presença de antibiótico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Salmonella ssp.	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

[a, b, c, d] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Os resultados de contagem padrão em placas, coliformes a 30ºC e coliformes a 45ºC foram fornecidos pela empresa Salute, sendo os resultados apresentados separadamente para as amostras de leite pasteurizado integral e desnatado, tipo A, conforme a Tabela 2.

Os valores de densidade das amostras de leite padronizado utilizados nos quatro diferentes processamentos dos queijos Prato podem ser relacionados ao conteúdo de gordura do leite. A gordura apresenta densidade aproximada de 0,93 g/ml, ou seja,

menor que a da água, que é de 1,0 g/ml, sendo assim, quanto maior o conteúdo de gordura, menor a densidade do leite (PENNA et al., 2001). Quando os conteúdos de gordura nas análises das amostras do leite pasteurizado foram maiores (1,5%), as densidades foram menores, de 1,0318 e 1,0322 g/ml.

Tabela 2 – Análises microbiológicas das amostras de leite pasteurizado tipo A integral e desnatado.

Análises	**Processamentos**							
	A		**B**		**C**		**D**	
	I	**D**	**I**	**D**	**I**	**D**	**I**	**D**
CPP (UFC/ml)	33^{a}	10^{a}	30^{c}	10^{a}	32^{b}	9^{b}	30^{c}	10^{a}
Coliformes a 30ºC (NMP/ml)	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}
Coliformes a 45ºC (NMP/ml)	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}

[a, b, c] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05). CPP: Contagem Padrão em Placas (Unidades Formadoras de Colônias/ml); NMP: Número Mais Provável; I: Integral e D: Desnatado.

Embora tenha sido realizada a padronização do teor de gordura do leite, houve uma pequena variação de 1,3 a 1,5% entre os processamentos. Estes valores foram menores que os encontrados por Katsuda et al. (1999), que foi de 1,7% de gordura para o leite utilizado na fabricação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. De acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado (BRASIL, 2002), os leites utilizados em todos os processamentos são classificados como semidesnatados, por apresentarem conteúdo de gordura entre 0,6 e 2,9%.

Os valores de acidez das amostras de leite padronizado analisadas estão de acordo com a legislação, que estabelece o intervalo de variação de 0,14 e 0,18% de ácido lático (BRASIL, 2002). A acidez do leite deve-se a presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos. A transformação da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido lático, pode elevar a acidez do leite, indicando alta atividade microbiana e tornando o produto impróprio ao consumo (VELOZO et al., s.d.).

Nas amostras de leite utilizadas na fabricação dos queijos não se detectou a presença de antibiótico, estando este apto à fabricação dos queijos. A presença de antibióticos no leite, utilizados para prevenir ou tratar infecções da glândula mamária e doenças do trato reprodutivo, pode prejudicar a qualidade do mesmo, pois provoca a inibição de culturas láticas utilizadas na fabricação de queijos, além de suscitar problemas de saúde pública, como o efeito tóxico destes compostos, que podem causar reações alérgicas em indivíduos susceptíveis, e o desenvolvimento de formas de resistência de microrganismos patogênicos (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS, 2002).

A legislação (BRASIL, 2002) estabelece critérios de qualidade microbiológica para leite pasteurizado tipo A em relação a *Salmonella ssp.*, contagem padrão em placas, coliformes a 30 e 45ºC, sendo estes microrganismos sensíveis a temperatura de pasteurização do leite. Quando presentes no produto final estes microrganismos indicam contaminação pós processamento ou tratamento térmico insuficiente. Leites com boa qualidade microbiológica pressupõem um gado saudável, manuseio e ordenha realizados com boas práticas de higiene e resfriamento do leite a 0-4ºC, no máximo 2 horas após a ordenha (PERRY, 2004). Os leites analisados apresentaram-se de acordo com a legislação, entretanto diferem dos resultados obtidos por Faria et al. (2005), que analisaram leite pasteurizado tipo B e observaram que todas as amostras estavam de acordo com a legislação (BRASIL, 2002), em relação a *Salmonella ssp.*, porém, em relação a enumeração de coliformes a 30ºC, apenas 77,8% das amostras de leite pasteurizado coletados em São Paulo e 11,1% das coletadas em Pernambuco estavam de acordo com a legislação. Em relação à enumeração de coliformes a 45ºC, observou-se o valor de 150 NMP (Número Mais Provável) e ausência, para as amostras coletadas em Pernambuco e São Paulo, respectivamente. Oliveira (2005) analisou leites cru e pasteurizados tipos A, B e C e observou que 66,7% das amostras de leite pasteurizado tipo A não estavam de acordo com a legislação (BRASIL, 2002), em relação a coliformes a 30ºC; 55,6% em relação a coliformes a 45ºC e que todas as amostras analisadas estavam de acordo com a legislação em relação à população de *Salmonella ssp.*

5.2 - Contagem de microrganismos

Os resultados da contagem da cultura mista, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, utilizada na fabricação dos queijos tradicional e modificados estão apresentados nas Tabelas 3 e 4 e ilustradas nas Figuras de 10 a 15.

Como pode ser observado nas Tabelas 3 e 4 em todos os processamentos durante todo o período de maturação, exceto no A, aos 45 e 60 dias, a contagem microbiana a 25ºC apresentou-se maior que a 37ºC. A temperatura ótima de crescimento da cultura mista utilizada na fabricação do queijo Prato, classificada como mesófila, é em torno de 32ºC, sendo praticamente o valor mediano das temperaturas utilizadas na contagem do experimento. Os valores encontrados sugerem que estes microrganismos crescem melhor a temperaturas próximas a 25ºC, confirmando o intervalo aceito na literatura de que microrganismos mesófilos embora apresentem a temperatura ótima citada acima podem crescer entre 10-45ºC, mas também que com o uso intensivo de refrigeração no manuseio de leite e derivados, espécies mesófilas têm sofrido adaptação seletiva, tornando-se psicrotróficas, as quais são capazes de crescer sob refrigeração, embora a maioria apresente temperatura ótima de crescimento maior que 20ºC (PERRY, 2004).

Tabela 3 - População de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* da cultura lática (antes da fabricação dos queijos) e nas amostras de queijo (durante o período de maturação), com incubações a 25ºC por 48 horas em aerobiose.

Dias	Processamentos			
	A	**B**	**C**	**D**
Cultura (UFC/ml)	$4{,}0 \times 10^{16\ d}$	$2{,}7 \times 10^{27\ b}$	$2{,}5 \times 10^{28\ a}$	$6{,}2 \times 10^{23\ c}$
1 (UFC/g)	$2{,}7 \times 10^{10\ E\ d}$	$3{,}6 \times 10^{12\ D\ b}$	$6{,}2 \times 10^{14\ B\ a}$	$2{,}3 \times 10^{12\ E\ c}$
15 (UFC/g)	$3{,}2 \times 10^{13\ C\ b}$	$1{,}3 \times 10^{13\ C\ c}$	$4{,}3 \times 10^{15\ A\ a}$	$3{,}5 \times 10^{12\ D\ d}$
30 (UFC/g)	$1{,}1 \times 10^{14\ B\ c}$	$1{,}4 \times 10^{15\ A\ a}$	$6{,}5 \times 10^{12\ C\ d}$	$3{,}9 \times 10^{14\ A\ b}$
45 (UFC/g)	$3{,}0 \times 10^{14\ A\ a}$	$4{,}3 \times 10^{13\ B\ c}$	$1{,}0 \times 10^{12\ D\ d}$	$1{,}6 \times 10^{14\ B\ b}$
60 (UFC/g)	$1{,}6 \times 10^{12\ D\ b}$	$1{,}0 \times 10^{12\ E\ c}$	$1{,}2 \times 10^{11\ E\ d}$	$3{,}4 \times 10^{13\ C\ a}$

$^{a, b, c, d}$ Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05);
$^{A, B, C, D}$ Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p>0,05).

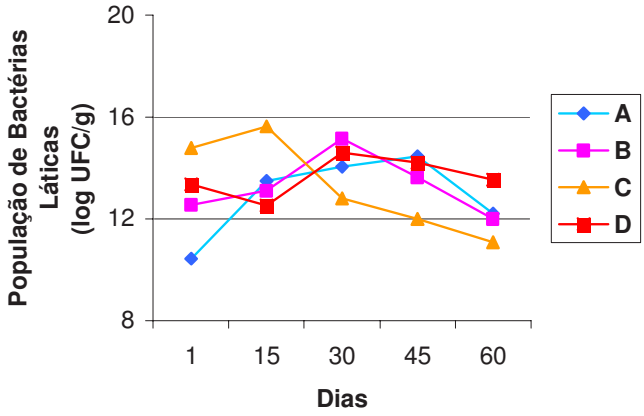


Figura 10 – População de microrganismos nas amostras de queijos a 25ºC.

A maioria dos microrganismos que atua nas modificações dos queijos é mesófila. Bactérias láticas produtoras de aroma e mofos apresentam crescimento ótimo entre 20º e 25ºC. A maioria das culturas láticas, como fermentos mesófilos, apresenta temperatura ótima de crescimento entre 30º e 35ºC. Há bactérias termofílicas, como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus ssp.* que crescem bem entre 35º e 45ºC (FERREIRA, 2004). Poder-se-ia supor que na contagem obtida a 25ºC além da cultura lática composta por *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* ter-se-ia contabilizado também bactérias não provenientes da cultura lática, porém, estudos mostram que as bactérias láticas predominam a flora microbiana durante a maturação aproximadamente até o 56º dia, sendo que após este período elas se tornam inviáveis em decorrência da autólise celular e liberação de enzimas intracelulares na matriz do queijo (CROW et al., 1995, O´DONOVAN et al., 1996). Nas fases intermediárias e finais da maturação as bactérias não pertencentes à cultura lática tornam-se dominantes na flora microbiana do queijo (BERESFORD et al., 2001). Conforme apresentado nas Figuras de 12 a 15, a contagem microbiana a 25ºC foi maior que a 37ºC em todos os processamentos, sendo que este comportamento pode ser atribuído à adaptação seletiva da cultura lática, mostrando a importância da realização da análise microbiológica nas temperaturas citadas.

Tabela 4 – População de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* da cultura lática (antes da fabricação dos queijos) e nas amostras de queijo (durante o período de maturação), com incubações a 37ºC por 48 horas em aerobiose.

Dias	Processamentos			
	A	B	C	D
Cultura (UFC/ml)	$2,0 \times 10^{16\ d}$	$1,2 \times 10^{27\ a}$	$2,8 \times 10^{25\ b}$	$2,2 \times 10^{23\ c}$
1 (UFC/g)	$1,3 \times 10^{10\ E\ d}$	$1,3 \times 10^{11\ C\ a}$	$1,1 \times 10^{11\ C\ b}$	$9,0 \times 10^{10\ D\ c}$
15 (UFC/g)	$3,0 \times 10^{12\ D\ a}$	$8,0 \times 10^{11\ A\ c}$	$1,5 \times 10^{12\ A\ b}$	$2,0 \times 10^{11\ C\ d}$
30 (UFC/g)	$1,3 \times 10^{13\ C\ a}$	$1,5 \times 10^{11\ B\ d}$	$5,0 \times 10^{11\ B\ c}$	$2,5 \times 10^{12\ A\ b}$
45 (UFC/g)	$6,6 \times 10^{14\ A\ a}$	$7,5 \times 10^{13\ E\ b}$	$9,5 \times 10^{9\ D\ d}$	$1,3 \times 10^{12\ B\ a}$
60 (UFC/g)	$2,5 \times 10^{14\ B\ a}$	$1,4 \times 10^{10\ D\ c}$	$3,0 \times 10^{8\ E\ d}$	$3,6 \times 10^{10\ E\ b}$

a, b, c, d Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05);
A, B, C, D Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p>0,05).

A variação na população inicial de bactérias láticas da cultura utilizada na fabricação dos queijos a 25 e 37ºC provavelmente ocorreu devido à distribuição não uniforme da cultura nos frascos no momento da preparação e ao processo de congelamento. No momento de fabricação dos queijos estas variações foram consideradas e foi estabelecida a quantidade de 20ml de cultura para 25L de leite com a finalidade de minimizar estes problemas e garantir a ação da cultura.

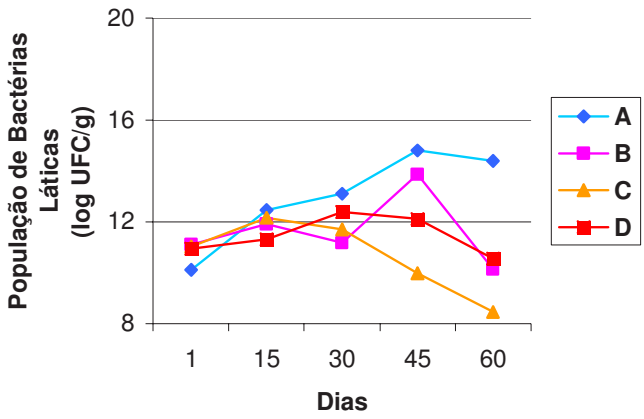


Figura 11 – População de microrganismos nas amostras de queijos a 37ºC.

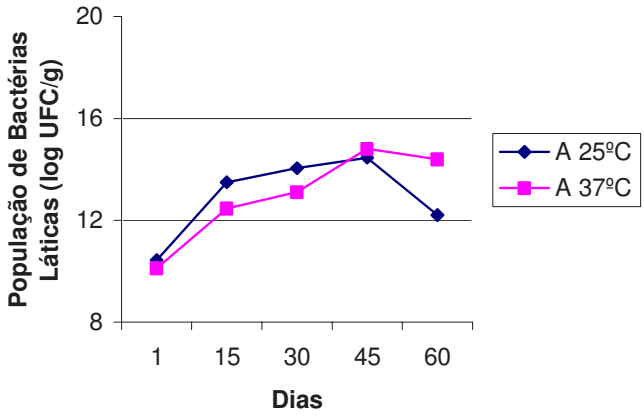


Figura 12 – População de microrganismos nas amostras de queijo do processamento A.

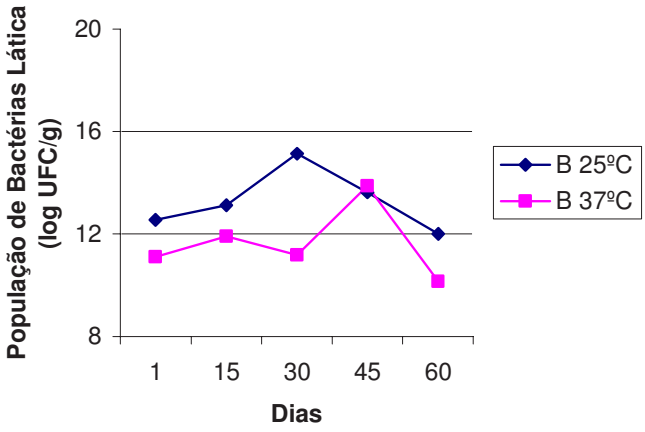


Figura 13 – População de microrganismos nas amostras de queijo do processamento B.

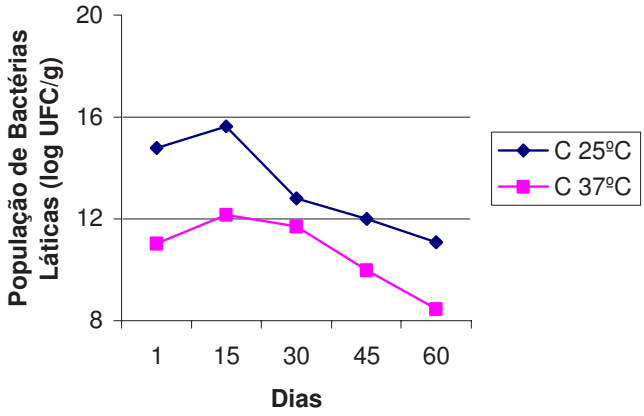


Figura 14 – População de microrganismos nas amostras de queijo do processamento C.

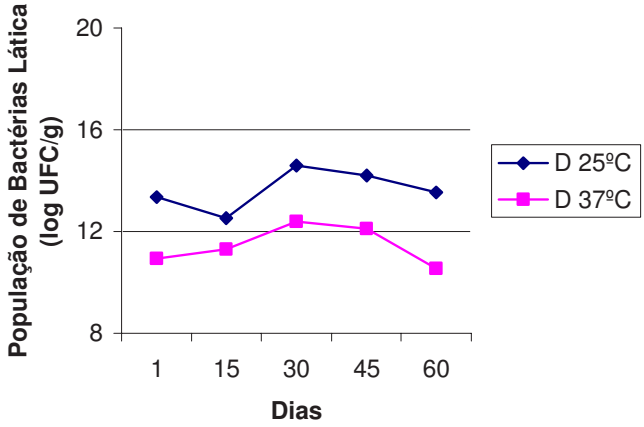


Figura 15 – População de microrganismos nas amostras de queijo do processamento D.

Em todos os processamentos observou-se comportamento do crescimento microbiano diferente do encontrado por Fontán et al. (2001), que analisando as mudanças microbiológicas em queijo "San Simon", estudaram o crescimento de bactérias láticas a 30ºC por 18-24 horas, no meio de cultura M17, o qual é seletivo para *Lactococcus*, e observaram que a maior contagem microbiana, analisando a parte interna e a superfície dos queijos, foi obtida na primeira e segunda semana de maturação, respectivamente.

A contagem inicial e o crescimento da cultura em todos os processamentos foram diferentes dos encontrados por Hynes et al. (2002), que estudando a influência da cultura iniciadora e da adjunta de *Lactobacillus* na maturação de queijo de coágulo lavado, realizaram a contagem de *Lactococcus* em M17 a 30ºC por 48 horas, e obtiveram contagem microbiana inicial de 10^9UFC/g e permanência deste valor até os 28 dias de maturação.

Segundo Fontán et al. (2001), o gênero *Lactococcus* é muito ativo metabolicamente, iniciando a fermentação da lactose e crescendo quantitativamente nos estágios iniciais do processo de maturação. A diminuição na contagem microbiana durante a maturação pode ser relacionada à baixa capacidade destes em competir com outras bactérias ácido-resistentes, como os *Lactobacillus*. Nas amostras de queijo Prato analisadas houve aumento no número de células microbianas nos estágios iniciais da maturação, provavelmente devido à alta quantidade de nutrientes a serem metabolizados e menor competição entre os microrganismos. A diminuição dos nutrientes e condições adversas, como o aumento da acidez, diminuição de oxigênio ou acúmulo de produtos tóxicos, promoveram a diminuição na contagem celular.

Observou-se que no processamento A, no qual não se utilizou enzima, o número de células viáveis começou a diminuir apenas aos 60 dias, diferente do que ocorreu nos processamentos B, C e D, em que se utilizou enzima. Este fato ocorreu provavelmente devido à ação da enzima, que sendo proteolítica, promoveu a degradação das proteínas mais rapidamente que a realizada pelas bactérias láticas, diminuindo assim, a quantidade de nutrientes disponível para o crescimento das mesmas ou gerando compostos tóxicos.

5.3 - Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas dos queijos Prato tradicionais e modificados estão apresentados na Tabela 5.

As possibilidades de contaminação em indústrias de laticínios são muitas, uma vez que o leite e seus derivados são alimentos propícios ao crescimento microbiano,

podendo provocar toxinfecções alimentares (PEREIRA et al., 1999). No Brasil, na RDC nº 12 (Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos) estão definidos os padrões para coliformes a 45ºC, Estafilococos coagulase positiva, *Salmonella ssp.* e *Listeria monocytogenes* em queijos (BRASIL, 2001).

Bactérias aeróbias mesófilas podem indicar que os queijos foram preparados com matérias-primas contaminadas, o processamento foi insatisfatório do ponto de vista sanitário e/ou que os alimentos foram estocados em condições inadequadas de tempo e temperatura (LEITE JUNIOR et al., 2000).

Tabela 5 - Resultados das análises microbiológicas dos queijos Prato tradicionais e modificados, no 1º dia de maturação.

Análises	**Processamentos**			
	A	**B**	**C**	**D**
Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)	$5,8 \times 10^{4}$ [c]	$5,8 \times 10^{7}$ [b]	$9,1 \times 10^{8}$ [a]	$5,7 \times 10^{3}$ [d]
Bolores e leveduras (UFC/g)	$7,3 \times 10^{5}$ [c]	$1,4 \times 10^{6}$ [b]	$6,5 \times 10^{4}$ [d]	$4,2 \times 10^{7}$ [a]
Estafilococos coagulase positiva/g	< 100 [c]	$1,0 \times 10^{3}$ [a]	< 100 [c]	$1,5 \times 10^{2}$ [b]
Coliformes a 30ºC (NMP /g)	43 [a]	11 [b]	< 3 [d]	07 [c]
Coliformes a 45ºC (NMP /g)	04 [b]	11 [a]	< 3 [c]	< 3 [c]
Escherichia coli	Presença	Presença	Ausência	Ausência
Salmonella ssp/25g	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Listeria monocytogenes/25g	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

[a, b, c, d] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Bolores e leveduras estão relacionados à má qualidade do produto e à maneira inadequada de armazenamento. Estes microrganismos podem causar alterações como aparência desagradável, descoloração, perda de sabor, além disso, são capazes de produzir micotoxinas (TANIWAKI; VAN DENDER, 1991).

Embora o queijo B tenha apresentado alta contagem de Estafilococos coagulase positiva, o valor encontra-se no limite estabelecido pela legislação. Assumpção et al. (2003) encontraram contagens de *Staphylococcus aureus* variando de <1 a $3,3 \times 10^{4}$ em queijo Prato. Segundo estes autores, a contaminação por *Staphylococcus aureus* ocorre

em várias etapas do processamento do queijo Prato, como no leite cru, devido às condições higiênico-sanitárias de sua obtenção, conservação e transporte, nas mãos e nos antebraços dos manipuladores, devido à manipulação sem boas práticas de fabricação, sendo que o não uso de luvas ou a sanitização inadequadas das mãos e antebraços podem ser motivos de elevadas contagens, além das embalagens. A redução de contaminação pode ser realizada mediante redução da manipulação dos alimentos, higiene dos manipuladores e adoção de boas práticas de fabricação.

Durante a fabricação dos queijos, apesar de terem sido tomados cuidados com a higiene pessoal (o uso de luvas, toucas e aventais) e dos equipamentos (lavagem e sanitização com solução clorada), o ambiente da planta piloto não permitiu a ausência ou baixas contagens dos microrganismos. A área da planta piloto é de 750 m^2, sem divisórias, há circulação de alunos e funcionários e não há sistema de filtração do ar, condições que favoreceram as contaminações nos processamentos A e B. Cuidados adicionais foram tomados para minimizar o problema nos processamentos C e D.

Todos os queijos analisados estão de acordo com a legislação, que permite o valor máximo de 10^3 para NMP de coliformes a 45ºC. Coliformes são indicadores de condições higiênico-sanitárias inadequadas, sendo que o principal microrganismo representante dos coliformes a 45ºC (fecais) é a *Escherichia coli*, que se apresentou presente nos queijos A e B, mostrando uma falha na legislação que exige apenas a enumeração de coliformes fecais e não a identificação deste microrganismo.

Os principais microrganismos causadores de toxinfecções alimentares são *Staphylococcus aureus*, *Salmonella ssp.* e *Listeria monocytogenes*. Nas análises realizadas observou-se ausência de *Salmonella ssp.* e de *Listeria monocytogenes* em todos os queijos, mostrando que estão de acordo com a legislação.

5.4 – Resultados da caracterização físico-química dos queijos tradicionais e modificados

Os resultados da caracterização físico-química dos queijos tradicionais e modificados estão apresentados nas Tabelas de 6 a 13.

Tabela 6 - Caracterização físico–química das amostras dos queijos tradicionais (Processamento A – sem adição de enzima) durante a maturação.

Análises	Dias 1	15	30	45	60
Extrato seco total %	$54,31^{c} \pm 0,15$	$56,56^{b} \pm 0,07$	$57,07^{ab} \pm 0,66$	$57,40^{a} \pm 0,13$	$56,74^{ab} \pm 0,05$
Acidez %	$0,60^{e} \pm 0,01$	$0,97^{c} \pm 0,01$	$1,17^{b} \pm 0,01$	$1,37^{a} \pm 0,01$	$0,88^{d} \pm 0,02$
Gordura %	$18,5^{c} \pm 0,0$	$18,0^{d} \pm 0,0$	$19,5^{a} \pm 0,0$	$19,0^{b} \pm 0,0$	$19,0^{b} \pm 0,0$
GES %	$34,1^{a} \pm 0,1$	$31,8^{c} \pm 0,0$	$34,2^{a} \pm 0,4$	$33,1^{b} \pm 0,1$	$33,5^{b} \pm 0,0$
Cinzas %	$4,56^{a} \pm 0,05$	$4,38^{b} \pm 0,07$	$4,25^{c} \pm 0,01$	$4,19^{cd} \pm 0,03$	$4,10^{d} \pm 0,02$
Nitrogênio %	$4,48^{d} \pm 0,00$	$4,65^{bc} \pm 0,02$	$4,69^{b} \pm 0,02$	$4,77^{a} \pm 0,03$	$4,60^{c} \pm 0,04$
Proteína total %	$28,00^{d} \pm 0,01$	$29,05^{bc} \pm 0,14$	$29,33^{b} \pm 0,14$	$29,80^{a} \pm 0,17$	$28,75^{c} \pm 0,24$
NS pH 4,6 %	$0,16^{e} \pm 0,00$	$0,35^{d} \pm 0,00$	$0,43^{c} \pm 0,01$	$0,57^{b} \pm 0,01$	$0,62^{a} \pm 0,01$
NS TCA %	$0,11^{e} \pm 0,01$	$0,24^{d} \pm 0,00$	$0,32^{c} \pm 0,01$	$0,44^{b} \pm 0,01$	$0,69^{a} \pm 0,01$
IEM %	$3,56^{e} \pm 0,10$	$7,59^{d} \pm 0,05$	$9,17^{c} \pm 0,29$	$11,99^{b} \pm 0,22$	$13,59^{a} \pm 0,18$
IPM %	$2,42^{e} \pm 0,14$	$5,11^{d} \pm 0,05$	$6,85^{c} \pm 0,10$	$9,15^{b} \pm 0,11$	$14,92^{a} \pm 0,18$
Tirosina (mg/100 g queijo)	$226,60^{d} \pm 1,76$	$276,13^{b} \pm 1,37$	$260,81^{c} \pm 0,86$	$273,17^{b} \pm 0,61$	$349,99^{a} \pm 0,19$
Triptofano (mg/100 g queijo)	$34,83^{d} \pm 0,03$	$27,21^{e} \pm 0,36$	$64,56^{b} \pm 0,02$	$50,20^{c} \pm 0,18$	$72,53^{a} \pm 0,17$
Sal %	$1,06^{a} \pm 0,06$	$0,73^{b} \pm 0,02$	$0,66^{bc} \pm 0,01$	$0,54^{d} \pm 0,01$	$0,59^{cd} \pm 0,03$
a_w	$0,96^{a} \pm 0,00$	$0,96^{a} \pm 0,00$	$0,97^{a} \pm 0,00$	$0,97^{a} \pm 0,00$	$0,97^{a} \pm 0,00$

[a, b, c, d, e] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). GES: gordura no extrato seco; NS pH 4,6: nitrogênio solúvel em pH 4,6; NS TCA: nitrogênio solúvel em TCA 12%; a_w: atividade de água; IEM: índice de extensão da maturação; IPM: índice de profundidade da maturação.

Tabela 7 - Caracterização físico–química das amostras dos queijos modificados (Processamento B – adição de enzima com atividade total de 607.500 U.) durante a maturação.

Análises	Dias 1	15	30	45	60
Extrato seco total %	56,73^{a} ± 0,13	54,12^{d} ± 0,0,6	55,69^{b} ± 0,08	55,04^{c} ± 0,08	55,05^{c} ± 0,06
Acidez %	0,58^{e} ± 0,00	0,78^{d} ± 0,00	0,89^{c} ± 0,01	1,29^{b} ± 0,11	1,47^{a} ± 0,24
Gordura %	17,0^{a} ± 0,0	17,0^{a} ± 0,0	16,5^{b} ± 0,0	17,0^{a} ± 0,0	16,5^{b} ± 0,0
GES %	29,9^{c} ± 0,1	31,4^{a} ± 0,0	29,6^{d} ± 0,0	30,9^{b} ± 0,0	29,9^{c} ± 0,0
Cinzas %	4,38^{ab} ± 0,02	4,16^{c} ± 0,03	4,40^{ab} ± 0,03	4,25^{bc} ± 0,00	4,45^{a} ± 0,13
Nitrogênio %	4,76^{a} ± 0,07	4,73^{a} ± 0,03	4,81^{a} ± 0,03	4,89^{a} ± 0,09	4,89^{a} ± 0,07
Proteína total %	29,72^{a} ± 0,44	29,54^{a} ± 0,17	30,09^{a} ± 0,17	30,56^{a} ± 0,58	30,57^{a} ± 0,45
NS pH 4,6 %	0,18^{e} ± 0,00	0,48^{d} ± 0,01	0,63^{c} ± 0,01	0,75^{b} ± 0,01	0,88^{a} ± 0,02
NS TCA %	0,10^{e} ± 0,00	0,30^{d} ± 0,00	0,39^{c} ± 0,00	0,50^{b} ± 0,00	0,59^{a} ± 0,00
IEM %	3,84^{e} ± 0,06	10,20^{d} ± 0,20	13,10^{c} ± 0,25	15,26^{b} ± 0,22	17,94^{a} ± 0,12
IPM %	2,06^{e} ± 0,01	6,27^{d} ± 0,09	8,02^{c} ± 0,04	10,13^{b} ± 0,28	12,11^{a} ± 0,17
Tirosina (mg/100 g queijo)	238,34^{e} ± 1,64	245,92^{d} ± 0,69	313,51^{c} ± 0,00	330,67^{b} ± 0,00	357,02^{a} ± 0,00
Triptofano (mg/100 g queijo)	57,39^{e} ± 0,32	65,39^{d} ± 0,18	82,71^{c} ± 0,00	86,87^{b} ± 0,00	105,36^{a} ± 0,00
Sal %	0,54^{c} ± 0,02	0,56^{bc} ± 0,01	0,58^{ab} ± 0,00	0,57^{ab} ± 0,00	0,60^{a} ± 0,02
a_w	0,98^{a} ± 0,00	0,98^{a} ± 0,00	0,98^{a} ± 0,00	0,97^{b} ± 0,00	0,97^{b} ± 0,00

$^{a, b, c, d, e}$ Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05). GES: gordura no extrato seco; NS pH 4,6: nitrogênio solúvel em pH 4,6; NS TCA: nitrogênio solúvel em TCA 12%; aw: atividade de água; IEM: índice de extensão da maturação; IPM: índice de profundidade da maturação.

Tabela 8 - Caracterização físico–química das amostras dos queijos modificados (Processamento C – adição de enzima com atividade total de 1.395.000 U.) durante a maturação.

Análises	Dias 1	15	30	45	60
Extrato seco total %	$54,47^{c} \pm 0,83$	$55,73^{b} \pm 0,04$	$57,61^{a} \pm 0,34$	$55,50^{bc} \pm 0,07$	$56,24^{b} \pm 0,19$
Acidez %	$0,49^{e} \pm 0,01$	$0,79^{d} \pm 0,01$	$1,05^{c} \pm 0,19$	$1,28^{b} \pm 0,01$	$1,76^{a} \pm 0,01$
Gordura %	$16,0^{a} \pm 0,0$	$16,0^{a} \pm 0,0$	$16,0^{a} \pm 0,0$	$16,0^{a} \pm 0,0$	$16,0^{a} \pm 0,0$
GES %	$29,4^{a} \pm 0,5$	$28,7^{b} \pm 0,2$	$27,8^{c} \pm 0,2$	$28,8^{ab} \pm 0,0$	$28,5^{b} \pm 0,1$
Cinzas %	$4,14^{d} \pm 0,02$	$4,20^{c} \pm 0,04$	$4,36^{b} \pm 0,01$	$4,48^{a} \pm 0,02$	$4,37^{b} \pm 0,01$
Nitrogênio %	$4,82^{b} \pm 0,07$	$4,81^{c} \pm 0,04$	$4,93^{ab} \pm 0,06$	$5,01^{ab} \pm 0,03$	$5,18^{a} \pm 0,20$
Proteína total %	$30,14^{b} \pm 0,44$	$30,08^{b} \pm 0,26$	$30,81^{ab} \pm 0,36$	$31,34^{ab} \pm 0,17$	$33,05^{a} \pm 0,20$
NS pH 4,6 %	$0,18^{e} \pm 0,01$	$0,38^{d} \pm 0,01$	$0,57^{c} \pm 0,01$	$0,70^{b} \pm 0,00$	$0,80^{a} \pm 0,02$
NS TCA %	$0,10^{e} \pm 0,00$	$0,27^{d} \pm 0,00$	$0,39^{c} \pm 0,00$	$0,49^{b} \pm 0,01$	$0,59^{a} \pm 0,00$
IEM %	$3,81^{e} \pm 0,10$	$7,96^{d} \pm 0,16$	$11,59^{c} \pm 0,12$	$14,05^{b} \pm 0,17$	$15,45^{a} \pm 0,48$
IPM %	$2,13^{e} \pm 0,02$	$5,64^{d} \pm 0,08$	$7,97^{c} \pm 0,08$	$9,69^{b} \pm 0,27$	$11,49^{a} \pm 0,44$
Tirosina (mg/100 g queijo)	$261,35^{e} \pm 0,00$	$296,57^{d} \pm 0,00$	$300,86^{c} \pm 0,00$	$341,70^{b} \pm 0,00$	$396,78^{a} \pm 0,00$
Triptofano (mg/100 g queijo)	$46,11^{e} \pm 0,18$	$60,29^{d} \pm 0,00$	$70,75^{c} \pm 0,00$	$73,20^{b} \pm 0,00$	$71,89^{a} \pm 0,00$
Sal %	$0,47^{c} \pm 0,03$	$0,46^{c} \pm 0,00$	$0,64^{a} \pm 0,00$	$0,64^{a} \pm 0,00$	$0,57^{b} \pm 0,00$
a_w	$0,98^{a} \pm 0,00$	$0,98^{a} \pm 0,00$	$0,97^{b} \pm 0,00$	$0,97^{b} \pm 0,00$	$0,97^{b} \pm 0,00$

[a, b, c, d, e] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). GES: gordura no extrato seco; NS pH 4,6: nitrogênio solúvel em pH 4,6; NS TCA: nitrogênio solúvel em TCA 12%; a_w: atividade de água; IEM: índice de extensão da maturação; IPM: índice de profundidade da maturação.

Tabela 9 - Caracterização físico–química das amostras dos queijos modificados (Processamentos D – adição de enzima com atividade total de 1.822.500 U.) durante a maturação.

Análises	Dias 1	15	30	45	60
Extrato seco total %	$56,34^{e} \pm 0,03$	$56,87^{d} \pm 0,18$	$59,35^{b} \pm 0,12$	$59,71^{a} \pm 0,16$	$58,31^{c} \pm 0,02$
Acidez %	$0,77^{c} \pm 0,18$	$0,78^{c} \pm 0,00$	$0,96^{b} \pm 0,19$	$1,27^{a} \pm 0,00$	$1,33^{a} \pm 0,00$
Gordura %	$18,5^{c} \pm 0,0$	$19,0^{b} \pm 0,0$	$19,0^{b} \pm 0,0$	$18,5^{c} \pm 0,0$	$19,5^{a} \pm 0,0$
GES %	$32,8^{b} \pm 0,0$	$33,4^{a} \pm 0,1$	$32,0^{c} \pm 0,1$	$30,7^{d} \pm 0,1$	$33,4^{a} \pm 0,0$
Cinzas %	$4,74^{a} \pm 0,02$	$4,51^{bc} \pm 0,03$	$4,39^{d} \pm 0,01$	$4,57^{b} \pm 0,01$	$4,47^{c} \pm 0,03$
Nitrogênio %	$4,88^{ab} \pm 0,06$	$4,72^{b} \pm 0,07$	$5,05^{a} \pm 0,06$	$4,71^{b} \pm 0,03$	$4,89^{ab} \pm 0,11$
Proteína total %	$30,48^{ab} \pm 0,36$	$29,51^{b} \pm 0,41$	$31,56^{a} \pm 0,36$	$29,45^{b} \pm 0,19$	$30,55^{ab} \pm 0,70$
NS pH 4,6 %	$0,18^{e} \pm 0,00$	$0,37^{d} \pm 0,00$	$0,49^{c} \pm 0,00$	$0,60^{b} \pm 0,00$	$0,73^{a} \pm 0,00$
NS TCA %	$0,11^{e} \pm 0,01$	$0,24^{d} \pm 0,01$	$0,36^{c} \pm 0,02$	$0,44^{b} \pm 0,01$	$0,52^{a} \pm 0,01$
IEM %	$3,64^{e} \pm 0,07$	$7,74^{d} \pm 0,13$	$9,73^{c} \pm 0,21$	$12,81^{b} \pm 0,14$	$14,94^{a} \pm 0,29$
IPM %	$2,18^{e} \pm 0,09$	$4,99^{d} \pm 0,25$	$7,16^{c} \pm 0,38$	$9,26^{b} \pm 0,14$	$10,61^{a} \pm 0,22$
Tirosina (mg/100 g queijo)	$228,07^{d} \pm 0,43$	$262,92^{b} \pm 0,00$	$264,23^{b} \pm 0,00$	$253,84^{c} \pm 0,32$	$274,35^{a} \pm 0,00$
Triptofano (mg/100 g queijo)	$49,92^{d} \pm 0,03$	$40,51^{e} \pm 0,31$	$67,38^{a} \pm 0,53$	$63,09^{c} \pm 0,47$	$65,96^{b} \pm 0,01$
Sal %	$0,89^{a} \pm 0,02$	$0,73^{b} \pm 0,01$	$0,65^{c} \pm 0,02$	$0,72^{bc} \pm 0,02$	$0,67^{bc} \pm 0,05$
a_w	$0,96^{a} \pm 0,00$	$0,97^{a} \pm 0,00$	$0,96^{a} \pm 0,00$	$0,97^{a} \pm 0,00$	$0,97^{a} \pm 0,00$

[a, b, c, d, e] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). GES: gordura no extrato seco; NS pH 4,6: nitrogênio solúvel em pH 4,6; NS TCA: nitrogênio solúvel em TCA 12%; a_w: atividade de água; IEM: índice de extensão da maturação; IPM: índice de profundidade da maturação.

Tabela 10 – Comparação entre as características físico–químicas das amostras dos queijos dos diferentes processamentos.

Análises		Dias 1	15	30	45	60
Extrato seco total %	A	$54,31^{B} \pm 0,15$	$56,56^{A} \pm 0,07$	$57,07^{B} \pm 0,66$	$57,40^{B} \pm 0,13$	$56,74^{B} \pm 0,05$
	B	$56,73^{A} \pm 0,13$	$54,12^{C} \pm 0,06$	$55,69^{C} \pm 0,08$	$55,04^{D} \pm 0,08$	$55,05^{D} \pm 0,06$
	C	$54,47^{B} \pm 0,83$	$55,73^{B} \pm 0,04$	$57,61^{B} \pm 0,34$	$55,50^{C} \pm 0,07$	$56,24^{C} \pm 0,19$
	D	$56,34^{A} \pm 0,03$	$56,87^{A} \pm 0,18$	$59,35^{A} \pm 0,12$	$59,71^{A} \pm 0,16$	$58,31^{A} \pm 0,02$
Acidez %	A	$0,60^{B} \pm 0,01$	$0,97^{A} \pm 0,01$	$1,17^{A} \pm 0,01$	$1,37^{A} \pm 0,01$	$0,88^{D} \pm 0,02$
	B	$0,58^{B} \pm 0,00$	$0,78^{B} \pm 0,00$	$0,89^{C} \pm 0,01$	$1,29^{B} \pm 0,11$	$1,47^{B} \pm 0,24$
	C	$0,49^{C} \pm 0,01$	$0,79^{B} \pm 0,01$	$1,05^{B} \pm 0,19$	$1,28^{BC} \pm 0,01$	$1,76^{A} \pm 0,01$
	D	$0,77^{A} \pm 0,18$	$0,78^{B} \pm 0,00$	$0,96^{C} \pm 0,19$	$1,27^{C} \pm 0,00$	$1,33^{C} \pm 0,00$
Gordura %	A	$18,5^{A} \pm 0,0$	$18,0^{B} \pm 0,0$	$19,5^{A} \pm 0,0$	$19,0^{A} \pm 0,0$	$19,0^{B} \pm 0,0$
	B	$17,0^{B} \pm 0,0$	$17,0^{C} \pm 0,0$	$16,5^{C} \pm 0,0$	$17,0^{C} \pm 0,0$	$16,5^{C} \pm 0,0$
	C	$16,0^{C} \pm 0,0$	$16,0^{D} \pm 0,0$	$16,0^{D} \pm 0,0$	$16,0^{D} \pm 0,0$	$16,0^{D} \pm 0,0$
	D	$18,5^{A} \pm 0,0$	$19,0^{A} \pm 0,0$	$19,0^{B} \pm 0,0$	$18,5^{B} \pm 0,0$	$19,5^{A} \pm 0,0$
GES %	A	$34,1^{A} \pm 0,1$	$31,8^{B} \pm 0,0$	$34,2^{A} \pm 0,4$	$33,1^{A} \pm 0,1$	$33,5^{A} \pm 0,0$
	B	$29,9^{C} \pm 0,1$	$31,4^{C} \pm 0,0$	$29,6^{C} \pm 0,0$	$30,9^{B} \pm 0,0$	$29,9^{B} \pm 0,1$
	C	$29,4^{C} \pm 0,5$	$28,7^{D} \pm 0,2$	$27,8^{D} \pm 0,2$	$28,8^{D} \pm 0,0$	$28,5^{C} \pm 0,1$
	D	$32,8^{B} \pm 0,0$	$33,4^{A} \pm 0,1$	$32,0^{B} \pm 0,1$	$30,7^{C} \pm 0,1$	$33,4^{A} \pm 0,0$

$^{A, B, C, D}$ Letras iguais na mesma coluna, para as mesmas análises, não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). GES: gordura no extrato seco. Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de 4 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de 20 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de 12 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.822.500 U.

Tabela 11 – Comparação entre as características físico–químicas das amostras dos queijos dos diferentes processamentos (continuação).

Análises		Dias 1	15	30	45	60
Cinzas %	A	$4,56^{B} \pm 0,05$	$4,38^{B} \pm 0,07$	$4,25^{B} \pm 0,01$	$4,19^{D} \pm 0,03$	$4,10^{B} \pm 0,02$
	B	$4,38^{C} \pm 0,02$	$4,16^{C} \pm 0,03$	$4,40^{A} \pm 0,03$	$4,25^{C} \pm 0,00$	$4,45^{A} \pm 0,13$
	C	$4,14^{D} \pm 0,02$	$4,20^{C} \pm 0,04$	$4,36^{A} \pm 0,01$	$4,48^{B} \pm 0,02$	$4,37^{A} \pm 0,01$
	D	$4,74^{A} \pm 0,02$	$4,51^{A} \pm 0,03$	$4,39^{A} \pm 0,01$	$4,57^{A} \pm 0,01$	$4,47^{A} \pm 0,03$
Nitrogênio %	A	$4,48^{B} \pm 0,00$	$4,65^{B} \pm 0,02$	$4,69^{D} \pm 0,02$	$4,77^{C} \pm 0,03$	$4,60^{B} \pm 0,04$
	B	$4,76^{A} \pm 0,07$	$4,73^{AB} \pm 0,03$	$4,81^{C} \pm 0,03$	$4,89^{BC} \pm 0,09$	$4,89^{AB} \pm 0,07$
	C	$4,82^{A} \pm 0,07$	$4,81^{A} \pm 0,04$	$4,93^{B} \pm 0,06$	$5,01^{AB} \pm 0,03$	$5,18^{A} \pm 0,20$
	D	$4,88^{A} \pm 0,06$	$4,72^{AB} \pm 0,07$	$5,05^{A} \pm 0,06$	$4,71^{A} \pm 0,03$	$4,89^{AB} \pm 0,11$
Proteína total %	A	$28,00^{B} \pm 0,01$	$29,05^{B} \pm 0,14$	$29,33^{C} \pm 0,14$	$29,80^{BC} \pm 0,17$	$28,75^{B} \pm 0,24$
	B	$29,72^{A} \pm 0,44$	$29,54^{AB} \pm 0,17$	$30,09^{BC} \pm 0,17$	$30,56^{AB} \pm 0,58$	$30,57^{AB} \pm 0,45$
	C	$30,14^{A} \pm 0,44$	$30,08^{A} \pm 0,26$	$30,81^{B} \pm 0,36$	$31,34^{A} \pm 0,17$	$33,05^{A} \pm 0,20$
	D	$30,48^{A} \pm 0,36$	$29,51^{AB} \pm 0,41$	$31,56^{A} \pm 0,36$	$29,45^{C} \pm 0,19$	$30,55^{AB} \pm 0,70$
NS pH 4,6 %	A	$0,16^{B} \pm 0,00$	$0,35^{C} \pm 0,00$	$0,43^{D} \pm 0,01$	$0,57^{D} \pm 0,01$	$0,62^{D} \pm 0,01$
	B	$0,18^{A} \pm 0,00$	$0,48^{A} \pm 0,01$	$0,63^{A} \pm 0,01$	$0,75^{A} \pm 0,01$	$0,88^{A} \pm 0,02$
	C	$0,18^{A} \pm 0,01$	$0,38^{B} \pm 0,01$	$0,57^{B} \pm 0,01$	$0,70^{B} \pm 0,00$	$0,80^{B} \pm 0,02$
	D	$0,18^{A} \pm 0,00$	$0,37^{C} \pm 0,00$	$0,49^{C} \pm 0,00$	$0,60^{C} \pm 0,00$	$0,73^{C} \pm 0,00$

$^{A, B, C, D}$ Letras iguais na mesma coluna, para as mesmas análises, não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). NS pH 4,6: nitrogênio solúvel em pH 4,6. Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de 4 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de 20 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de 12 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.822.500 U.

Tabela 12 – Comparação entre as características físico–químicas das amostras dos queijos dos diferentes processamentos (continuação).

Análises		Dias 1	15	30	45	60
NS TCA %	A	$0,11^{A} \pm 0,01$	$0,24^{C} \pm 0,00$	$0,32^{C} \pm 0,01$	$0,44^{B} \pm 0,01$	$0,69^{A} \pm 0,01$
	B	$0,10^{A} \pm 0,00$	$0,30^{A} \pm 0,00$	$0,39^{A} \pm 0,00$	$0,50^{A} \pm 0,00$	$0,59^{B} \pm 0,00$
	C	$0,10^{A} \pm 0,00$	$0,27^{B} \pm 0,00$	$0,39^{A} \pm 0,00$	$0,49^{B} \pm 0,01$	$0,59^{B} \pm 0,00$
	D	$0,11^{A} \pm 0,01$	$0,24^{C} \pm 0,01$	$0,36^{B} \pm 0,02$	$0,44^{B} \pm 0,01$	$0,52^{C} \pm 0,01$
IEM %	A	$3,56^{B} \pm 0,10$	$7,59^{B} \pm 0,05$	$9,17^{C} \pm 0,29$	$11,99^{C} \pm 0,22$	$13,59^{C} \pm 0,18$
	B	$3,84^{A} \pm 0,06$	$10,20^{A} \pm 0,20$	$13,10^{A} \pm 0,25$	$15,26^{A} \pm 0,22$	$17,94^{A} \pm 0,12$
	C	$3,81^{A} \pm 0,10$	$7,96^{B} \pm 0,16$	$11,59^{B} \pm 0,12$	$14,05^{A} \pm 0,17$	$15,45^{B} \pm 0,48$
	D	$3,64^{AB} \pm 0,07$	$7,74^{B} \pm 0,13$	$9,73^{C} \pm 0,21$	$12,81^{B} \pm 0,14$	$14,94^{B} \pm 0,29$
IPM %	A	$2,42^{A} \pm 0,14$	$5,11^{C} \pm 0,05$	$6,85^{B} \pm 0,10$	$9,15^{B} \pm 0,11$	$14,92^{A} \pm 0,18$
	B	$2,06^{B} \pm 0,01$	$6,27^{A} \pm 0,09$	$8,02^{A} \pm 0,04$	$10,13^{A} \pm 0,28$	$12,11^{B} \pm 0,17$
	C	$2,13^{B} \pm 0,02$	$5,64^{B} \pm 0,08$	$7,97^{A} \pm 0,08$	$9,69^{AB} \pm 0,27$	$11,49^{B} \pm 0,44$
	D	$2,18^{B} \pm 0,09$	$4,99^{C} \pm 0,25$	$7,16^{B} \pm 0,38$	$9,26^{B} \pm 0,14$	$10,61^{C} \pm 0,22$

$^{A, B, C, D}$ Letras iguais na mesma coluna, para as mesmas análises, não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). NS TCA: nitrogênio solúvel em TCA 12%; IEM: índice de extensão da maturação; IPM: índice de profundidade da maturação. Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de 4 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de 20 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de 12 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.822.500 U.

Tabela 13 – Comparação entre as características físico–químicas das amostras dos queijos dos diferentes processamentos (continuação).

Análises		Dias 1	15	30	45	60
Tirosina (mg/100 g queijo)	A	$226,60^{C} \pm 1,76$	$276,13^{B} \pm 1,37$	$260,81^{C} \pm 0,86$	$273,17^{C} \pm 0,61$	$349,99^{C} \pm 0,19$
	B	$238,34^{B} \pm 1,64$	$245,92^{D} \pm 0,69$	$313,51^{A} \pm 0,00$	$330,67^{B} \pm 0,00$	$357,02^{B} \pm 0,00$
	C	$261,35^{A} \pm 0,00$	$296,57^{A} \pm 0,00$	$300,86^{B} \pm 0,00$	$341,70^{A} \pm 0,00$	$396,78^{A} \pm 0,00$
	D	$228,07^{C} \pm 0,43$	$262,92^{C} \pm 0,00$	$264,23^{C} \pm 0,00$	$253,84^{D} \pm 0,32$	$274,35^{D} \pm 0,00$
Triptofano (mg/100 g queijo)	A	$34,83^{D} \pm 0,03$	$27,21^{D} \pm 0,36$	$64,56^{D} \pm 0,02$	$50,20^{D} \pm 0,18$	$72,53^{B} \pm 0,17$
	B	$57,39^{A} \pm 0,32$	$65,39^{A} \pm 0,18$	$82,71^{A} \pm 0,00$	$86,87^{A} \pm 0,00$	$105,36^{A} \pm 0,00$
	C	$46,11^{C} \pm 0,18$	$60,29^{B} \pm 0,00$	$70,75^{B} \pm 0,00$	$73,20^{B} \pm 0,00$	$71,89^{C} \pm 0,00$
	D	$49,92^{B} \pm 0,03$	$40,51^{C} \pm 0,31$	$67,38^{C} \pm 0,53$	$63,09^{C} \pm 0,47$	$65,96^{D} \pm 0,01$
Sal %	A	$1,06^{A} \pm 0,06$	$0,73^{A} \pm 0,02$	$0,66^{A} \pm 0,01$	$0,54^{D} \pm 0,01$	$0,59^{AB} \pm 0,03$
	B	$0,54^{C} \pm 0,02$	$0,56^{B} \pm 0,01$	$0,58^{B} \pm 0,00$	$0,57^{C} \pm 0,00$	$0,60^{AB} \pm 0,02$
	C	$0,47^{C} \pm 0,03$	$0,46^{C} \pm 0,00$	$0,64^{A} \pm 0,00$	$0,64^{B} \pm 0,00$	$0,57^{B} \pm 0,00$
	D	$0,89^{B} \pm 0,02$	$0,73^{A} \pm 0,01$	$0,65^{A} \pm 0,02$	$0,72^{A} \pm 0,02$	$0,67^{A} \pm 0,05$
a_w	A	$0,96^{B} \pm 0,00$	$0,96^{C} \pm 0,00$	$0,97^{B} \pm 0,00$	$0,97^{A} \pm 0,00$	$0,97^{A} \pm 0,00$
	B	$0,98^{A} \pm 0,00$	$0,98^{A} \pm 0,00$	$0,98^{A} \pm 0,00$	$0,97^{A} \pm 0,00$	$0,97^{A} \pm 0,00$
	C	$0,98^{A} \pm 0,00$	$0,98^{A} \pm 0,00$	$0,97^{B} \pm 0,00$	$0,97^{A} \pm 0,00$	$0,97^{A} \pm 0,00$
	D	$0,96^{B} \pm 0,00$	$0,97^{B} \pm 0,00$	$0,96^{C} \pm 0,00$	$0,97^{A} \pm 0,00$	$0,97^{A} \pm 0,00$

$^{A, B, C, D}$ Letras iguais na mesma coluna, para as mesmas análises, não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). a_w: atividade de água. Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de 4 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de 20 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de 12 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.822.500 U.

Extrato seco total

Todos os queijos analisados estão de acordo com a legislação que classifica o queijo Prato como de média umidade (36 a 46%), devendo apresentar, portanto, o conteúdo de extrato seco total variando de 54 a 64% (BRASIL, 1997).

Observa-se que ocorreu variação entre os conteúdos de extrato seco total entre os diferentes processamentos no mesmo dia de maturação e entre o mesmo processamento nos diferentes dias de maturação. As variações dos teores de umidade em um mesmo lote de queijo estão relacionadas a variações decorrentes da prensagem coletiva dos queijos (OLIVEIRA, 1986). Os queijos foram prensados uns sobre os outros, desta forma, os queijos que ficam embaixo recebem uma maior pressão sendo, portanto, mais desidratados. Visando minimizar esta diferença os queijos foram invertidos de posição após 30 minutos da primeira prensagem. Há também a falta de uniformidade na distribuição da massa nas formas, embora se tente deixar os queijos com uma mesma altura, nem sempre isso é possível. A etapa de drenagem do soro foi padronizada para que sempre se retirasse a mesma quantidade de soro em todos os queijos fabricados visando, diminuir esta fonte de erros. Porém, o rendimento dos queijos varia conforme a época em que são fabricados, dependendo das características físico-químicas do leite utilizado, gerando diferentes quantidades de soro.

O conteúdo de extrato seco total, em geral, foi semelhante aos encontrados por Silva et al. (2005), 57,41% aos 30 dias e 56,03% aos 48 dias de maturação de queijo Prato "light", porém diferentes dos encontrados pelos mesmos autores para queijos Prato "light" comerciais, com valores de 47,11% e 49,51% aos 30 e 48 dias, respectivamente, e por Katsuda et al. (1999) em queijo Prato com baixo teor de gordura com 51,37% de extrato seco total no início da maturação.

Acidez

Em todos os processamentos os maiores teores de acidez foram observados aos 60 dias de maturação, exceto no processamento A. O aumento da acidez está

relacionado à glicólise, na qual a lactose é convertida em ácido lático pelas bactérias do fermento, sendo responsável pela produção de sabor e aroma do queijo (NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004). Do 15º ao 45º dia de maturação as amostras do queijo A apresentaram os maiores teores de acidez e as maiores populações de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* na cultura lática, a 37ºC, comparado aos outros processamentos, mostrando a relação entre o teor de acidez e o número de células viáveis. O teor de acidez pode variar também devido às diferenças da concentração de lactose no queijo, a qual depende da extensão da drenagem do soro (MORENO et al., 2002).

O comportamento crescente nos teores de acidez dos queijos B, C e D são semelhantes aos descritos por Silva et al. (2005), que encontraram variação de 0,62 a 0,81% para queijo Prato "light" comercial aos 30 e 48 dias de maturação, respectivamente, embora os teores de acidez observados neste experimento sejam superiores. Estudos com queijo Prato com teor integral de gordura também mostraram comportamento crescente do teor de acidez durante o período de maturação (CICHOSCKI et al., 2002, NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004, MORETTI; NABUCO; PENNA, 2004, SILVA et al., 2005). Porém, Drunkler; Katsuda; Drunkler (2004) observaram diminuição do teor de acidez durante a maturação em queijos com diferentes teores de caseína/gordura (C/G), sendo que os maiores teores de acidez, 0,82 e 0,51%, após 1 e 25 dias, respectivamente, foram obtidos com a maior relação C/G (3,53%).

O comportamento do teor de acidez durante a maturação do queijo A é semelhante ao descrito por Silva et al. (2005) quando estes analisaram queijo Prato "light" fabricado em planta piloto e encontraram variação de 1,33% para 1,23% do 30º para o 48º dia de maturação.

Gordura

Embora se tenha tentado padronizar o teor de gordura do leite, a variação de 1,3 a 1,5% deste parâmetro nos diferentes processamentos resultou na variação no teor de gordura dos produtos finais. O teor de gordura das amostras dos queijos variou de 16,0 a

19,5%, sendo que nas amostras dos processamentos A e D, em alguns dias de maturação, foram maiores que os encontrados por Katsuda et al. (1999), que obtiveram 18,6% em queijos com baixo teor de gordura e que os encontrados por Silva et al. (2005), que obtiveram 18,17% em queijo Prato "light" produzidos em planta piloto, aos 30 dias de maturação. Todos os teores de gordura analisados foram maiores que os encontrados por Silva et al. (2005) de 14,17%, em queijo Prato "light" comercias, aos 30 dias de maturação.

A falta de uniformidade na massa do queijo faz com que esta variação no teor de gordura ocorra em queijos do mesmo lote nos diferentes dias de maturação, conforme observado em vários estudos (CICHOSCKI et al., 2002, NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004, MORETTI; NABUCO; PENNA, 2004, DRUNKLER; KATSUDA; DRUNKLER, 2004, SILVA et al., 2005).

O queijo Prato integral é classificado como gordo por apresentar de 26 a 29% de gordura. Segundo o Regulamento Técnico Referente à Informação Nutricional Complementar (BRASIL, 1998), um produto para ser considerado "light" deve apresentar uma redução mínima de 25% em relação ao conteúdo comparativo de nutrientes. Analisando-se os maiores teores de gordura nas amostras dos queijos fabricados pelos processamentos A, B, C e D e comparando-os com o valor médio de um queijo integral (27,5%), estes apresentaram uma redução do teor de gordura de 29,09%; 38,18%; 41,81%; 29,09%, respectivamente, podendo, portanto, ser classificados como queijos "light".

Gordura no extrato seco (GES)

De acordo com a legislação (BRASIL, 1997) o queijo Prato tradicional deve apresentar de 45,0 a 59,9% de matéria gorda no extrato seco. Os valores encontrados nas amostras dos queijos analisados foram menores que os encontrados por Katsuda et al. (1999), que obtiveram 36,21%, e semelhantes aos encontrados por Silva et al. (2005), que variaram de 30,10 a 32,13%.

Como o teor de gordura no extrato seco está diretamente relacionado ao teor de gordura, durante todo o período de maturação o queijo C apresentou os menores

valores, pelo uso de leite padronizado a 1,3% de gordura. Os teores de GES encontrados nos diferentes processamentos permitem que estes sejam classificados, de acordo a legislação (BRASIL, 1996), como semigordos, que inclui queijos com matéria gorda no extrato seco entre 25,0 e 44,9%.

Cinzas

As amostras de queijo do processamento D foram as que apresentaram os maiores conteúdos de cinzas, o que pode ser justificado pelo elevado teor de extrato seco total. Estes valores são próximos ao relatado por Katsuda et al. (1999), que obtiveram 4,65% e por Silva et al. (2005), que observaram variação de 4,01 a 4,39% para queijo Prato "light" comercial. Entretanto, os valores obtidos diferiram dos encontrados para queijo Prato "light" produzido em planta piloto, cuja variação no teor de cinzas foi de 5,07 a 5,20%, no estudo de Silva et al., 2005.

O conteúdo de cinzas de um alimento corresponde ao resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO_2, H_2O e NO_2, sendo que em produtos lácteos é constituída principalmente por cálcio, fósforo, sódio, enxofre (CECCHI,1999). Em queijos, o teor de cinzas varia de 2,1 a 5,3% (VAN DENDER et al., 1986).

Nitrogênio

Os teores de nitrogênio observados foram maiores que a variação de 3,90 a 4,34% relatada por Silva et al. (2005), provavelmente pelo maior conteúdo de extrato seco total nos queijos deste trabalho.

A variação entre o conteúdo de nitrogênio total nos diferentes processamentos dos queijos (A, B, C e D) e nos diferentes dias de maturação pode ocorrer devido à falta de uniformidade da massa, às características físico-químicas do leite utilizado na fabricação dos produtos, entre outros fatores. Em diversos estudos com queijo Prato

observou-se a variação deste parâmetro entre os diferentes processamentos e/ou nos diferentes dias de maturação, sendo que se obtiveram valores mínimos e máximos de conteúdo de nitrogênio total de 3,21 e 4,67%, respectivamente (MORENO et al., 2002, LEITE; PITARELLO; PENNA, 2002, LEITE et al., 2004, GOROSTIZA et al., 2004, NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004, MORETTI; NABUCO; PENNA, 2004, DRUNKLER; KATSUDA; DRUNKLER, 2004, SILVA et al., 2005), menores que os encontrados neste trabalho.

A determinação do teor de nitrogênio total é importante, pois, por meio desta análise, juntamente com as de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12%, é possível analisar o índice de extensão da maturação e o índice de profundidade da maturação, respectivamente, acompanhando desta forma, o tipo de degradação resultante da ação das enzimas presentes no leite, das do coagulante, da cultura lática e das adicionadas.

Proteína total

O teor de proteína total variou de 28,00 a 33,05%. Segundo Banks (2004), a redução do conteúdo de gordura resulta em um aumento significativo no conteúdo de proteína. Os valores de proteína total foram maiores que os encontrados por Silva et al. (2005), que variaram de 24,39 a 26,33% e por Katsuda et al. (1999), de 27,85%, provavelmente devido à diferença nos teores de umidade dos queijos comparados.

Nitrogênio solúvel em pH 4,6

Em todos os processamentos, A, B, C e D, houve aumento no teor de NS pH 4,6 desde o primeiro dia de maturação, o que também foi observado em diversos estudos (KATSUDA et al., 1999, MORENO et al., 2002, NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004, MORETTI; NABUCO; PENNA, 2004, DRUNKLER; KATSUDA; DRUNKLER, 2004, SILVA et al., 2005). Porém, Gorostiza et al. (2004) observaram

que o teor de nitrogênio solúvel em pH 4,4 apresentou-se estável nas primeiras duas semanas e aumentou significativamente na fase final do processo de maturação em queijo Prato tradicional.

A adição de enzima aos queijos modificados promoveu, desde o primeiro dia de maturação, maiores teores de NS pH 4,6 que os obtidos no processamento A, sem adição de enzima. Na Tabela 6 pode-se observar que o valor de NS pH 4,6 da amostra do queijo A (controle) aos 60 dias de maturação foi menor que o obtido aos 30 dias de maturação no queijo B, mostrando que a adição de enzima promoveu a degradação protéica em peptídeos de peso molecular alto e médio, mais rapidamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Silva (1998), que encontrou valores de NS pH 4,6 maiores durante todo o período de maturação em todos os processamentos de queijo Prato em que se adicionaram enzimas, sendo que estes valores aumentaram durante a maturação.

A partir do 15º dia os maiores valores nitrogênio solúvel em pH 4,6 foram obtidos nas amostras do queijo B, e os menores, nas amostras do queijo D, ou seja, quanto maior a atividade enzimática, menor o teor de NS pH 4,6, o que pode ser explicado pela autólise enzimática nos primeiros dias de maturação. Quando enzimas proteolíticas apresentam alta atividade enzimática elas podem realizar autólise, onde umas "competem" com as outras pelo substrato, destruindo-se.

O teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 inclui os peptídeos de peso molecular alto e médio provenientes da α_{s1} e β-caseínas, podendo incluir peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos (CHRISTENSEN et al., 1991, citados por SILVA, 1998, FARKEY et al., 1990).

Nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12%

Observa-se que as amostras dos processamentos A e D apresentaram teores de NS TCA semelhantes do 1º ao 45º dia de maturação e ao 60º dia o valor encontrado para a amostra do queijo A apresentou-se maior em relação aos demais processamentos. Pode-se, por meio destes dados, estabelecer uma relação entre a degradação realizada pela enzima proteolítica adicionada aos queijos modificados e as naturais do leite, do

coagulante e da cultura lática. Ao 1º dia de maturação não houve diferença significativa entre os valores de NS TCA dos processamentos, mostrando a semelhança da ação das enzimas proteolíticas adicionadas e as naturais do queijo no início da maturação. As enzimas proteolíticas adicionadas apresentaram ação ligeiramente maior que as enzimas naturais do queijo, até o 45º dia de maturação, o que pode ser confirmado relacionando, por exemplo, o teor de NS TCA e a população de microrganismos da cultura mista a 37ºC, no qual os menores teores de nitrogênio solúvel em TCA foram obtidos nas amostras de queijo do processamento A, o qual apresentou maior população microbiana, porém não recebeu adição de enzima. Aos 60 dias de maturação os menores valores de NS TCA nas amostras dos queijos dos processamentos B, C e D podem ser explicados pela diminuição da capacidade de degradação de proteína em substâncias de baixo peso molecular pela enzima adicionada. No período citado, a ação das enzimas naturais do queijo foi maior que da enzima proteolítica adicionada, uma vez que a amostra do processamento A apresentou maior população de bactérias láticas do que as amostras dos processamentos dos queijos modificados B, C e D, no mesmo período da maturação. Portanto, em queijos sem adição de enzimas, a degradação protéica em substâncias de baixo peso molecular ocorreu devido à ação de enzimas naturais do queijo, como enzimas do leite, do coagulante e da cultura lática, porém, quando houve adição de enzimas exógenas, estas últimas "competiram" com as primeiras pelas proteínas durante a maior parte do período de maturação.

O teor de nitrogênio solúvel em TCA inclui 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 (SILVA, 1998).

Índice de extensão da maturação (IEM)

Os menores índices de extensão da maturação foram encontrados nas amostras dos queijos do processamento A, em que não houve adição de enzimas, e os maiores nas amostras do queijo do processamento B, com adição de enzimas com menor atividade enzimática.

Os IEMs até os 45 dias de maturação puderam ser relacionados ao conteúdo do aminoácido triptofano, sendo que os menores teores de triptofano refletiram em menores índices de extensão da maturação e os maiores teores do aminoácido nos maiores índices de extensão da maturação. O IEM obtido na amostra de queijo do processamento A aos 60 dias de maturação foi observado nas amostras dos queijos dos processamentos B e C aos 45 dias, mostrando que a adição da enzima proteolítica reduziu o tempo de maturação em 15 dias. Reforçando os resultados apresentados anteriormente, a atividade proteolítica da enzima adicionada foi maior que a da cultura lática, pois apesar da maior população microbiana nas amostras do queijo do processamento A, do 15º dia até o fim do período de maturação, a 37ºC, os índices de extensão da maturação não foram maiores.

Os valores dos índices de extensão da maturação obtidos foram superiores aos encontrados por Leite; Pitarello; Penna (2002) e Leite et al. (2004), para queijos integrais adicionados de enzimas, e Moretti; Nabuco; Penna (2004), Silva et al. (2005), para queijos com baixo teor de gordura, sem adição de enzima, porém inferiores aos obtidos por Silva (1998). De acordo com Van Derder et al. (1986), o índice de extensão da proteólise aumenta durante a maturação, conforme foi observado no presente trabalho e em estudos realizados por Moreno et al. (2002), Narimatsu et al. (2003), Gutierrez et al. (2004), Moretti; Nabuco; Penna (2004), Spadotti; Dornellas; Roig (2005).

Silva (1998) observou em processamentos de queijos Prato com adição de enzima Neutrase®, já no primeiro dia e durante todo o período de maturação, maiores índices de extensão da maturação que os fabricados sem adição de enzima.

O índice de extensão da maturação (IEM), obtido por meio da relação entre os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e de nitrogênio total (NT), é caracterizado pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis na fase aquosa dos queijos, resultantes da degradação da caseína pelo coalho e acumuladas durante a maturação, refletindo, portanto, a composição final e as características organolépticas do queijo. Por meio do IEM é possível entender melhor o índice de aproveitamento dos elementos do leite na coalhada, a atividade proteolítica do coalho, da cultura lática e das enzimas (SILVA, 1998).

Índice de profundidade da maturação (IPM)

O IPM variou de 2,06 a 14,92% durante a maturação. Aos 60 dias de maturação o maior índice de profundidade da maturação foi obtido na amostra de queijo do processamento A (controle) e o menor na amostra do processamento D. Este maior IPM pode estar relacionado à maior população de bactérias láticas nas amostras dos queijos deste processamento.

O índice de profundidade da maturação (IPM) é diretamente proporcional à ação de endo e exopeptidases bacterianas (descarboxilases e desaminases) que liberam aminoácidos e outros compostos nitrogenados de baixo peso molecular, como oligopeptídeos e aminas, sendo, portanto, importante para a avaliação da atividade peptidolítica da cultura lática (COSTA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998).

Com o uso de fastuosaína, foram observados maiores índices de profundidade da maturação do que os obtidos por Narimatsu et al. (2003), Leite et al. (2004), Moretti; Nabuco; Penna (2004), Spadotti; Dornellas; Roig (2005) e semelhantes aos obtidos por Leite; Pitarello; Penna (2002) e Moreno et al. (2002).

O comportamento do IPM durante a maturação foi diferente do encontrado por Silva (1998) para queijo Prato com adição de Neutrase®, em que durante todo o período de maturação, as amostras com enzima apresentaram valores de IPM mais elevados do que as fabricadas sem adição de enzima.

Aminoácido tirosina

Os maiores teores de tirosina foram obtidos nas amostras dos queijos dos processamentos em que houve adição de enzima proteolítica, semelhante ao encontrado por Silva (1998), onde o uso da enzima Neutrase® em queijo Prato promoveu maiores degradações na proteína com aumento dos teores de tirosina.

Os teores de tirosina foram maiores que os encontrados por Moreno et al. (2002), Nabuco; Moretti; Penna (2004), para queijo Prato sem adição de enzimas, cujos teores máximos foram de 129,98 e 48,06 mg/100 g de queijo, respectivamente, e por

Silva (1998), para queijo Prato com adição de enzimas, cujo teor máximo foi de 144,27 mg/100 g queijo.

Observou-se uma variação nos teores do aminoácido tirosina durante o período de maturação nas amostras de queijo em todos os processamentos. Essa variação ocorre devido a reações de desaminação, transaminação e descarboxilação onde os aminoácidos livres são hidrolisados e posteriormente resultam em ácidos graxos, aminas, aldeídos, álcoois e compostos sulfidrílicos, os quais apresentam propriedades flavorizantes responsáveis pelo desenvolvimento de sabor de origem proteolítica (SABIONI, 2000, PERRY, 2004, SILVA; MORENO; VAN DENDER, 2006).

O aumento do teor de aminoácidos em queijos está relacionado à proteólise que ocorre ao longo da maturação, onde a proteína é hidrolisada e libera aminoácidos. A tirosina pode ser liberada a partir da ação da quimosina sobre a β-caseína, entre a ligação leucina-tirosina (Leu192 – Tyr193) (VISSER, 1998).

Aminoácido triptofano

Os maiores teores de triptofano foram obtidos nas amostras do processamento B, provavelmente pela autólise enzimática ocorrida nos demais queijos em que foi adicionada a fastuosaína. Neste processamento utilizou-se a enzima com menor atividade enzimática, mostrando que esta sofreu menor autólise que as dos demais queijos, permanecendo ativa até o final do período de maturação e proporcionando maior liberação de triptofano, aminoácido obtido a partir de degradação protéica. A partir do 15º dia de maturação o teor de triptofano foi inversamente proporcional à atividade enzimática. No 60º dia, a amostra de queijo do processamento D, em que se utilizou a enzima com maior atividade enzimática inicial, apresentou menor poder de degradação protéica que a do queijo A, em que não se utilizou enzima, resultando em um menor teor de triptofano. Os resultados são semelhantes aos obtidos por Silva (1998), que mostrou que os maiores teores de triptofano foram obtidos nos processamentos em que se utilizou a enzima Neutrase® em queijo Prato e que estes teores também foram inversamente proporcionais à atividade enzimática. Os valores

obtidos foram maiores que o encontrado por Nabuco; Moretti; Penna (2004), de 58,96 mg/100 g queijo aos 30 dias de maturação.

Sal

Segundo Furtado; Lourenço Neto (1994), o teor médio de sal em queijos situa-se entre 1,6 e 1,9%, sendo assim, os valores encontrados nas amostras analisadas estão abaixo dos citados na literatura, apresentando-se também inferiores aos encontrados por Spadoti et al. (2003), de 1,36 a 1,60%, por Narimatsu et al. (2003), de 1,63 a 1,67% e por Spadoti; Dornellas; Roig (2005), de 1,36 a 1,60%. No entanto, queijos com baixos teores de gordura apresentam maiores teores de umidade, comparados aos tradicionais, e conseqüentemente, baixa proporção sal/umidade.

Por outro lado, queijos com menor teor de umidade apresentam menor teor de sal, devido ao retardamento no processo de salga, necessitando permanecer por mais tempo na salga. Altos teores de sal podem inibir o crescimento de microrganismos, conforme foi observado nas análises de contagem da cultura lática (Tabela 3 e 4, Figuras de 10 a 15). Baixos teores de sal favorecem a proteólise e o desenvolvimento de acidez. Durante o período de maturação as amostras dos queijos com maiores teores de sal apresentaram as menores populações microbianas, a 25ºC, o que também influenciou na obtenção de uma menor proteólise.

O teor de sal é um fator importante, pois favorece a drenagem da fase aquosa livre na massa, durante a dessora, interfere na formação de sabor característico do queijo devido ao seu próprio sabor, além de mascarar o sabor de certas substâncias (HARDY, 1987, citado por VAN DENDER et al., 1995).

Atividade de água (a_w)

Os teores de atividade de água obtidos foram menores que os encontrados por Moreno et al. (2002), em média 0,99, porém semelhantes aos encontrados por Silva et

al. (2005), que variaram de 0,97 a 0,98. Segundo Ferreira (2004), a atividade de água ótima para o crescimento de *Lactococcus lactis ssp. lactis*, é de 0,93. Desta forma, a atividade de água das amostras dos queijos não influenciou negativamente o crescimento microbiano.

A disponibilidade de água em um alimento regula e limita a atividade biológica de microrganismos e de reações químicas e enzimáticas, sendo importante durante a maturação. A atividade de água, assim como o ponto de congelamento, está relacionada à quantidade de sólidos solúveis, podendo-se estabelecer uma relação entre estes dois parâmetros. Desta forma, o ponto de congelamento (crioscópico), no caso de queijos, refere-se à fase aquosa obtida pela preparação de um extrato de queijo e água destilada, após a separação da fase sólida, a qual é constituída por sólidos insolúveis e gordura (MARCOS et al., 1988). Segundo Van Dender et al. (1995), uma diminuição do ponto de congelamento do extrato aquoso dos queijos reflete em uma diminuição da atividade de água.

5.5 – Resultados da caracterização dos parâmetros de cor

A Tabela 14 apresenta os resultados dos parâmetros de cor (L, a*, b*) das amostras dos queijos aos 30 e 60 dias de maturação.

As mudanças nos parâmetros de cor são utilizadas para avaliar o processo de maturação de queijos em função do tempo. O valor de L, em uma escala da 0 (preto) a 100 (branco) mede a luminosidade; um aumento positivo ou negativo no valor de a* corresponde a um aumento na proporção das cores vermelha ou verde, em que –100 representa o verde e +100 representa o vermelho. O valor b* representa a variação de azul (-100) a amarelo (+100) (BUFFA et al., 2001, AL-HOOTI et al., 2002).

Tabela 14 – Caracterização dos parâmetros de cor das amostras dos queijos tradicionais e modificados aos 30 e 60 dias de maturação.

Parâmetros	Dias	Processamentos			
		A	**B**	**C**	**D**
L	30	82,52 $^{A\,a}$ ± 0,88	81,02 $^{B\,ab}$ ± 0,82	79,64 $^{A\,b}$ ± 0,34	80,28 $^{A\,b}$ ± 0,41
	60	80,56 $^{B\,b}$ ± 0,09	83,01 $^{A\,a}$ ± 0,54	80,37 $^{A\,b}$ ± 0,37	81,76 $^{A\,ab}$ ± 0,99
a*	30	11,30 $^{A\,a}$ ± 0,32	8,56 $^{B\,c}$ ± 0,08	10,93 $^{B\,a}$ ± 0,06	9,99 $^{A\,b}$ ± 0,13
	60	10,74 $^{B\,b}$ ± 0,01	9,67 $^{A\,c}$ ± 0,17	11,70 $^{A\,a}$ ± 0,27	9,73 $^{A\,c}$ ± 0,45
b*	30	38,52 $^{A\,a}$ ± 0,65	32,58 $^{B\,c}$ ± 0,23	34,53 $^{A\,b}$ ± 0,15	33,37 $^{A\,c}$ ± 0,30
	60	32,49 $^{B\,bc}$ ± 0,39	34,00 $^{A\,ab}$ ± 0,52	35,25 $^{A\,a}$ ± 0,70	31,38 $^{A\,c}$ ± 1,31

$^{a, b, c}$ Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05). $^{A, B}$ Letras iguais na mesma coluna, para as mesmas análises, não diferem significativamente entre si (p>0,05). Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de 4 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de 20 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de 12 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.822.500 U.

Aos 30 dias de maturação os valores de L mostraram a maior luminosidade na amostra de queijo do processamento A em relação aos demais. Durante a maturação, os valores de a* aumentaram nas amostras dos queijos dos processamentos B e C e os valores de b* aumentaram na amostra B, ou seja, aumentaram a proporção das cores vermelha e amarela, respectivamente.

Buffa et al. (2001) observaram diminuição do valor de L, aumento do valor de b* e não observaram uma tendência definida de aumento ou diminuição no valor de a* durante a maturação de queijos fabricados com leite cru, pasteurizado ou tratado a alta pressão. Rohm; Jaros (1997) obtiveram diminuição nos valores de L e aumento nos valores de a* e b* durante a maturação de queijo Emmental. Segundo Ginzinger et al. (1999), o índice de "amarelamento" dos queijos, correlacionado ao valor de b*, aumenta com o tempo.

Os resultados observados nas amostras não seguem totalmente a tendência descrita por estes autores. Este fato pode ser explicado pela provável distribuição não homogênea do corante urucum na massa do queijo.

5.6 – Resultados da caracterização do perfil de textura

Os resultados da caracterização do perfil de textura dos processamentos dos queijos tradicionais e modificados estão apresentados na Tabela 15. Estes resultados apresentaram grande variação, com elevado desvio padrão, demonstrando a falta de uniformidade e homogeneidade das amostras de queijos.

As características de textura dos queijos ao longo da maturação são resultantes de mudanças químicas e bioquímicas além das induzidas por enzimas, que determinam o perfil de componentes do queijo (KANAWJIA et al., 1995).

O valor do parâmetro dureza encontrado para o processamento do queijo A foi semelhante ao obtido por Leite et al. (2004) em queijo Prato filado, de 15206,97g_f e maior que o encontrado pelos mesmos autores para queijo Prato prensado, de 13297,36 g_f.

Os resultados obtidos em relação ao parâmetro adesividade diferem dos encontrados por Baldini et al. (1998), que observaram, em queijo Prato, aumento no valor deste parâmetro com o tempo, mas foram semelhantes aos encontrados por Katsuda et al. (1999), que não observaram variação na adesividade do queijo Prato com baixo teor de gordura durante a maturação. Silva (1998) em estudo com queijo Prato com adição de enzima Neutrase® observou uma oscilação em relação a adesividade, sendo que no queijo sem adição de enzima este parâmetro apresentou-se linearmente crescente até o 14º dia de maturação, sofrendo um decréscimo nas três semanas subseqüentes, enquanto que no queijo com adição de 25mg de enzima/Kg de leite a adesividade oscilou durante todo o período de maturação.

Os valores encontrados para o parâmetro elasticidade foram maiores que os descritos por Leite et al. (2004), estando a elasticidade relacionada à hidrólise da matriz protéica.

Os valores encontrados para o parâmetro coesividade foram menores que os encontrados por Leite et al. (2004), que variaram de 1,02 a 1,09, em queijo Prato com teor integral de gordura, porém maiores que os obtidos por Katsuda et al. (1999), que foi de 0,57 em queijo Prato com baixo teor de gordura aos 30 dias de maturação.

Tabela 15 - Caracterização do perfil de textura das amostras dos queijos tradicionais e modificados aos 30 e 60 dias de maturação.

Parâmetros	**Dias**	**Processamentos**			
		A	**B**	**C**	**D**
Dureza (g_f)	30	15166,71 $^{A\,a}$ ± 182,14	5189,59 $^{A\,a}$ ± 8770,75	4071,05 $^{A\,a}$ ± 6713,67	17418,44 $^{A\,a}$ ± 147,49
	60	8553,82 $^{A\,ab}$ ± 7414,74	5581,68 $^{A\,ab}$ ± 9427,36	64,54 $^{A\,b}$ ± 147,31	22146,50 $^{A\,a}$ ± 4088,92
Fraturabilidade	30	107,23 $^{A\,a}$ ± 29,97	10295,35 $^{A\,a}$ ± 8743,96	9645,04 $^{A\,a}$ ± 8467,43	349,98 $^{A\,a}$ ± 61,48
	60	45,14 $^{A\,a}$ ± 65,68	185,60 $^{A\,a}$ ± 112,43	12869,01 $^{A\,a}$ ± 11052,11	312,96 $^{A\,a}$ ± 89,18
Adesividade (g_f.s)	30	-390,06 $^{A\,a}$ ± 484,67	15,45 $^{A\,a}$ ± 107,00	29,59 $^{A\,a}$ ± 106,11	131,10 $^{A\,a}$ ± 118,36
	60	-49,71 $^{A\,b}$ ± 14,85	-29,32 $^{A\,ab}$ ± 17,14	-7,35 $^{A\,a}$ ± 1,57	-25,54 $^{A\,ab}$ ± 18,99
Elasticidade	30	1,03 $^{A\,a}$ ± 0,08	0,98 $^{A\,a}$ ± 0,06	0,96 $^{A\,a}$ ± 0,03	0,94 $^{A\,a}$ ± 0,03
	60	0,97 $^{A\,a}$ ± 0,11	0,99 $^{A\,a}$ ± 0,03	0,94 $^{A\,a}$ ± 0,01	0,95 $^{A\,a}$ ± 0,03
Coesividade	30	0,71 $^{A\,a}$ ± 0,08	0,80 $^{A\,a}$ ± 0,02	0,81 $^{A\,a}$ ± 0,01	0,74 $^{A\,a}$ ± 0,02
	60	0,43 $^{B\,c}$ ± 0,05	0,67 $^{B\,b}$ ± 0,02	0,68 $^{B\,b}$ ± 0,00	0,78 $^{A\,a}$ ± 0,03
Gomosidade	30	10752,97 $^{A\,a}$ ± 1124,95	4042,97 $^{A\,a}$ ± 6827,24	3336,25 $^{A\,a}$ ± 5509,49	12915,94 $^{A\,a}$ ± 378,55
	60	3818,81 $^{A\,b}$ ± 3356,62	3862,11 $^{A\,b}$ ± 6532,68	43,88 $^{A\,b}$ ± 100,13	17422,33 $^{A\,a}$ ± 3829,14
Mastigabilidade	30	11127,85 $^{A\,a}$ ± 2051,16	3805,80 $^{A\,a}$ ± 6413,98	3097,81 $^{A\,a}$ ± 5101,10	12120,96 $^{A\,a}$ ± 176,08
	60	3876,81 $^{A\,b}$ ± 3538,58	3866,09 $^{A\,b}$ ± 6545,63	41,16 $^{A\,b}$ ± 93,97	16457,09 $^{A\,a}$ ± 3203,17
Resiliência	30	0,22 $^{A\,a}$ ± 0,03	0,25 $^{A\,a}$ ± 0,02	0,25 $^{A\,a}$ ± 0,01	0,27 $^{A\,a}$ ± 0,02
	60	0,14 $^{B\,c}$ ± 0,02	0,21 $^{B\,b}$ ± 0,00	0,21 $^{B\,b}$ ± 0,01	0,27 $^{A\,a}$ ± 0,04

$^{a, b, c}$ Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05). $^{A, B}$ Letras maiúsculas iguais na mesma coluna, em relação a uma mesma análise, não diferem significativamente entre si (p>0,05). Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de 4 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de 20 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de 12 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.822.500 U.

Os parâmetros gomosidade e a mastigabilidade estão relacionados à dureza, apresentando comportamentos semelhantes, sendo que os valores encontrados foram, em geral, menores que os citados por Leite et al. (2004).

5.7 – Resultados da capacidade de derretimento

A análise da capacidade de derretimento das amostras dos queijos tradicionais e modificados está apresentada nas Tabelas 16 e 17, sendo que foram utilizados dois binômios tempo x temperatura: 130ºC/10 min e 107ºC/7min.

Os resultados das análises da capacidade de derretimento apresentaram grande variação (elevado desvio padrão) para um mesmo processamento, no mesmo período de maturação, provavelmente em função de variação na uniformidade das amostras dos queijos. Observaram-se muitos valores de capacidade de derretimento negativos, mostrando que os queijos ao invés de derreter, encolheram, conforme observado na Figura 16.

Amostra Inicial 107ºC / 7 min 130ºC / 10 min

Figura 16 - Capacidade de derretimento de amostras de queijo Prato com reduzido teor de gordura.

Segundo Costa; Furtado (2002), em queijos com baixo teor de gordura há insuficiente difusão da gordura na superfície a 38ºC, temperatura em que a gordura começa a tornar-se líquida. Em altas temperaturas, a superfície desidrata-se

rapidamente, ocorrendo formação de bolhas, resultando em uma aparência atípica.

Baixo teor de umidade e altos teores de sal são fatores que influenciam negativamente o derretimento de queijos com baixo teor de gordura. O nível ótimo de sal deve estar entre 1,5 e 1,7%; valores maiores ou menores afetam as propriedades de derretimento (COSTA; FURTADO, 2002). Nos resultados obtidos os teores de sal foram menores que os citados, influenciando a capacidade de derretimento.

Observou-se que em um mesmo dia de maturação na maioria dos processamentos a análise da capacidade de derretimento realizada a 130ºC/10 min promoveu maior derretimento que as realizadas a 107ºC/7 min, confirmando os resultados encontrados por Nonogaki; Monteiro; Gigante (2004), que demonstraram que a melhor condição de derretimento do queijo Prato é de 130ºC/10 min. No 1º dia de maturação, a amostra do processamento B, apresentou a maior capacidade de derretimento a 130ºC/10 min.

Pizaia et al. (2003), em estudos com queijo Mussarela, observaram que logo após o processamento o queijo apresenta dificuldade para derreter, devido à presença de proteínas pouco solúveis de alto peso molecular. Após duas ou três semanas, conforme as proteínas vão sendo hidrolisadas e se tornam mais solúveis, a capacidade de derretimento aumenta.

Segundo Sanchez (1999) o derretimento tende a ser maior quando a degradação de proteína aumenta. Narimatsu et al. (2003) observaram aumento da capacidade de derretimento de queijos Prato elaborados com leite concentrado por ultrafiltração e com leite não concentrado, durante a maturação. Um aumento na capacidade de derretimento pôde ser observado apenas para o processamento do queijo D.

Tabela 16 - Análise da capacidade de derretimento das amostras dos queijos tradicionais e modificados durante o período de maturação.

Processamento	Condições Analíticas	Dias 1	15	30	45	60
A	107ºC/7min (%)	-30,28^{a} ± 28,75	-13,66^{a} ± 12,53	-16,27^{a} ± 8,36	8,49^{a} ± 36,90	0,00^{a} ± 0,00
	130ºC/10 min (%)	66,62^{a} ± 32,03	-89,46^{b} ± 26,70	0,25^{ab} ± 43,70	60,76^{a} ± 57,86	-8,36^{ab} ± 14,48
B	107ºC/7min (%)	-43,33^{a} ± 101,25	-64,33^{a} ± 3,06	-128,00^{a} ± 61,00	-63,67^{a} ± 62,07	-106,33^{a} ± 37,53
	130ºC/10 min (%)	275,00^{a} ± 304,32	160,33^{a} ± 173,78	240,00^{a} ± 420,74	364,67^{a} ± 280,52	-0,67^{a} ±68,00
C	107ºC/7min (%)	-88,67^{a} ± 37,58	-101,67^{a} ± 91,39	0,67^{a} ± 113,81	-66,33^{a} ± 66,00	-42,67^{a} ± 36,96
	130ºC/10 min (%)	-64,33^{a} ± 64,00	-18,33^{a} ± 126,98	21,67^{a} ± 97,33	0,67^{a} ± 64,00	0,00^{a} ± 110,89
D	107ºC/7min (%)	-108,55^{b} ± 27,93	-28,00^{ab} ± 17,89	-20,90^{a} ± 60,15	-40,41^{ab} ± 16,12	-5,59^{a} ± 4,85
	130ºC/10 min (%)	-144,07^{b} ± 27,83	-54,45^{ab} ± 52,35	-75,29^{ab} ± 47,98	-11,13^{a} ± 41,86	8,35^{a} ± 48,00

$^{a, b}$ Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de 4 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de 20 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de 12 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.822.500 U.

Tabela 17 – Comparação entre a capacidade de derretimento (%) das amostras dos queijos dos diferentes processamentos.

Condições Analíticas		**Dias**				
		1	**15**	**30**	**45**	**60**
107ºC/7min (%)	A	-30,28[a] ± 28,75	-13,66[a] ± 12,53	-16,27[a] ± 8,36	8,49[a] ± 36,90	0,00[a] ± 0,00
	B	-43,33[a] ± 101,25	-64,33[a] ± 3,06	-128,00[a] ± 61,00	-63,67[a] ± 62,07	-106,33[a] ± 37,53
	C	-88,67[a] ± 37,58	-101,67[a] ± 91,39	0,67[a] ± 113,81	-66,33[a] ± 66,00	-42,67[a] ± 36,96
	D	-108,55[a] ± 27,93	-28,00[a] ± 17,89	-20,90[a] ± 60,15	-40,41[a] ± 16,12	-5,59[a] ± 4,85
130ºC/10 min (%)	A	66,62[ab] ± 32,03	-89,46[a] ± 26,70	0,25[a] ± 43,70	60,76[a] ± 57,86	-8,36[a] ± 14,48
	B	275,00[a] ± 304,32	160,33[a] ± 173,78	240,00[a] ± 420,74	364,67[a] ± 280,52	-0,67[a] ±68,00
	C	-64,33[ab] ± 64,00	-18,33[a] ± 126,98	21,67[a] ± 97,33	0,67[a] ± 64,00	0,00[a] ± 110,89
	D	-144,07[b] ± 27,83	-54,45[a] ± 52,35	-75,29[a] ± 47,98	-11,13[a] ± 41,86	8,35[a] ± 48,00

[a, b] Letras iguais na mesma coluna em relação às mesmas condições de análises não diferem significativamente entre si (p>0,05).
Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de 4 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de 20 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de 12 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.822.500 U.

5.8 – Resultados da avaliação sensorial

5.8.1 – Resultados da seleção do painel e treinamento dos provadores

Foram testados 33 candidatos em 4 sessões, contendo 3 testes de diferença cada uma, totalizando 12 julgamentos totais. Para uma significância de 0,05%, é necessário que cada candidato tenha 8 julgamentos corretos para ser selecionado. Os resultados obtidos nessas sessões estão na Tabela 18, sendo que conforme os candidatos foram tendo um número muito grande de julgamentos incorretos, os mesmos eram eliminados da seleção.

Nestas quatro primeiras sessões foram selecionados os provadores de número 1, 2 e 8. Como este é um número relativamente pequeno para montar um painel de provadores treinados, foram realizadas mais 2 sessões, com 4 grupos de amostras cada, totalizando 8 julgamentos totais com mais 5 candidatos a provadores. Para uma significância de 0,05%, é necessário que cada candidato tenha 5 julgamentos corretos para ser selecionado. Os resultados obtidos nestas duas sessões estão apresentados na Tabela 19, nas quais foram selecionados os provadores de número 34, 35 e 36, totalizando 6 provadores selecionados.

Tabela 18 – Número de respostas corretas no teste triangular (primeira seleção).

nº do provador	Julgamentos corretos				
	1ª sessão	2ª sessão	3ª sessão	4ª sessão	Total
1	3	3	2	1	8
2	2	2	2	2	8
3	2	0	—	—	2
4	2	1	0	—	3
5	2	1	0	—	3
6	2	1	0	—	3
7	2	0	—	—	2
8	2	2	1	3	8
9	1	—	—	—	1
10	1	1	—	—	2
11	1	2	1	0	4
12	1	2	0	—	3
13	1	1	—	—	2
14	1	2	0	—	3
15	1	2	0	—	3
16	1	0	—	—	1
17	1	1	—	—	2
18	1	1	—	—	2
19	1	0	—	—	1
20	1	0	—	—	1
21	1	1	—	—	2
22	1	—	—	—	1
23	1	0	—	—	1
24	0	1	—	—	1
25	0	1	—	—	1
26	0	—	—	—	0
27	0	0	—	—	0
28	0	2	—	—	2
29	0	2	—	—	2
30	0	—	—	—	0
31	0	1	—	—	1
32	0	1	—	—	1
33	0	2	—	—	2

Tabela 19 – Número de respostas corretas no teste triangular (segunda seleção).

Nº do provador	Julgamentos corretos		
	1ª sessão	2ª sessão	Total
34	3	2	5
35	2	3	5
36	2	3	5
37	2	1	3
38	1	—	1

5.8.2 – Resultados da avaliação sensorial dos queijos Prato tradicionais e modificados

Os resultados das análises sensoriais das amostras dos queijos tradicionais e modificados estão apresentados na Tabela 20 e nas Figuras de 17 a 20.

Segundo Leite et al. (2004), a maturação dos queijos envolve reações microbiológicas e químicas, onde as proteínas complexas do leite são degradadas em pequenos peptídeos e aminoácidos livres, e ésteres de ácidos graxos são convertidos em ácidos graxos livres. Esta mistura dos compostos resultantes da degradação protéica é responsável pelo sabor, aroma e textura do queijo.

O valor do parâmetro aroma, 3,33, foi obtido para a amostra do queijo do processamento B aos 60 dias, que apresentou a maior extensão da proteólise neste período, além dos maiores teores dos aminoácidos tirosina e triptofano. Katsuda et al. (1999) observaram que queijos Prato, com teor normal e com baixo teor de gordura, não apresentaram diferença de aroma a partir do 15º dia de maturação. Leite et al. (2004) observaram menor odor, aroma e gosto doce em queijo Prato de massa filada quando comparado ao queijo Prato prensado.

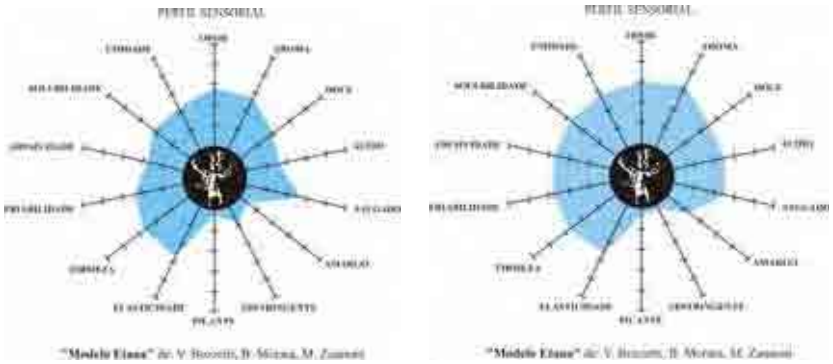
O parâmetro ácido apresentou um aumento durante o período de maturação na amostra do queijo do processamento B, o que pode ser explicado pela conversão da lactose em ácido lático, pela cultura lática.

O amargor em queijos ocorre devido ao acúmulo de peptídeos amargos em altas concentrações, aminoácidos, amidas, cetonas de cadeias longas e alguns monoglicerídeos (McSWEENEY, 1997). O desenvolvimento de amargor é um defeito comum em queijos com baixo teor de gordura devido ao baixo conteúdo de sal e alta umidade (OLSON; JOHSNSON, 1990b). Os índices de amargor dos queijos A e C aos 60 dias de maturação podem ser relacionado ao baixo conteúdo de sal destas amostras de queijos nas análises físico-químicas. A amostra do queijo do processamento A apresentou o maior índice de profundidade da maturação, o qual é atribuído a substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, como peptídeos, que conferem gosto amargo aos queijos.

Tabela 20 - Avaliação sensorial das amostras dos queijos tradicionais e modificados aos 30 e 60 dias de maturação.

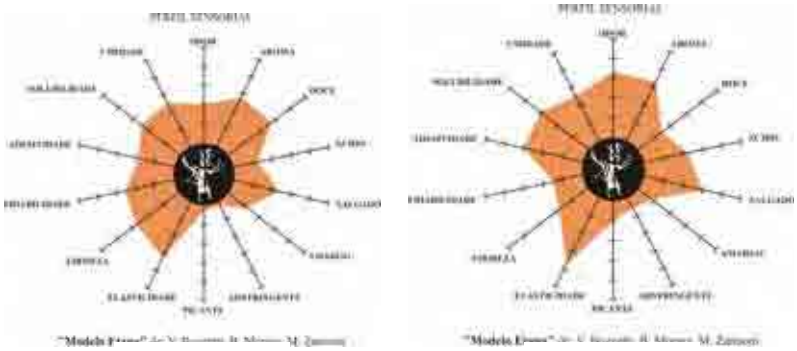
Parâmetro	Dias	Processamentos			
		A	B	C	D
Odor	30	2,83 $^{A\,a}$ ± 1,44	2,00 $^{B\,a}$ ± 0,95	1,92 $^{A\,a}$ ± 1,20	2,40 $^{A\,a}$ ± 1,08
	60	2,83 $^{A\,a}$ ± 1,75	3,33 $^{A\,a}$ ± 0,58	2,83 $^{A\,a}$ ± 1,26	3,42 $^{A\,a}$ ± 0,66
Aroma	30	2,75 $^{A\,a}$ ± 0,82	2,92 $^{A\,a}$ ± 0,92	2,75 $^{A\,a}$ ± 0,99	2,20 $^{B\,a}$ ± 0,27
	60	3,08 $^{A\,a}$ ± 1,20	3,33 $^{A\,a}$ ± 0,58	3,00 $^{A\,a}$ ± 0,87	3,42 $^{A\,a}$ ± 0,49
Doce	30	2,08 $^{A\,a}$ ± 0,97	2,75 $^{A\,a}$ ± 1,21	2,08 $^{A\,a}$ ± 1,39	2,10 $^{A\,a}$ ± 1,19
	60	2,50 $^{A\,a}$ ± 1,52	1,50 $^{A\,a}$ ± 1,32	2,67 $^{A\,a}$ ± 1,53	2,00 $^{A\,a}$ ± 1,30
Ácido	30	1,67 $^{A\,a}$ ± 0,88	1,17 $^{B\,a}$ ± 0,52	1,67 $^{A\,a}$ ± 0,75	1,10 $^{A\,a}$ ± 0,42
	60	2,17 $^{A\,a}$ ± 1,03	2,17 $^{A\,a}$ ± 1,44	2,17 $^{A\,a}$ ± 0,76	1,83 $^{A\,a}$ ± 1,03
Salgado	30	2,67 $^{A\,a}$ ± 0,75	2,50 $^{A\,a}$ ± 0,77	2,67 $^{A\,a}$ ± 0,82	2,30 $^{A\,a}$ ± 0,76
	60	2,58 $^{A\,a}$ ± 0,80	3,00 $^{A\,a}$ ± 1,00	2,50 $^{A\,a}$ ± 0,87	3,00 $^{A\,a}$ ± 0,84
Amargo	30	0,42 $^{A\,a}$ ± 0,49	1,08 $^{A\,a}$ ± 1,20	1,00 $^{A\,a}$ ± 0,89	1,20 $^{A\,a}$ ± 0,91
	60	1,25 $^{A\,a}$ ± 1,25	1,00 $^{A\,a}$ ± 1,32	1,33 $^{A\,a}$ ± 0,58	0,92 $^{A\,a}$ ± 0,92
Adstringente	30	0,92 $^{A\,a}$ ± 0,92	0,42 $^{A\,a}$ ± 0,80	0,50 $^{A\,a}$ ± 0,84	0,60 $^{A\,a}$ ± 1,08
	60	0,42 $^{A\,a}$ ± 0,80	0,67 $^{A\,a}$ ± 1,15	0,67 $^{A\,a}$ ± 0,76	0,92 $^{A\,a}$ ± 1,11
Picante	30	0,33 $^{A\,a}$ ± 0,41	0,25 $^{A\,a}$ ± 0,42	0,58 $^{A\,a}$ ± 0,80	0,30 $^{A\,a}$ ± 0,45
	60	0,33 $^{A\,a}$ ± 0,41	1,00 $^{A\,a}$ ± 1,73	0,67 $^{A\,a}$ ± 0,76	0,25 $^{A\,a}$ ± 0,42
Elasticidade	30	2,67 $^{A\,a}$ ± 1,37	3,17 $^{A\,a}$ ± 1,47	2,67 $^{A\,a}$ ± 0,98	1,70 $^{A\,a}$ ± 1,52
	60	2,25 $^{A\,ab}$ ± 1,25	3,67 $^{A\,a}$ ± 0,58	1,83 $^{A\,b}$ ± 1,04	2,58 $^{A\,ab}$ ± 1,39
Firmeza	30	2,75 $^{A\,b}$ ± 0,82	2,83 $^{A\,ab}$ ± 0,88	3,25 $^{A\,ab}$ ± 0,99	4,10 $^{A\,a}$ ± 0,22
	60	2,92 $^{A\,a}$ ± 0,66	1,67 $^{B\,b}$ ± 1,15	2,83 $^{A\,a}$ ± 1,04	3,00 $^{B\,a}$ ± 0,32
Friabilidade	30	2,42 $^{A\,a}$ ± 0,66	2,42 $^{A\,a}$ ± 0,49	2,75 $^{A\,a}$ ± 0,61	2,90 $^{A\,a}$ ± 1,14
	60	2,92 $^{A\,a}$ ± 0,80	1,33 $^{B\,b}$ ± 0,58	3,17 $^{A\,a}$ ± 1,04	2,58 $^{A\,a}$ ± 0,80
Adesividade	30	1,83 $^{A\,a}$ ± 0,93	1,83 $^{B\,a}$ ± 0,75	1,67 $^{A\,a}$ ± 0,61	2,20 $^{A\,a}$ ± 0,84
	60	2,83 $^{A\,a}$ ± 1,51	3,00 $^{A\,a}$ ± 0,00	2,67 $^{A\,a}$ ± 1,53	2,00 $^{A\,a}$ ± 0,89
Solubilidade	30	2,33 $^{A\,a}$ ± 0,82	2,42 $^{A\,a}$ ± 1,11	2,17 $^{A\,a}$ ± 1,03	1,60 $^{A\,a}$ ± 0,89
	60	2,92 $^{A\,a}$ ± 0,80	3,00 $^{A\,a}$ ± 0,00	1,83 $^{A\,a}$ ± 0,29	2,33 $^{A\,a}$ ± 0,88
Umidade	30	2,25 $^{A\,a}$ ± 0,61	2,33 $^{A\,a}$ ± 0,61	2,33 $^{A\,a}$ ± 0,75	1,80 $^{A\,a}$ ± 0,76
	60	2,83 $^{A\,a}$ ± 0,88	2,50 $^{A\,a}$ ± 0,50	2,17 $^{A\,a}$ ± 0,76	2,83 $^{A\,a}$ ± 0,93

$^{a,\,b}$ Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p>0,05). $^{A,\,B}$ Letras iguais na mesma coluna, em relação aos mesmos parâmetros não diferem significativamente entre si (p>0,05). Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de 4 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de 20 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de 12 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.822.500 U.



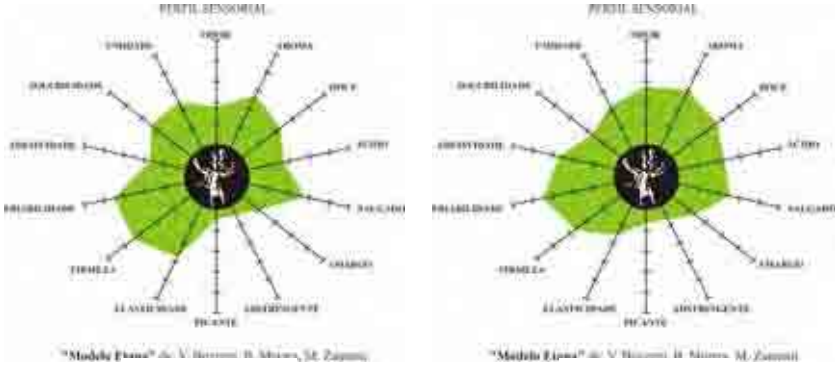
30 Dias **60 Dias**

Figura 17 - Avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana, das amostras dos queijos tradicionais (Processamento A) aos 30 e 60 dias de maturação.



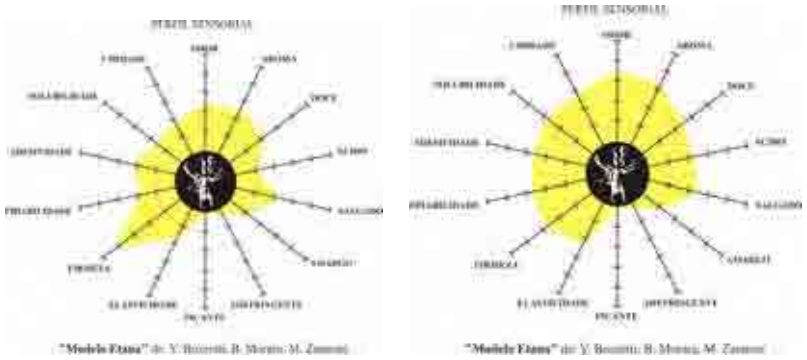
30 Dias **60 Dias**

Figura 18 - Avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana, das amostras dos queijos modificados (Processamento B) aos 30 e 60 dias de maturação.



30 Dias **60 Dias**

Figura 19 - Avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana, das amostras dos queijos modificados (Processamento C) aos 30 e 60 dias de maturação.



30 Dias **60 Dias**

Figura 20 - Avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana, das amostras dos queijos modificados (Processamento D) aos 30 e 60 dias de maturação.

Segundo Silva (1998), o uso de enzimas proteolíticas em queijos pode provocar desenvolvimento de gosto amargo, o que não foi observado nas amostras dos queijos experimentais modificados comparados com as amostras do queijo controle durante a maturação.

O parâmetro elasticidade pode ser relacionado à proteólise, sendo que a amostra

de queijo do processamento B foi a que apresentou maior extensão da proteólise durante todo o período de maturação e maior elasticidade aos 60 dias de maturação. Katsuda et al. (1999) observaram diferença na elasticidade em queijo Prato a partir do 30º dia de maturação.

A alteração da firmeza durante a maturação é resultante da proteólise que promove a degradação das proteínas deixando os queijos menos firmes. A maior firmeza foi observada na amostra do queijo D, a qual durante o período de maturação analisado apresentou os menores teores de umidade e um dos menores índices de extensão da maturação. O parâmetro firmeza sensorial apresentou-se semelhante aos obtidos na análise instrumental de textura, no qual aos 30 dias de maturação a amostra do queijo do processamento D apresentou os maiores valores do parâmetro analisado em ambas as análises.

Aos 30 dias de maturação, os valores dos parâmetros sensoriais friabilidade, adesividade, solubilidade e umidade das amostras do queijo do processamento D podem estar relacionados ao teor de umidade da amostra, a qual apresentou o menor valor na análise físico-química, neste período de maturação.

Os resultados de adesividade nas amostras do queijo do processamento B são semelhantes aos relatados por Baldini et al. (1998), que observaram que a adesividade do queijo Prato tende a aumentar com o tempo de maturação. Enquanto que os resultados referentes às amostras dos processamentos A, C e D são semelhantes aos de Katsuda et al. (1999), que não observaram diferença de adesividade no queijo Prato com baixo teor de gordura durante a maturação.

5.9 – Caracterização da microestrutura por microscopia eletrônica de transmissão.

A análise quantitativa estereológica das proporções relativas (%) de proteína, gordura, cultura lática e outros componentes não identificados das amostras de queijos dos processamentos A, B, C e D, aos 8, 30 e 60 dias de maturação, está apresentada na Tabela 21 e as imagens dos campos histológicos obtidas por microscopia eletrônica de transmissão estão apresentadas nas Figuras de 21 a 39.

Através dos valores encontrados nas análises quantitativas estereológicas (Tabela 23) assim como nas imagens obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão (Figuras de 21 a 39) podem-se observar algumas diferenças entre a microestrutura dos queijos submetidos aos diferentes processamentos.

Observa-se que em todos os processamentos a matriz protéica tornou-se mais densa durante o período de maturação. Segundo Stanley; Emmons (1977), a perda da aparência fibrosa e o desenvolvimento de uma matriz protéica densa, homogênea e compacta são as principais mudanças estruturais ocorridas durante a maturação. Estas mudanças podem ocorrer devido à evaporação da água (BUFFA et al., 2001). Comparando-se as Figuras 37(a) a 37(d) pode-se observar nas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) o aspecto mais denso e compacto das amostras do queijo C - Figura 37(c).

Pode-se observar aos 30 dias o aspecto mais denso e compacto da matriz protéica das amostras de queijos dos processamentos B e C, Figuras 38(b) e 38(c), respectivamente. Os valores encontrados aos 60 dias de maturação em relação a proporção relativa de proteínas estão de acordo com os obtidos nas análises físico-químicas, em que a menor porcentagem de proteínas foi obtida para nas amostras do queijo D e a maior para as do queijo C. O comportamento denso e compacto da matriz protéica foi observado por diversos autores (KHEADR et al., 2002; MERRILL et al., 1996; SILVA, 2006). Kheadr et al. (2002) observaram que queijos Cheddar fabricados com leite pressurizado com teor integral e baixo teor de gordura exibiram uma matriz protéica compacta constituída de pequenas micelas de caseína. Merrill et al. (1996) observaram partículas de caseína densas e bem desenvolvidas em queijo Mussarela com teor reduzido de gordura. Silva (2006) em queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de *Lactobacillus casei* também observou uma matriz protéica densa e compacta.

De acordo com Mistry; Anderson (1993) a interrupção da matriz protéica do queijo por numerosos glóbulos de gordura contribui para o desenvolvimento da textura cremosa desejável em queijos com teor integral de gordura. Segundo Crites; Drake; Swanson (1997) e Merril et al. (1996), queijos com teor reduzido e com baixo teor de gordura, sem adição de substitutos de gordura, e, desta forma, com poucos glóbulos de gordura para interromper a matriz protéica, exibem textura mais firme e elástica que queijos com teor integral de gordura. Aos 30 dias de maturação, as amostras do queijo

do processamento A apresentaram maior proporção relativa de gordura na análise quantitativa estereológica, o que pode ser observado por meio da TEM, Figuras 22(a), 22(b) e 38(a), e menor firmeza, 2,75 ± 0,82, segundo a análise sensorial. Aos 60 dias de maturação, a amostra do queijo do processamento B, com menor proporção relativa de gordura na análise quantitativa estereológica (Figura 39 b), apresentou a menor firmeza sensorial, demonstrando a predominância da ação da enzima proteolítica na degradação protéica, e conseqüente desenvolvimento da textura menos firme das amostras submetidas a este processamento.

A proporção relativa de cultura lática confirma os resultados obtidos nas análises microbiológicas a 25ºC, na qual a menor população da cultura lática foi obtida para as amostras do queijo do processamento C e a maior para as do processamento B aos 30 dias, enquanto que aos 60 dias as menores populações de cultura lática foram obtidas nas amostras dos queijos dos processamentos B e C, e a maior, para as do processamento D. As Figuras 24(d, e, f), 28(d, e, f), 32(d, e, f) e 36(d, e, f) mostram que durante o período de maturação analisado a população da cultura lática aumentou até os 30 dias de maturação diminuindo no período final de 60 dias. Nas Figuras 37(e, f, g, h) pode-se observar que aos 8 dias de maturação as células microbianas estão bem definidas e estruturadas, aos 30 dias observa-se a divisão celular, mostrando que algumas células ainda encontram condições favoráveis para a reprodução (Figuras 38 e, f, g, h), porém, aos 60 dias de maturação, pode-se observar algumas células microbianas lisadas, sem a parede celular (Figuras 39 e, f, g, h), mostrando que o ambiente não se encontra adequado para o desenvolvimento celular. Durante todo o período de maturação e em todas as amostras dos queijos Prato analisados, a cultura lática apresenta-se próxima aos glóbulos de gordura (Figuras 37 e, f, g, h, 38 e, f, g, h e 39 e, f, g, h). Este comportamento foi relatado por Lopez et al. (2006), que em estudos com queijo Emmental, observaram o crescimento das bactérias na interface gordura/proteína, além da organização destas em colônias, e por Silva (2006), que em estudo com queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de *Lactobacillus casei*, observou que a maior parte das bactérias se encontrava agrupada, mas havia também bactérias isoladas, sempre próximas aos glóbulos de gordura.

Tabela 21 - Análise quantitativa estereológica das proporções relativas (%) de proteína, gordura, cultura lática e outros componentes não identificados, aos 8, 30 e 60 dias de maturação.

Componente	Dia	A	B	C	D
Proteína (%)	8	$40,60^{A\ bc}$	$59,40^{A\ b}$	$78,10^{A\ a}$	$31,43^{B\ c}$
	30	$48,10^{A\ a}$	$57,44^{A\ a}$	$65,00^{A\ a}$	$46,90^{A\ a}$
	60	$47,14^{A\ b}$	$69,41^{A\ a}$	$72,00^{A\ a}$	$42,50^{A\ b}$
Gordura (%)	8	$52,50^{A\ a}$	$35,24^{A\ b}$	$16,67^{B\ c}$	$63,21^{A\ a}$
	30	$46,90^{AB\ a}$	$20,39^{B\ b}$	$24,52^{AB\ b}$	$46,79^{B\ a}$
	60	$37,74^{B\ ab}$	$26,90^{AB\ b}$	$28,00^{A\ b}$	$50,95^{AB\ a}$
Cultura (%)	8	$2,50^{A\ a}$	$0,60^{A\ a}$	$3,57^{A\ a}$	$3,81^{A\ a}$
	30	$4,88^{A\ a}$	$5,95^{A\ a}$	$3,10^{A\ a}$	$4,17^{A\ a}$
	60	$2,26^{A\ a}$	$0,00^{A\ a}$	$0,00^{A\ a}$	$4,40^{A\ a}$
Outros (%)	8	$4,40^{A\ a}$	$4,76^{A\ a}$	$1,67^{A\ a}$	$1,55^{A\ a}$
	30	$0,12^{A\ a}$	$16,22^{A\ a}$	$7,38^{A\ a}$	$2,14^{A\ a}$
	60	$12,86^{A\ a}$	$3,69^{A\ a}$	$0,00^{A\ a}$	$2,14^{A\ a}$

$^{a, b, c}$ Letras minúscula iguais na mesma linha em relação aos diferentes processamentos A, B, C e D não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).
$^{A, B}$ Letras maiúsculas iguais na mesma coluna em relação ao mesmo componente não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de 4 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de 20 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de 12 mg de fastuosaína/litro de leite com atividade total de 1.822.500 U.

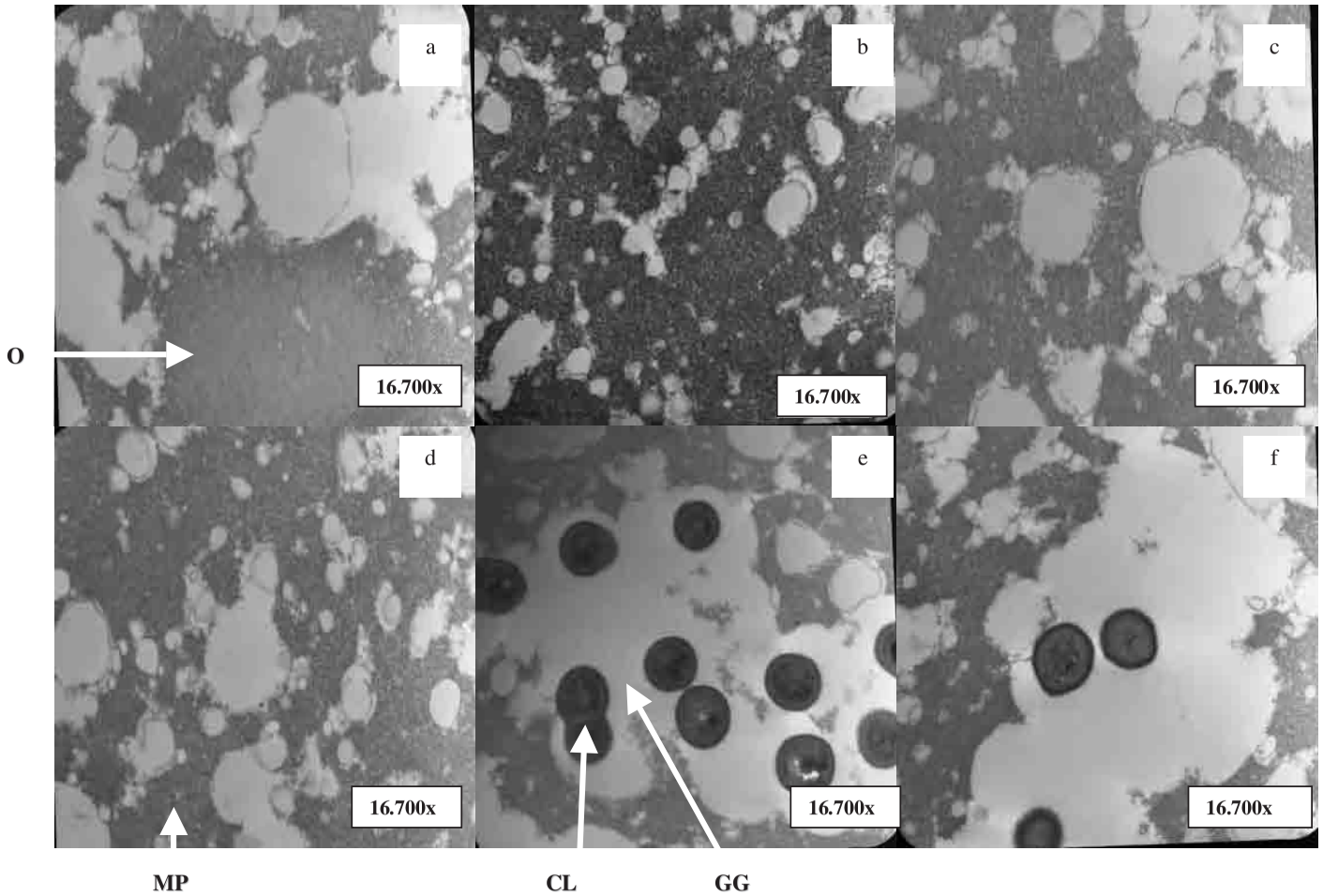


Figura 21 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato tradicional (A) aos 8 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

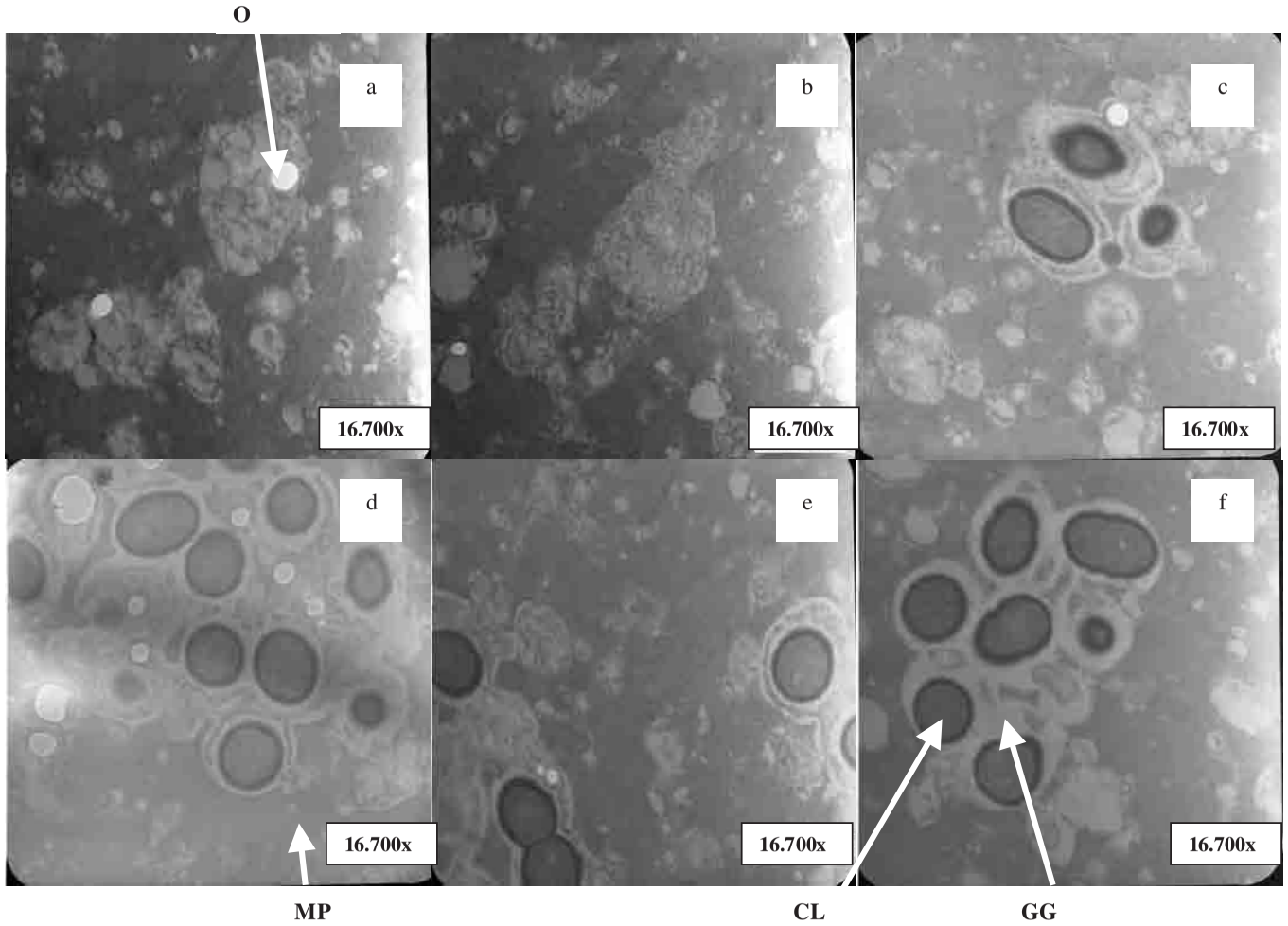


Figura 22 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato tradicional (A) aos 30 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

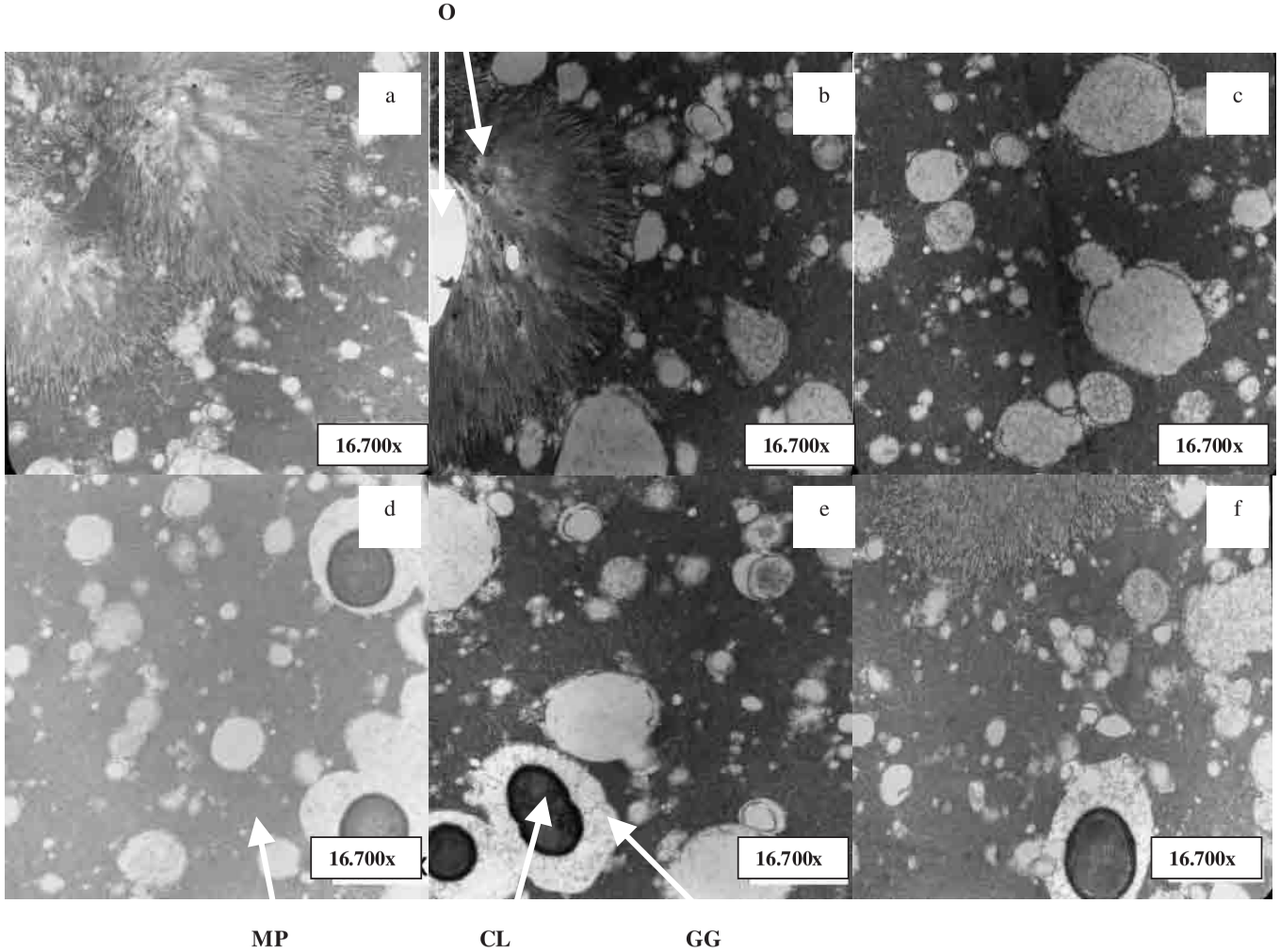


Figura 23 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato tradicional (A) aos 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

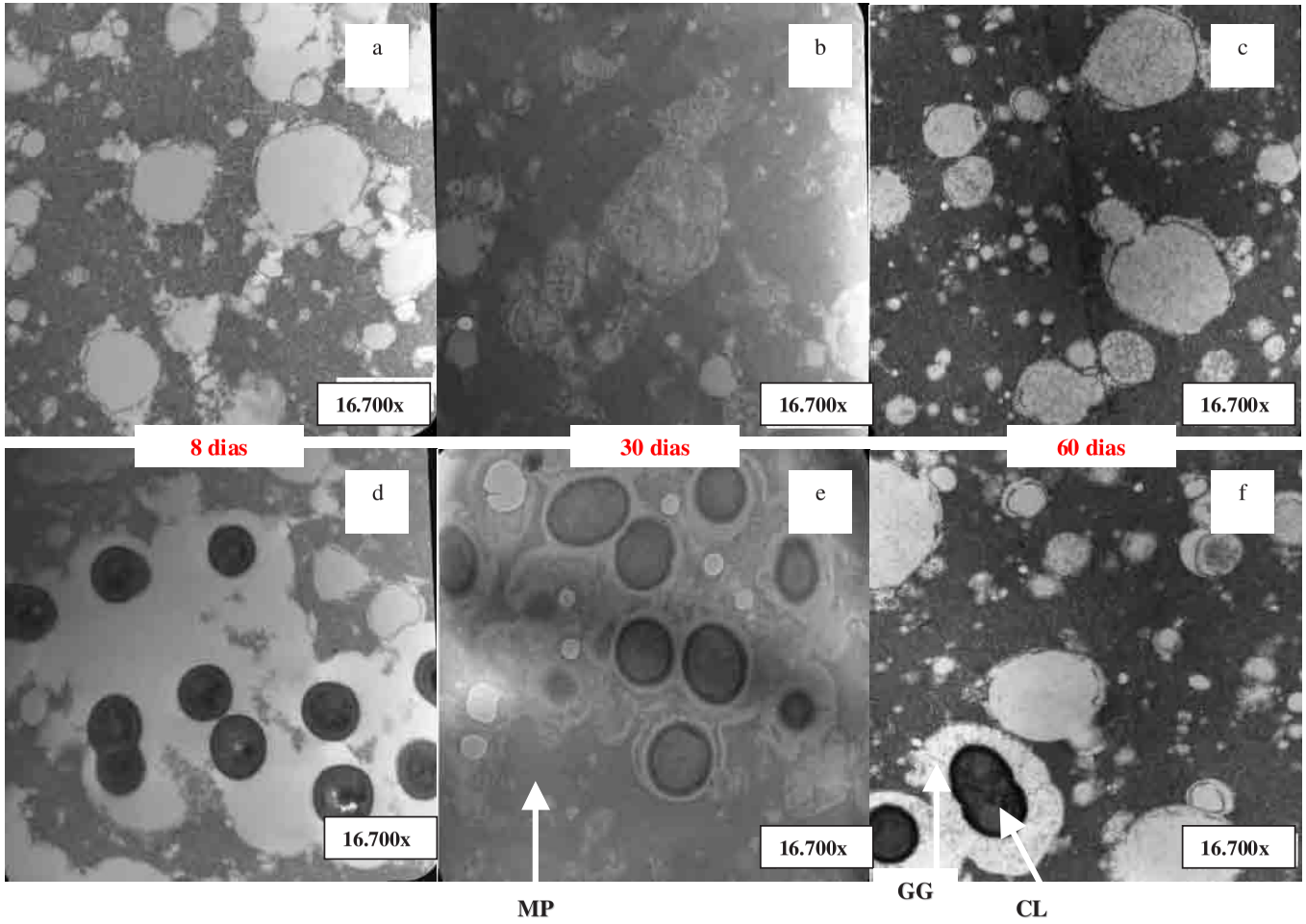


Figura 24 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato tradicional (A) aos 8, 30 e 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

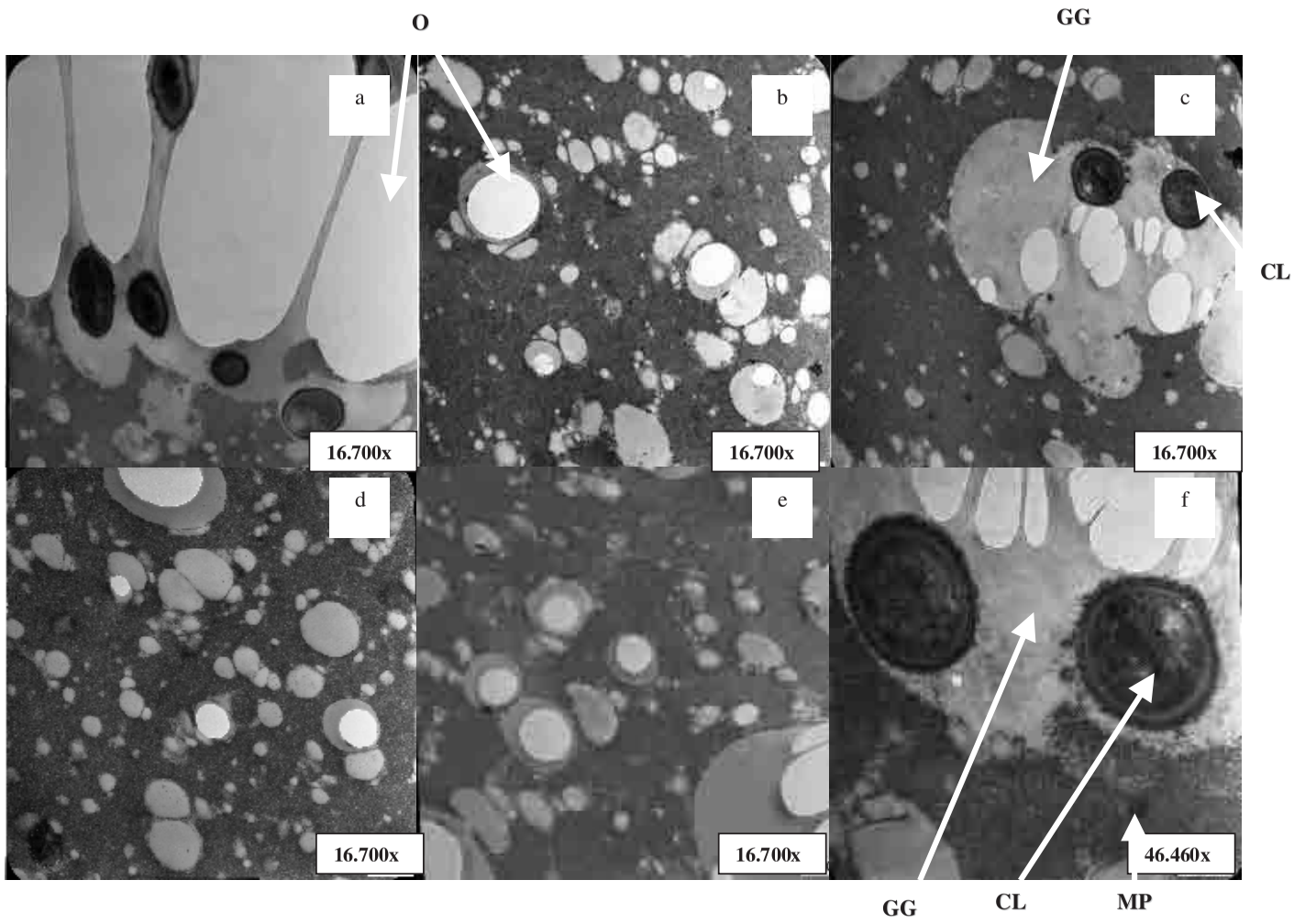


Figura 25 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (B) aos 8 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

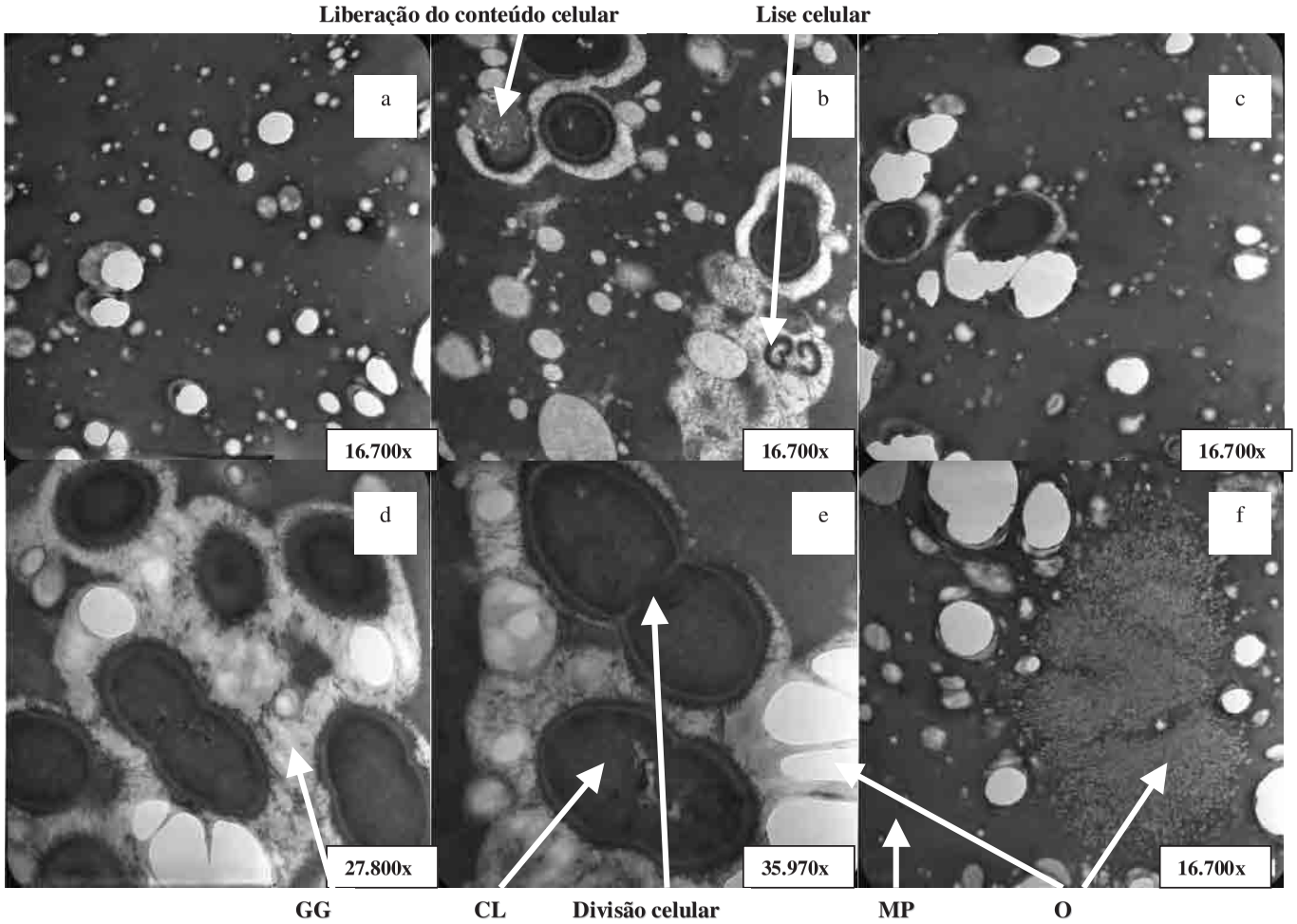


Figura 26 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (B) aos 30 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

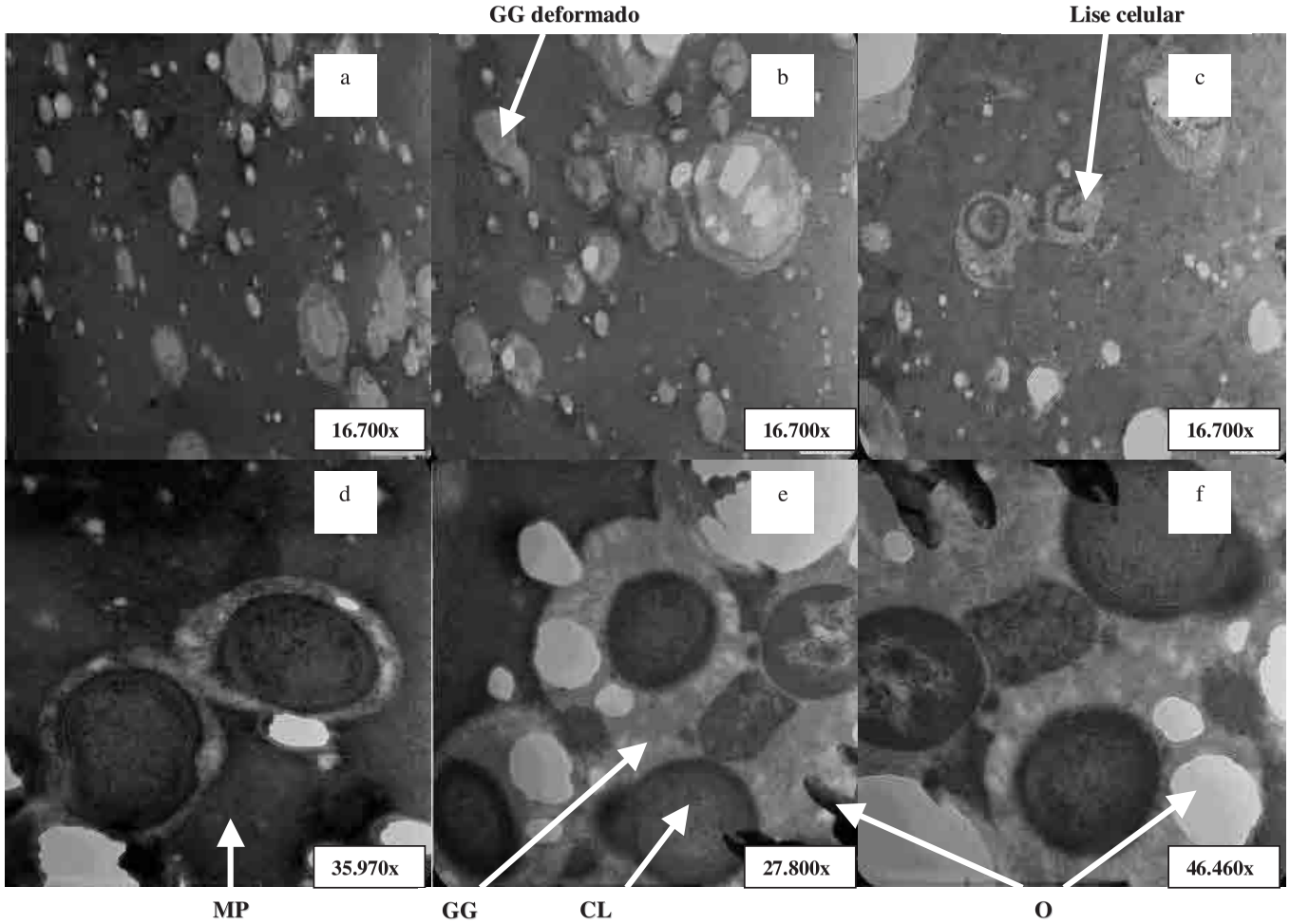


Figura 27 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (B) aos 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

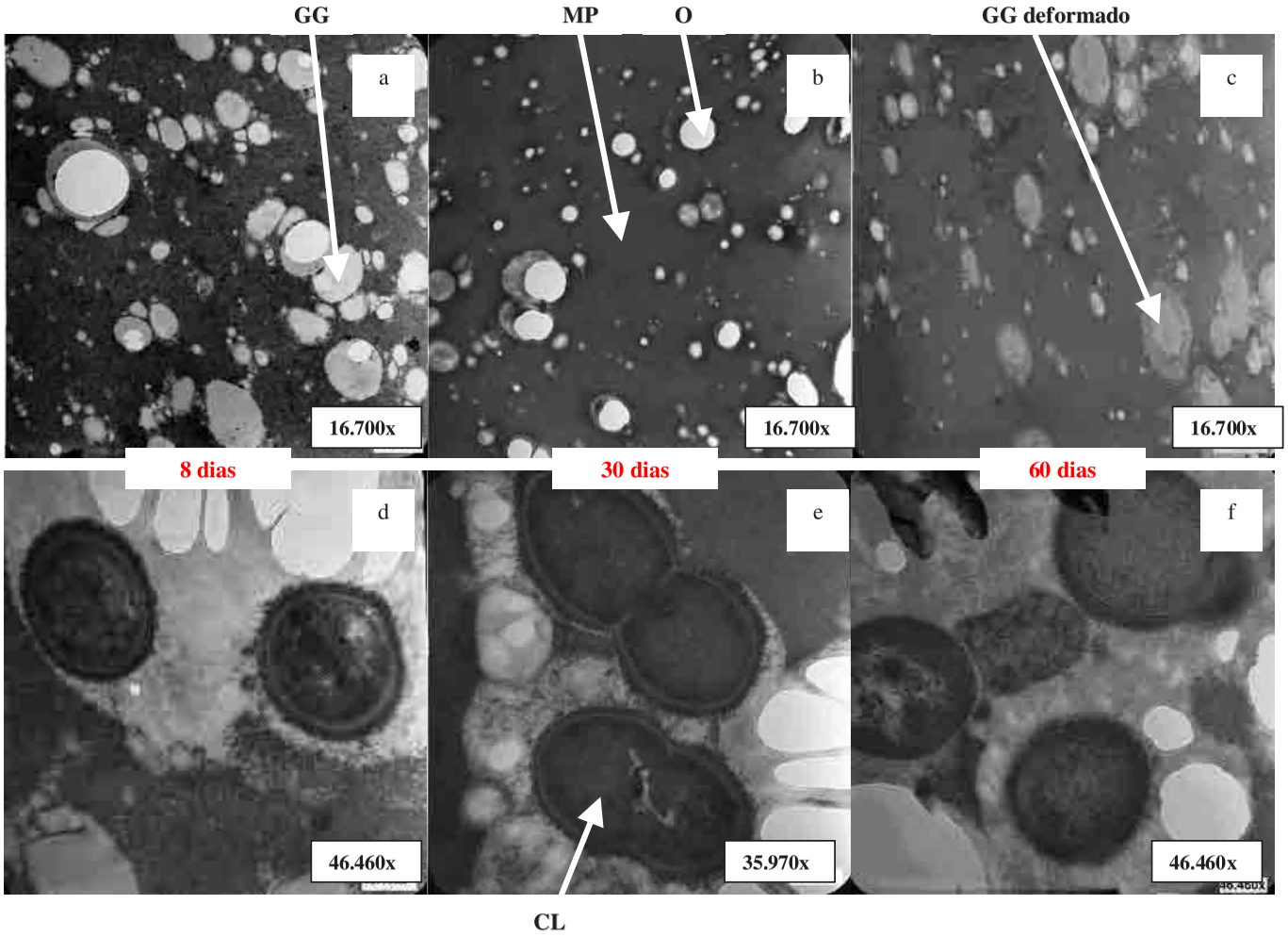


Figura 28 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (B) aos 8, 30 e 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

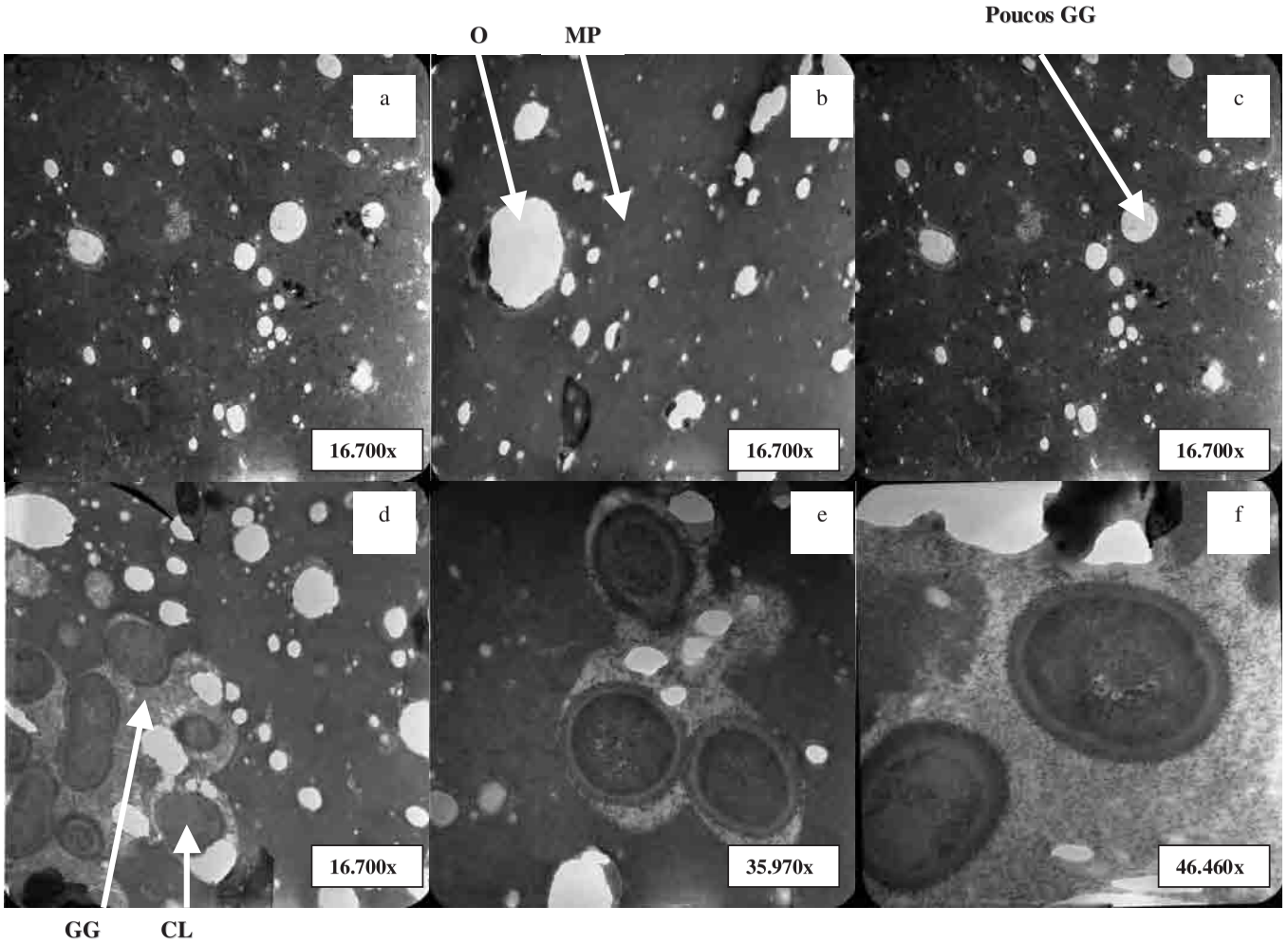


Figura 29 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (C) aos 8 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

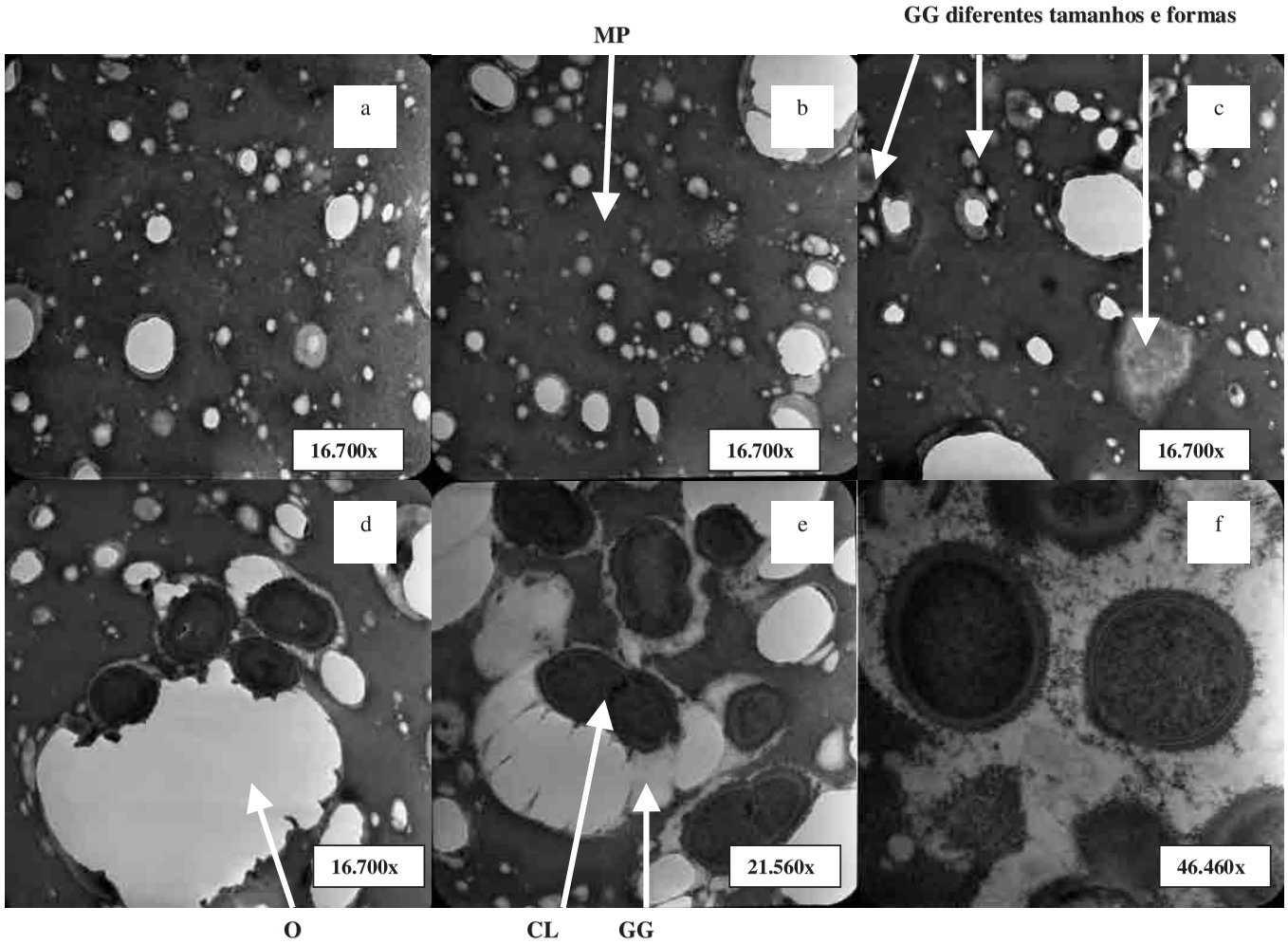


Figura 30 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (C) aos 30 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

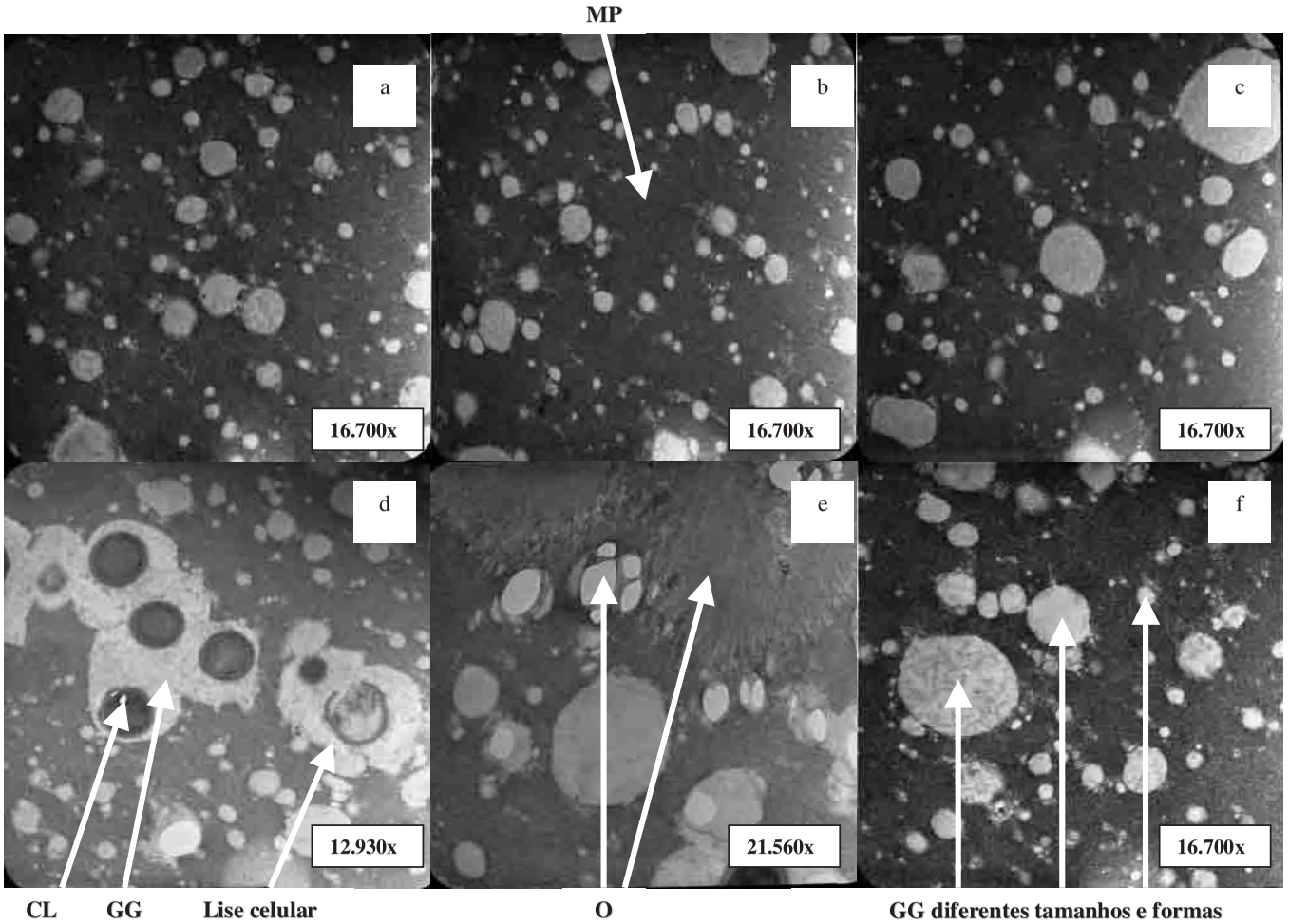


Figura 31 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (C) aos 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

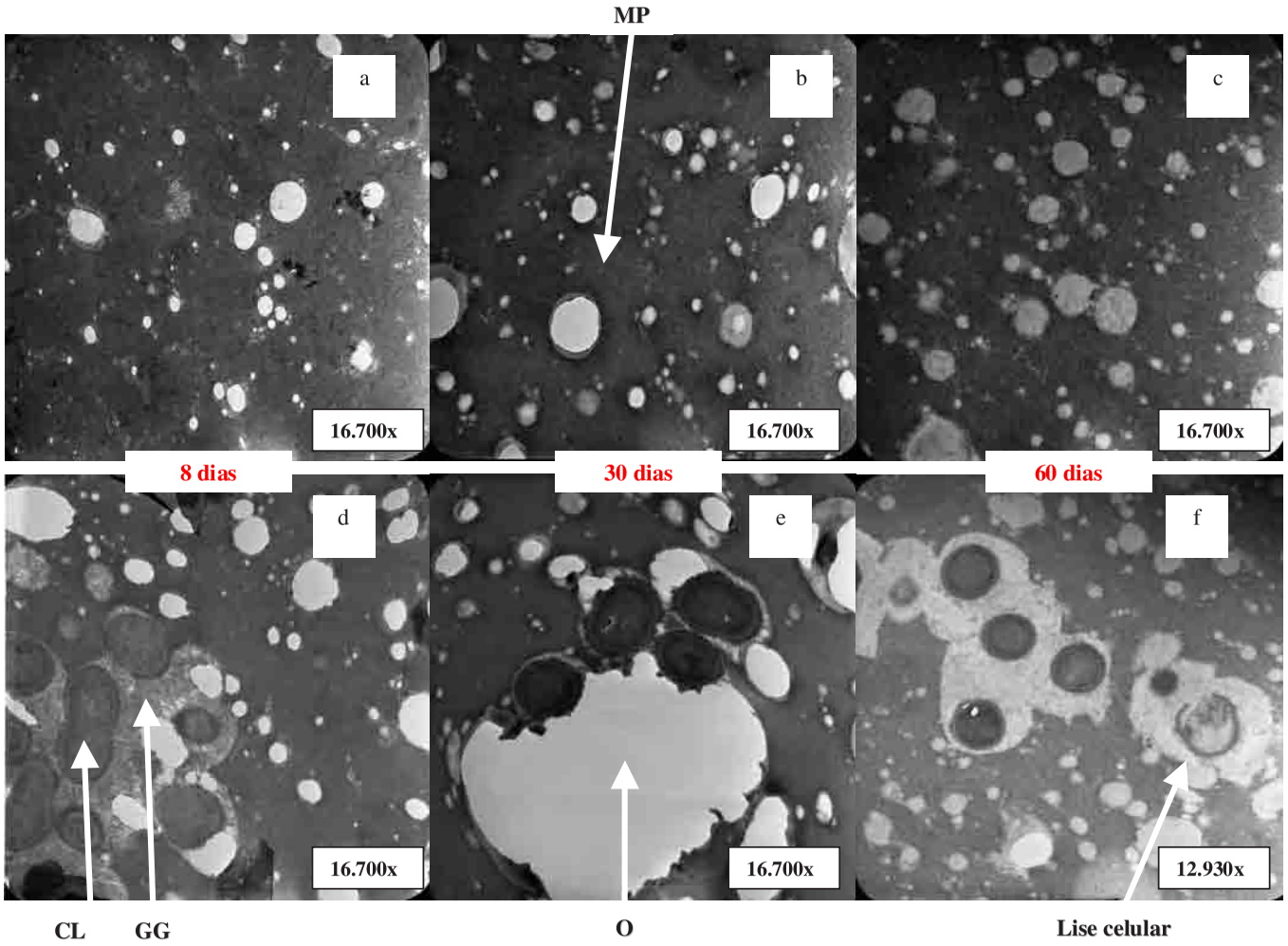


Figura 32 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (C) aos 8, 30 e 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

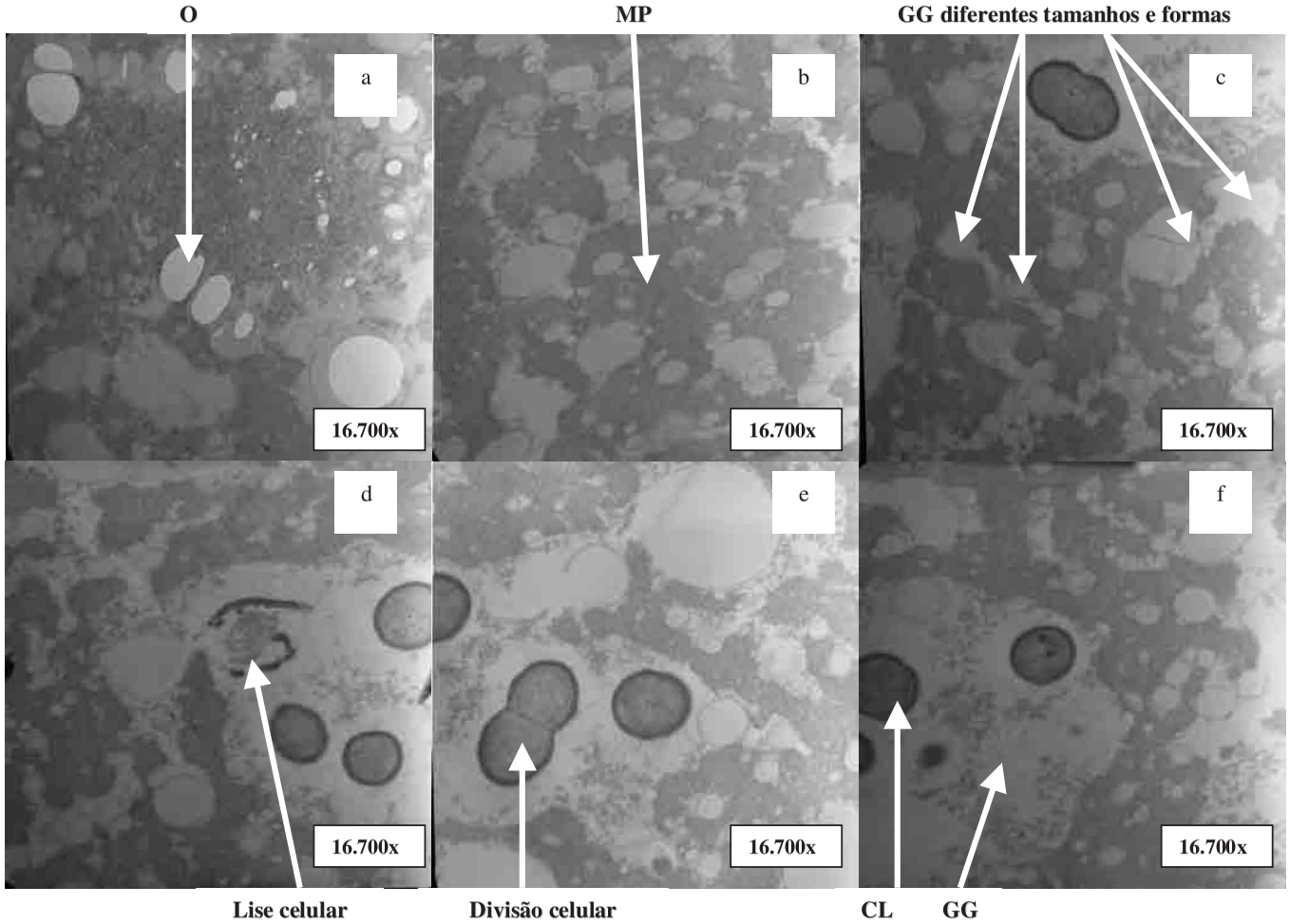


Figura 33 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (D) aos 8 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

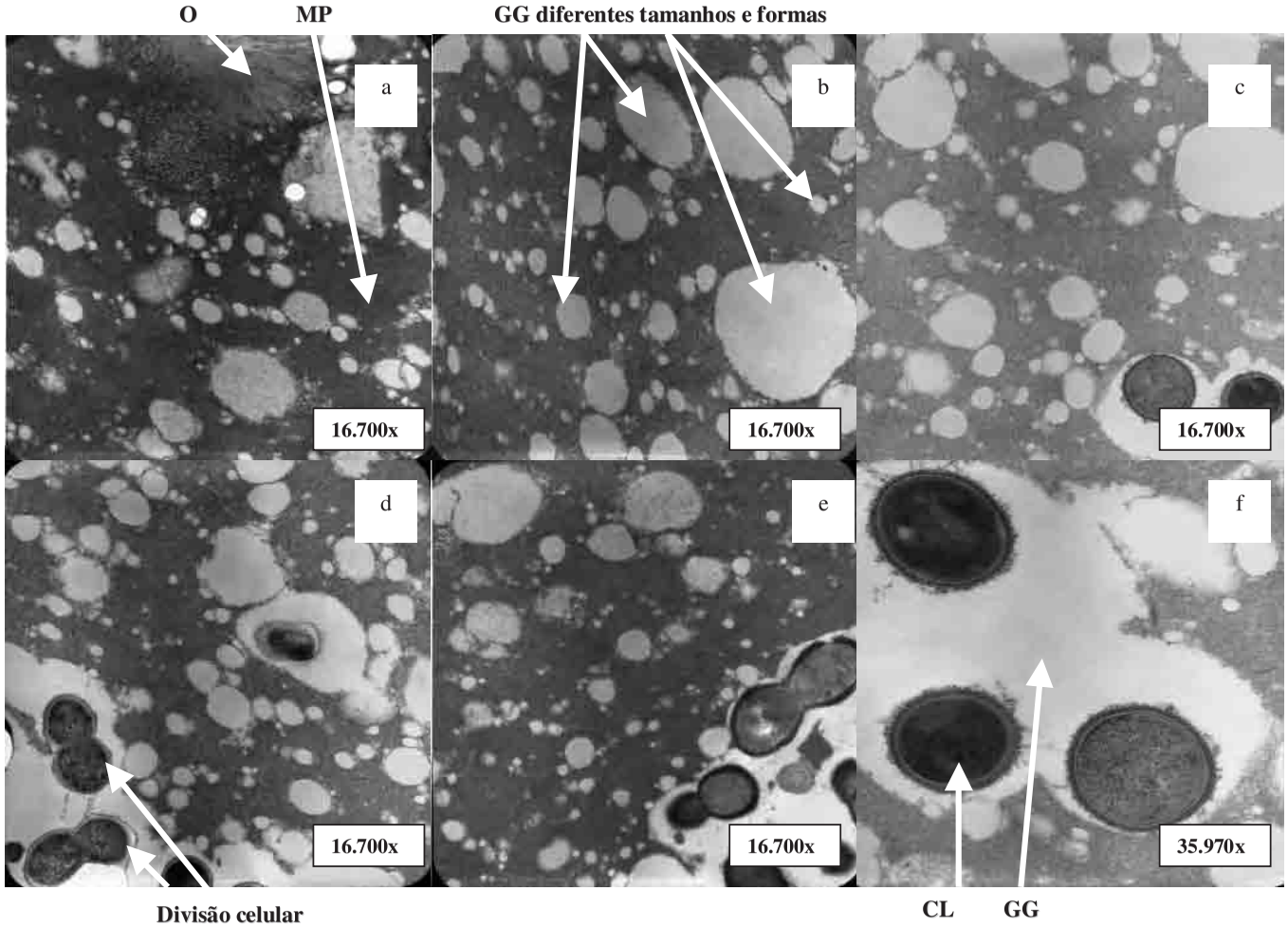


Figura 34 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (D) aos 30 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

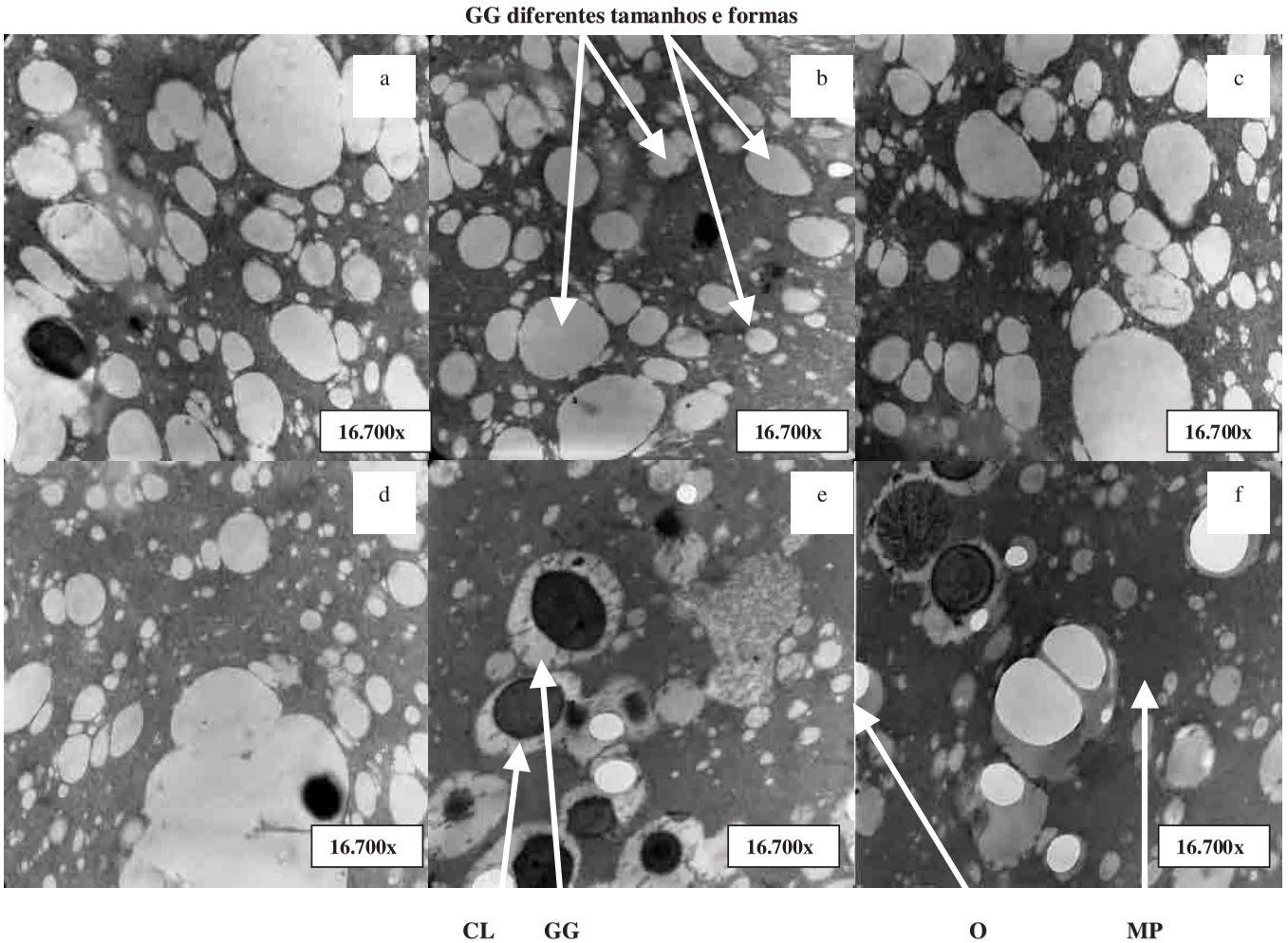


Figura 35 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (D) aos 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

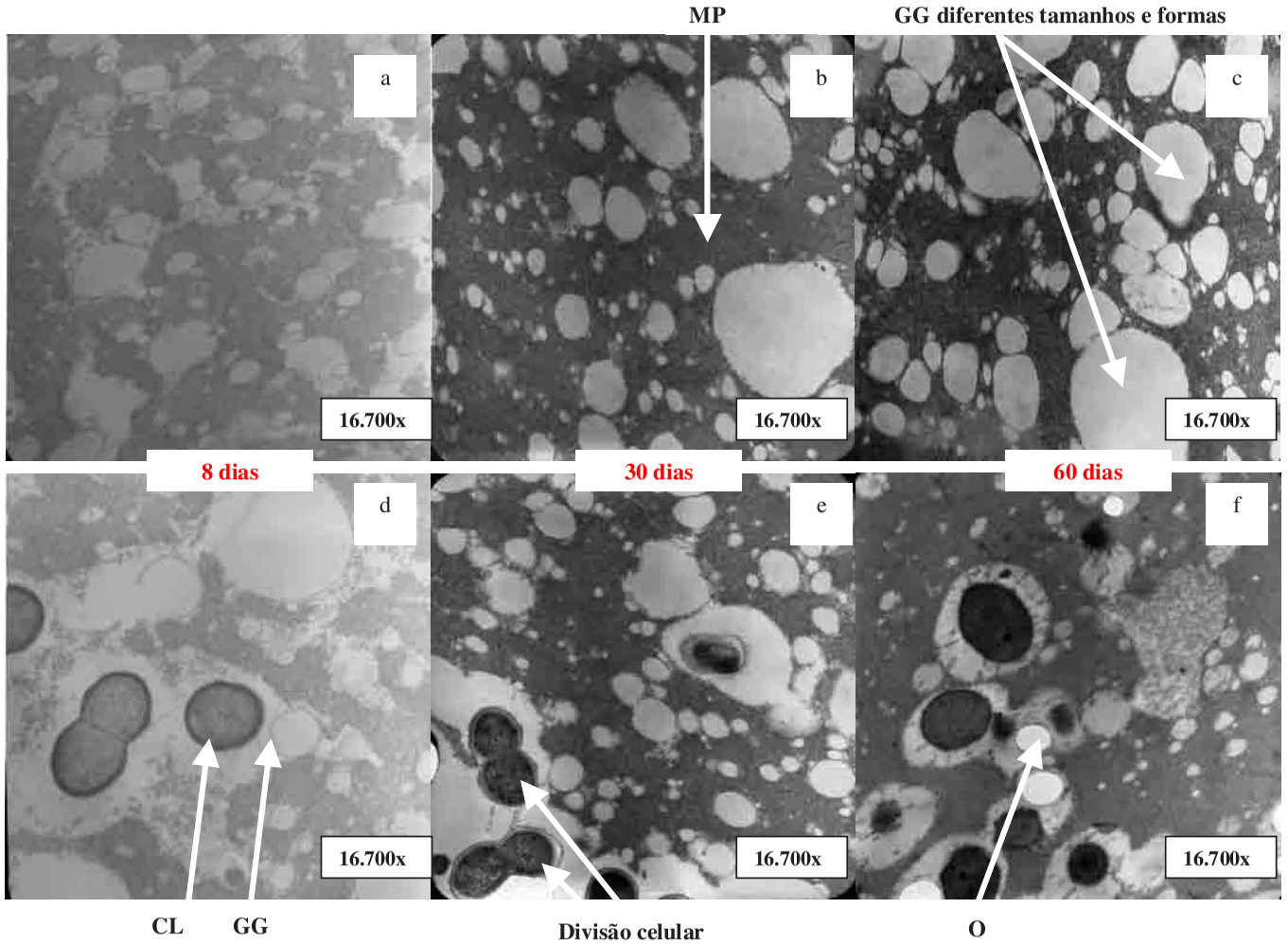


Figura 36 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras do queijo Prato modificado (D) aos 8, 30 e 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

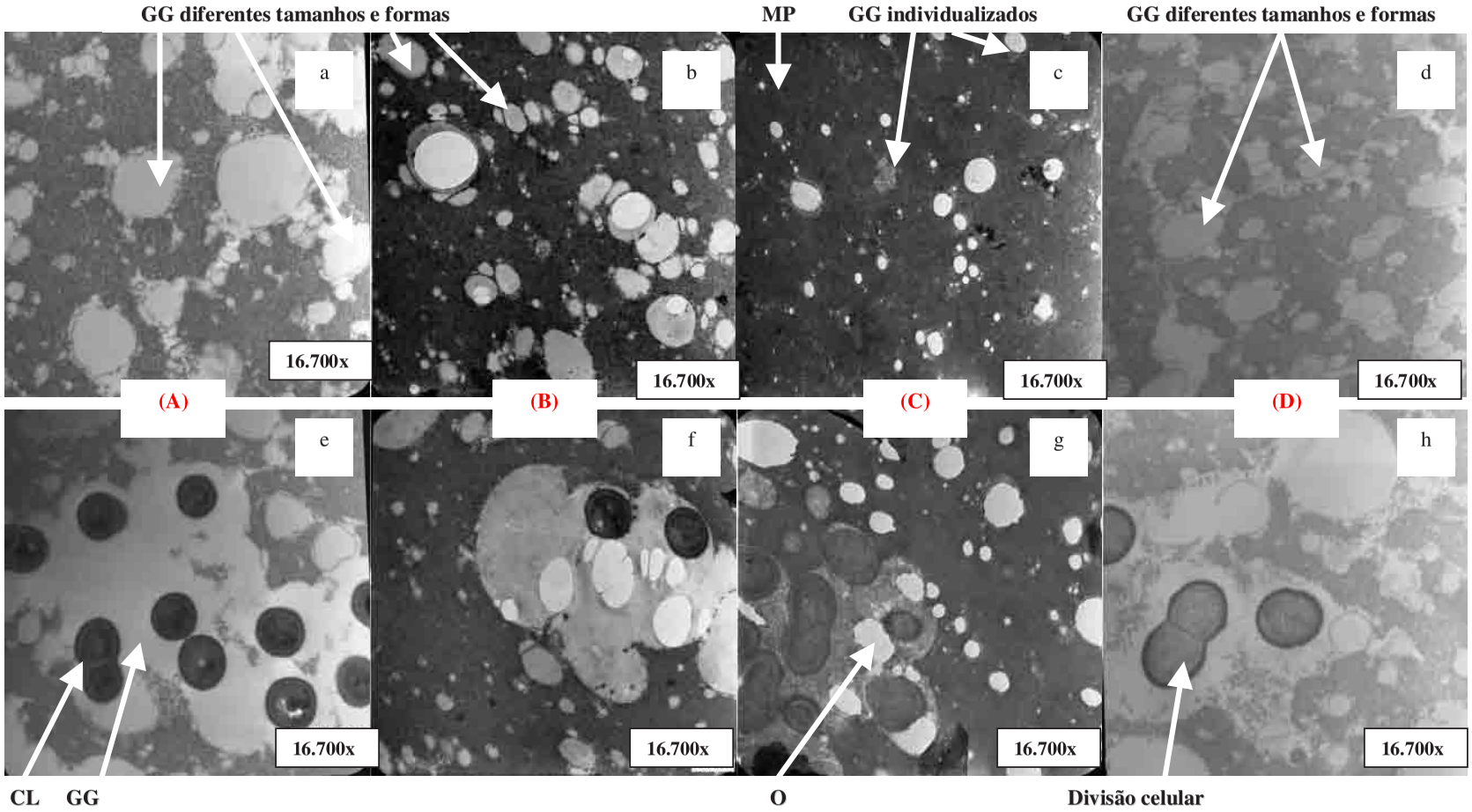


Figura 37 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras dos queijos Prato tradicional (A) e modificados (B, C e D) aos 8 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

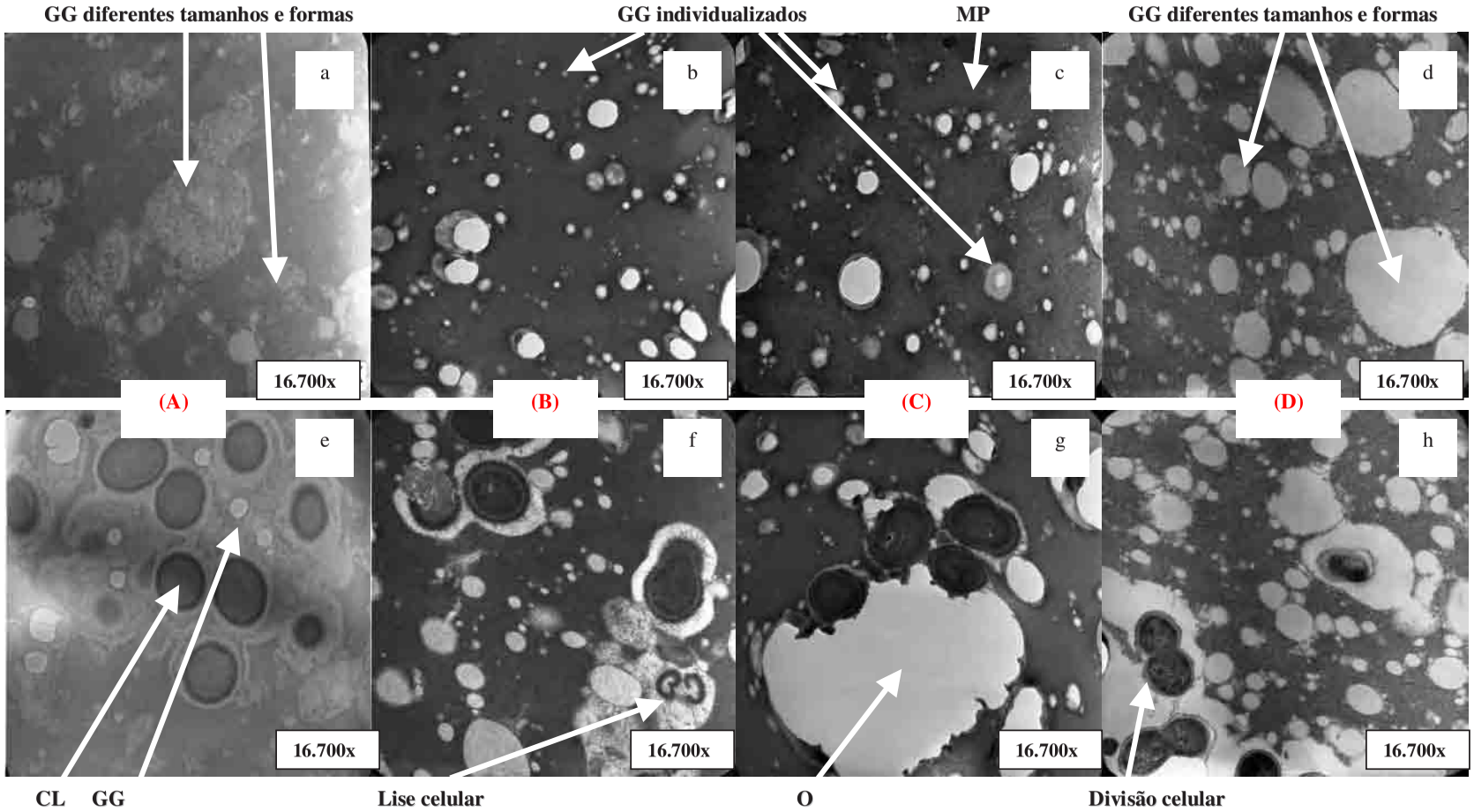


Figura 38 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras dos queijos Prato tradicional (A) e modificados (B, C e D) aos 30 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O).

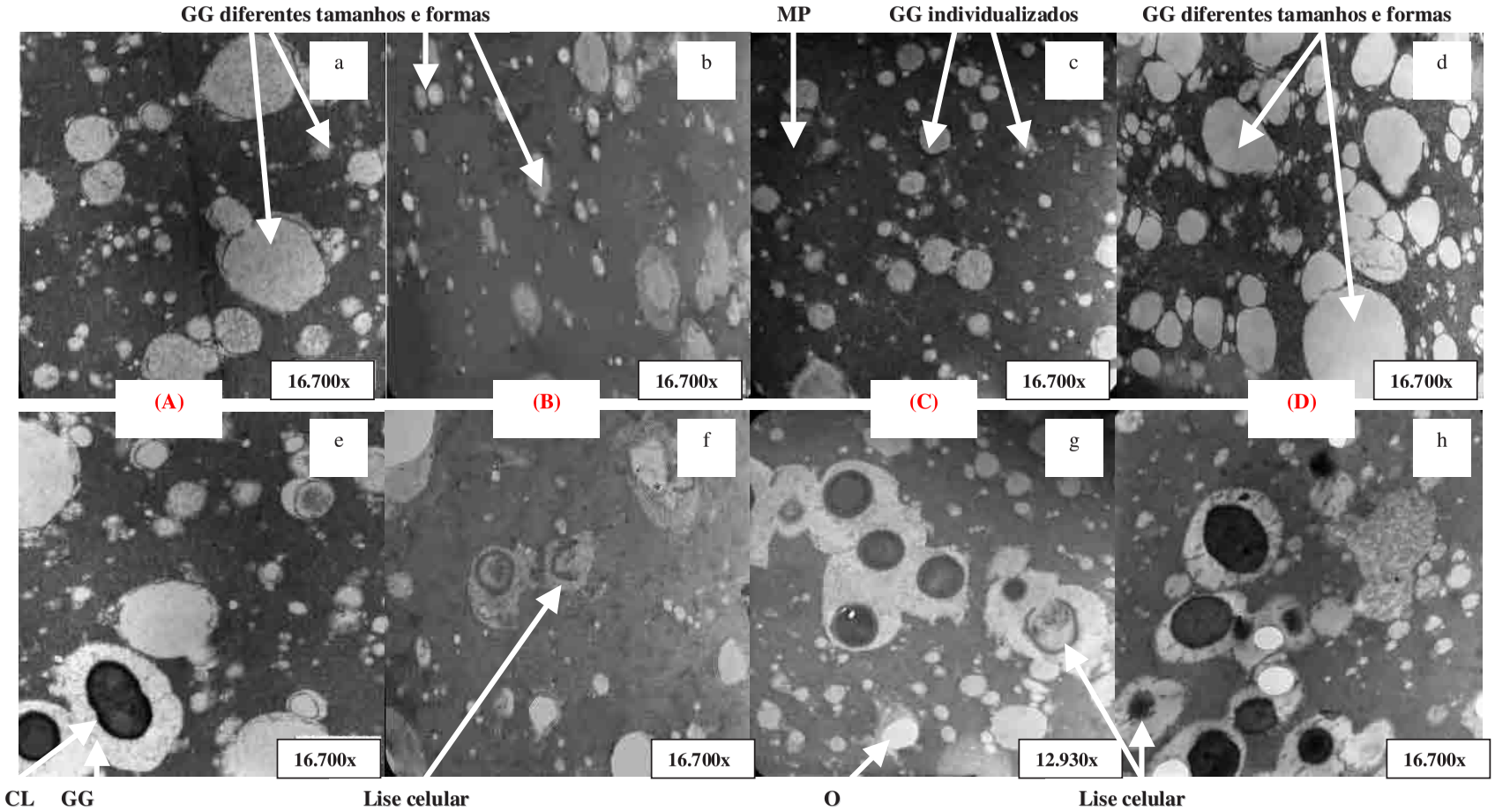


Figura 39 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostras dos queijos Prato tradicional (A) e modificados (B, C e D) aos 60 dias de maturação. Matriz protéica (MP), glóbulo de gordura (GG), cultura lática (CL), outros (O)..

A análise de microestrutura através de microscopia eletrônica de transmissão ilustra as diferenças entre os processamentos de queijo Prato e reforça os resultados obtidos nas demais análises.

5.10 – Resultados da caracterização do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Urea- PAGE)

Os resultados da caracterização do perfil eletroforético dos queijos Prato tradicionais e modificados estão apresentados nas Figuras 40 e 41, indicando as frações de caseína γ_1, γ_3, β, αs_1 e $\alpha s_{1\text{-}I}$, apresentando-se semelhantes aos relatados por SILVA, 1998.

Através do perfil eletroforético das amostras dos queijos Prato tradicional (A) e modificados (B, C e D) observou-se a hidrólise da fração α_{s1}-caseína em $\alpha_{s1\text{-}I}$-caseína e da fração β-caseína em γ_1- e γ_3-caseínas, a partir do primeiro dia de maturação, evidenciando a ação das enzimas quimosina e plasmina, respectivamente. Observou-se também que a degradação da fração α_{s1}-caseína foi mais extensa que a da β-caseína, semelhante ao observado por Silva (2006) em estudos com queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de cultura adjunta.

Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos com queijo Prato. Augusto (2003) analisando o mesmo tipo de queijo fabricado a partir de diferentes tipos de coagulante, observou o desdobramento gradual e crescente da α_{s1}-caseína em $\alpha_{s1\text{-}I}$-caseína com o tempo de maturação, para os queijos dos diversos tratamentos, mostrando a ação residual do coagulante. Gorostiza et al. (2004) observaram que em queijo Prato fabricado com leite não pasteurizado e sem a adição de cultura starter comercial, a fração α_{s1}-caseína foi hidrolisada mais extensivamente, 65%, que a β-caseína, 25%, mostrando que a degradação das frações da caseína ocorreu devido à ação da renina e da plasmina. Mazal (2005) observou diminuição da concentração de α_{s1} e β-caseína ao longo do período de maturação, sendo que os queijos fabricados a partir de leite com baixa contagem de células somáticas apresentaram sempre maior concentração das frações citadas que os queijos fabricados a partir de leite com alta contagem de células somáticas.

Os resultados discordam dos obtidos por Silva (1998) em estudos com adição de enzimas proteolíticas em queijo Prato, que observou que o processamento em que a quantidade de enzima adicionada foi menor, apresentou menor concentração de produtos de degradação da α_{s1} e β-caseína. Observou também que um processamento com menor quantidade de enzima apresentou perfil eletroforético semelhante ao de outro com maior quantidade, provavelmente devido ao menor pH da massa, com maior retenção de coalho e maior quantidade de enzima retida na massa.

Albillos et al. (2006) observaram que em queijos fabricados com leite de ovelha, a β-caseína foi degradada mais lentamente que a α_s-caseína nos estágios iniciais da maturação. Com um tempo de maturação de 69 dias, a fração β-caseína foi degradada mais rapidamente, porém, a porcentagem de hidrólise da fração β-caseína foi menor que a da α_s-caseína, ao final do período de maturação de 139 dias.

Prieto et al. (2002), em estudos com queijo León, fabricado com leite cru, observaram que a fração β-caseína permaneceu praticamente intacta durante o processo de maturação, enquanto que uma diminuição da fração α_{s1}-caseína foi acompanhada pelo aumento da banda $\alpha_{s1\text{-}I}$-caseína, produto de degradação desta fração, até o 15º dia de maturação, seguido de uma diminuição até o final do processo de maturação como conseqüência da degradação deste peptídeo em peptídeos de menor tamanho. Este comportamento foi observado nas amostras de queijo do processamento C aos 60 dias de maturação, no qual a banda referente à fração $\alpha_{s1\text{-}I}$-caseína apresentou ligeira redução.

Fenelon; Guinee (2000) observaram que a fração α_{s1}-caseína foi degradada mais lentamente e a fração β-caseína mais rapidamente quando o conteúdo de gordura do queijo Cheddar foi reduzido, sendo que, a degradação mais lenta da α_{s1}-caseína com a diminuição do conteúdo de gordura, coincidiu com a diminuição da proporção entre a atividade residual da quimosina e a de proteína do queijo. Observaram também um aumento da concentração de γ-caseína quando o conteúdo de gordura foi reduzido, provavelmente devido ao aumento do pH do queijo, que aumenta a atividade da plasmina. As maiores concentrações de γ-caseína também puderam ser observadas nas amostras dos queijos dos processamentos B e C, os quais apresentaram os menores teores de gordura.

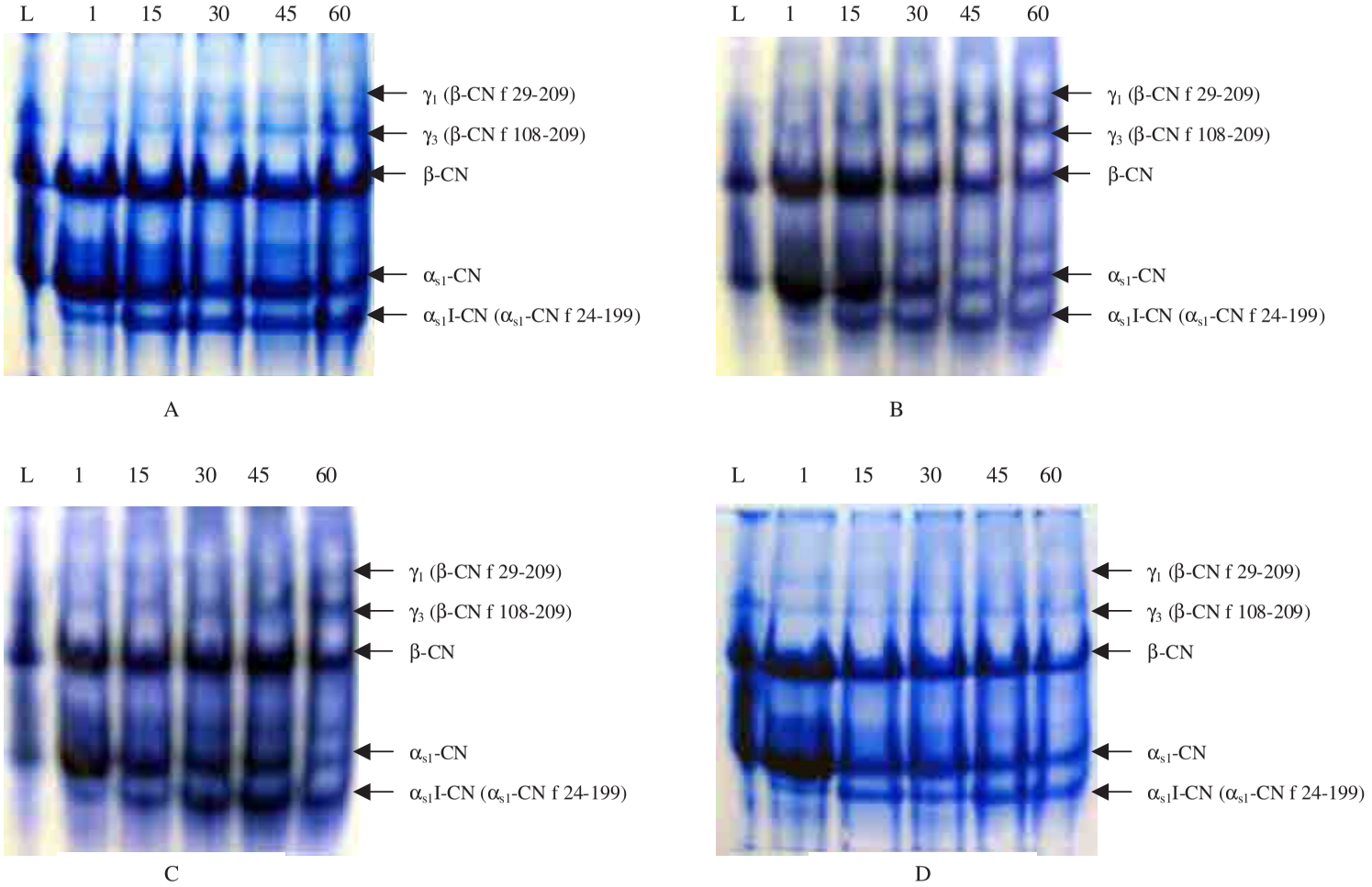


Figura 40 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Urea – PAGE) dos queijos Prato tradicionais (A) e modificados (B, C e D) durante o período de maturação. L – Leite, 1; 15; 30; 45 e 60: Dias de maturação.

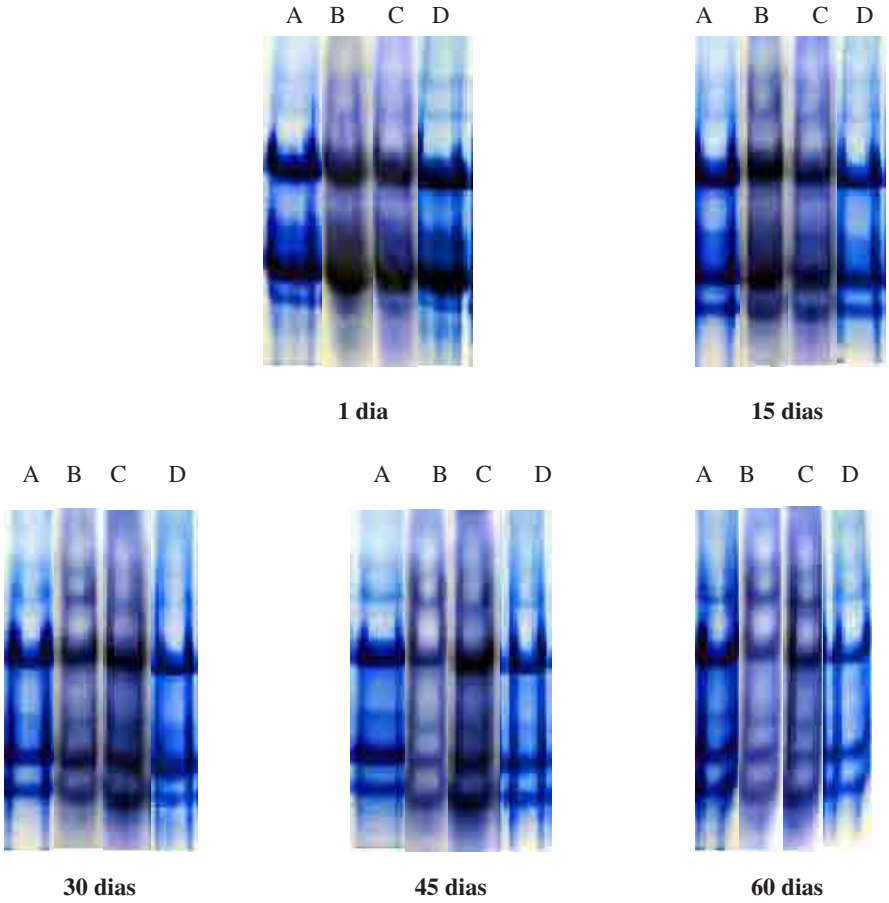


Figura 41 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Urea – PAGE) dos queijos Prato tradicionais (A) e modificados (B, C e D) em cada período de maturação.

As amostras de queijo do processamento B, que apresentaram maiores índices de extensão e profundidade de maturação nas análises físico-químicas, e menor firmeza e maior elasticidade nas análises sensoriais foram as que apresentaram maior degradação das frações α_{s1} e β-caseína durante o período de maturação.

A proteólise primária é caracterizada pelo aparecimento das frações $\alpha_{s1\text{-}I}$ e γ-caseínas, resultantes da hidrólise da α_{s1} e β-caseínas, respectivamente (SILVA, 1998). A quimosina, enzima envolvida na degradação da caseína na fabricação de queijos, também participa da degradação desta proteína durante a maturação, sendo que aproximadamente 6% da quantidade adicionada durante o processamento fica retida no coágulo, mesmo após dessora e prensagem da massa (LAW, 1987; FOX; O´CONNOR;

McSWEENEY, 1996). A quimosina residual hidrolisa, nos estágios iniciais da maturação, a ligação Phe23–Phe24 da α_{s1}-caseína, sendo que os fragmentos resultantes desta degradação são o $\alpha_{s1\text{-}I}$-caseína ou α_{s1}-caseína fração 24-199 e o α_{s1}-caseína fração 1-23. Este fragmento pequeno é então degradado por proteinases das culturas láticas, produzindo pequenos peptídeos, enquanto que o fragmento longo, $\alpha_{s1\text{-}I}$-caseína, é hidrolisado pela quimosina e proteinases (FOX; O´CONNOR; McSWEENEY, 1996). A fração α_{s2}-caseína é mais resistente à hidrólise pela quimosina que a α_{s1}-caseína, sendo que a hidrólise desta fração se restringe à região hidrofóbica da molécula, na seqüência 90-120 e 160-207. Em solução, a quimosina degrada a β-caseína podendo produzir pequenos peptídeos hidrofóbicos, que são amargos (McSWEENEY, 2004).

A plasmina, enzima presente no leite, atua sobre a β-caseína, formando γ_1-, γ_2- e γ_3-caseínas, correspondentes às frações 29-209, 106-209 e 108-209, respectivamente (ALBILLOS et al., 2006), atuando também nas frações α_{s2}-caseína e α_{s1}-caseína em menor proporção, sendo que a κ-caseína parece ser resistente à ação desta protease (BASTIAN; BROWN, 1996).

6 – CONCLUSÕES

- Nos processamentos dos queijos com adição de enzimas proteolíticas a população de microrganismos da cultura mista apresentou decréscimo em um período de 15 dias inferior ao observado no processamento do queijo controle;
- As amostras dos queijos obtidos nos processamentos controle e modificados atenderam os padrões microbiológicos para alimentos, estando aptos ao consumo, e ainda, os queijos puderam ser classificados como de média umidade e "light";
- Durante a maturação houve aumento nos teores de acidez, como resultado da glicólise e dos teores de NS pH 4,6 e NS TCA, como resultado da proteólise;
- Baseado no índice de extensão da maturação (IEM), a adição de enzima durante os processamentos dos queijos modificados promoveu, desde o primeiro dia, aceleração da maturação, sendo que nos processamentos dos queijos modificados B e C, o tempo de maturação pôde ser reduzido em 15 dias;
- O uso de enzimas com baixa atividade, tal como a utilizada no processamento B, resultou em maior proteólise e na melhoria das características físico-químicas, de textura e sensoriais dos queijos. Os queijos em cujo processamento houve adição de enzima não apresentaram diferença significativa em relação ao queijo controle para o parâmetro sensorial de amargor.
- Não se observou diferenças em relação aos parâmetros de cor e de capacidade de derretimento entre as amostras dos queijos controle e modificados;
- Através da caracterização da microestrutura e do perfil eletroforético dos queijos pôde-se ilustrar as diferenças entre os processamentos de queijo Prato e reforçar os resultados obtidos nas demais análises;
- Os resultados apontam o uso da enzima extraída do fruto verde do gravatá (*Bromelia fastuosa*) como uma interessante alternativa para melhoria da qualidade dos queijos Prato com teor reduzido de gordura.

REFERÊNCIAS

ALBILLOS, S. M. et al. Prediction of ripening times of ewe's milk cheese by multivariate regression analysis of capillary electrophoresis casein fraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 21, p. 8281-8287, 2006.

AL-HOOTI, S. N. et al. Chemical composition and quality of date syrup as affected by pectinase/cellulase enzyme treatment. **Food Chemistry**, London, v. 79, n. 2, p. 215-220, 2002.

APPEL, L. J.; MILLER, E. R.; JEE, S. H. Effect of dietary patterns on serum homocysteine – Results of a randomized, controlled feeding study. **Circulation**, Baltimore, v. 102, n. 8, p. 852-857, 2000.

ARDÖ, Y. Flavor and texture in low-fat cheese. In: LAW, B. A. (Ed.), **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. London: Champman & Hall, 1997.

ARDÖ, Y.; MANSSON, H. L. Heat treated lactobacilli develop desirable aroma in low-fat cheese. **Scandinavian Dairy Information,** Helsingborg, v. 4, n. 1, p. 38-40, 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Produção Brasil:** queijos sob inspeção federal, em toneladas. São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.cnpge.embrapa.br>. Acesso em: 22 jul. 2006.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS. **Segurança Alimentar:** Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite, 2002. Disponível em: <http://www.agroportal.pt/a/2002/anil.htm>. Acesso em: 22 jul. 2006

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

ASSUMPÇÃO, E. G. et al. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 3, p. 366-370, 2003.

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. 190f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2003.

AUGUSTO, M. M. M.; QUEIROZ, M. I.; VIOTTO, W. H. Seleção e treinamento de julgadores para avaliação do gosto amargo em queijo Prato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 849-852, 2005.

BAEZA, G.; CORREA, D.; SALAS, C. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 51, n. 1, p. 1-9, 1990.

BALDINI, V. L. S. et al. Alterações das características químicas e de textura do queijo tipo Prato ao longo do processo de maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 304, p. 53-59, 1998.

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

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

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. D. **Experimentação agrícola.** 3. ed. Jaboticabal: FUNESP, 1995.

BASTIAN, E. D.; BROWN, R. G. Plasmin in milk and dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 5, p. 435-457, 1996.

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

BERNER, L. A. Defining the role of milk in balanced diets. In: TAYLOR, S. L. **Advanced in Food and Nutrition Research,** San Diego, v. 37, p. 131-257, 1993.

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

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

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficias para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 ago. 2003. Seção 1, p.14.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 mar. 1996.

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

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

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jan. 2001.

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

BUFFA, M. N. et al. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goat´s milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 11, p. 927-934, 2001.

BULLENS, C.; KRAWEZYH, G.; GEITHMAN, L. Reduced-fat cheese products using carrageenan and microcrystalline cellulose products. **Food Technology,** Chicago, v. 48, n. 1, p. 79-81, 1994.

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

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

CAMPOS, S. D. S. et al. **Reologia e textura em alimentos.** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1989.

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

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

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

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

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

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F. G.; DAVID FERREIRA, J. F. The use of tannic-acid-glutaraldehyde in the study of elastic relates fibers. **Stain Technology**, Baltimore, v. 51, p. 7-11, 1976.

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

CROW, V. L. et al. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 5, n. 8, p. 855-875, 1995.

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

DRAKE, M. A. et al. Sensory evaluation of reduced fat cheeses. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 5, p. 898-901, 1995.

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

EL SODA, M. Acceleration of cheese ripening: Recent advances. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 49, n. 5, p. 395-399, 1986.

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

FARIA, A. X. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo B produzido em uma usina de beneficiamento da zona da mata de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 171-173, 2005.

FARKEY, N. Y. et al. Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase-positive or proteinase-negative starters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 4, p. 874-880, 1990.

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

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

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

FOX, P.F. et al. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P. F. **Cheese:** chemistry, physics and microbiology, London: Chapman & Hall, 1997, p. 389-439, v.1.

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

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

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

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Fabricação de queijo Prato e Minas: estudo do rendimento. Parte I: Determinação das cifras de transição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes,** Juiz de Fora, v. 34, n. 205, p. 3-19, 1979.

GINZINGER, W. et al. Raw milk flora affects composition and quality of Bergkase – 3. Physical and sensory properties, and conclusions. **Lait**, Les Ulis, v. 79, n. 4, p. 411-421, 1999.

GIOMO, A. Tasting the cheese and sensory analysis. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 369, p. 30-33, 2001.

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

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

GUTIERREZ, E. M. R. et al. Efeito da radiação gama nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo Prato durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 596-601, 2004.

HARTE, F. et al. Low fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 1074-1082, 2003.

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

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

INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES. **Apostila de tecnologia de fabricação de queijos**. Juiz de Fora, 1977.

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

JACK, F. R.; PATERSON, A. Texture of hard cheeses. **Food Science and Technology**, London, v. 8, p. 161-164, 1992.

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

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

KANAWJIA, S. K. et al. S. Flavour, chemical and textural profile changes in accelerated ripened Gouda cheese. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, n. 6, p. 577-583, 1995.

KASHKET, S.; DEPAOLA, D. P. Cheese consumption and the development and progression of dental caries. **Nutrition Reviews**, New York, v. 60, n. 4, p. 97-103, 2002.

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

KHEADR, E. E. et al. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 5, p. 435-446, 2002.

KIRBY, C. K. Maduracion acelerada de quesos. **Revista Española de Lecheria**, Madrid, v. 11, p. 42-49, 1989.

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

LAW, B. A. Formation of methanethiol by bacteria isolated from raw-milk and Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research,** Cambridge, v. 45, n. 2, p. 267-275, 1978.

LAW, B. A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese:** chemistry, physics and microbiology. General aspects. London: Elsevier Applied Science, 1987. p. 365-400.

LAW, B. A.; KING, J. The use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research,** Cambridge, v. 52, n. 1, p. 183-188, 1985.

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

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

LEITE, T. D; PITARELLO, J.; PENNA, A. L. B. Aceleração da maturação de queijo prato pelo uso de enzima proteolítica do fruto verde de gravatá (*Bromelia fastuosa*). In: Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, 4., 2003, Valparaiso. **Resumenes ...**Valparaiso: Univerisdad Técnica Federico Santa Maria, 2003. p. 65.

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

LEITE JUNIOR, A. F. S. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração. **Higiene alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 73, p. 53-59, 2000.

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

LOPEZ, C.; CAMIER, B.; GASSI, J. Y. Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 3, p. 235-247, 2007.

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

MARCOS, A. et al. Crioscopic measurement of water activity of cheese. **Food Chemistry**, London, v. 30, n. 1, p. 59-66, 1988.

MAZAL, G. **Efeito da contagem de células somáticas do leite na fabricação de queijo Prato.** 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

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

McSWEENEY, P. L. H. The flavour of milk and dairy products: III. Cheese: taste. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 50, n. 4, p. 123-128, 1997.

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

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

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

MISTRY, V. V.; ANDERSON, D. L. Composition and microstructure of commercial full fat and low fat cheeses. **Food Structure**, Chicago, v. 12, n. 2, p. 259-266, 1993.

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

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

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

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

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

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

NEVES-SOUZA, R. D.; SILVA, R. S. S. F. Estudo de custo-rendimento do processamento de queijos tipo Minas frescal com derivado de soja e diferentes agentes coagulantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 170-174, 2005.

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

O´DONOVAN, C. M. et al. An investigation of the autolysis properties of three lactococcal strains during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 11-12, p. 1149-1165, 1996.

OBARZANEK, E.; SACKS, F. M.; VOLLMER, R. M. Effect on blood lipids of a blood pressure-lowering diet the dietary approaches to stop hypertension (DASH) trial. **American Journal of Clinical Nutrition,** New York, v. 74, n. 1, p. 80-89, 2001.

OLIVA NETO, P. O.; CERON, C. R.; ROMANELLI, P. F. Determinação da composição química do gravatá (*Bromelia fastuosa*). In: Colóquio de Incentivo à Pesquisa, 13., 1986, São José do Rio Preto. **Anais ...** São José do Rio Preto: UNESP, 1986, p. 38.

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

OLIVEIRA, R. P. S. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba – SP**. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

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

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

PENNA, C. F. A. M. et al. **Determinação da densidade do leite.** Belo Horizonte: UFMG, 2001. Disponível em:<http://www.vet.ufmg.br/Tecnologia/Inspecao_leite/Documentos_/00000001/Arquivos/densidade.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2006.

PEREIRA, M. L. et al. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 51, n. 5, p. 427-431, 1999.

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

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

PIZAIA, P. D. et al. Composição, proteólise, capacidade de derretimento e formação de "blisters" do queijo Mussarela obtido pelos métodos tradicional e de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 485-491, 2003.

PRIBILA, B. A.; HERTZLER, S. R.; MARTIN, B. R. Improved lactose digestion and intolerance among African-American adolescent girls fed a dairy-rich diet. **Journal of the American Dietetic Association,** Chicago, v. 100, n. 5, p. 524-528, 2000.

PRIETO, B. et al. Proteolytic and lipolytic changes during the ripening of León raw cow's milk cheese, a Spanish traditional variety. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 661-671, 2002.

RODRIGUEZ, J. et al. Effect of different membrane separation technologies (ultrafiltration and microfiltration) on the texture and microstructure of semihard low-fat cheeses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 47, n. 2, p. 558-565, 1999.

ROHM, H.; JAROS, D. Colour of hard cheese-2. Factors of influence and relation to compositional parameters. **European Food Research and Technology**, Springer, v. 204, n. 4, p. 259–264, 1997.

ROMANELLI, P. F.; TORRES-QUEIROZ, E. L. M.; CERON, C. R. Caracterização preliminar da enzima proteolítica do gravatá (*Bromelia fastuosa*). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 120-133, 1994.

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

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

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

SCOTT, T. **Cheesemaking pratice**, 2. ed., New York: Elsevier Applied Science, 1986.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUAREZ, F. L.; ADSHEAD, J.; FURNE, J. K. Lactose maldigestion is not an impediment to the intake of 1500 mg calcium daily as dairy products. **American Journal of Clinical Nutrition,** New York, v. 68, n. 5, p. 1118-1122, 1998.

TANIWAKI, M. H.; VAN DENDER, A. G. F. Bolores produtores de toxinas em queijos: ocorrência e significado. **Coletânea do ITAL,** Campinas, v. 21, n. 2, p. 187-200, 1991.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. 1997.

TUNICK, M. H. et al. Rheology and microstructure of low-fat mozzarella cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 3, n. 7, p. 649-662, 1993.

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

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

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

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

VELOZO, E. S. et al. **Química do leite:** teoria da prática. Salvador: UFBA, s.d. Disponível em: <http://www.lapemm.ufba.br/leite.htm>. Acesso em: 22 jul. 2006.

VISSER, S. Enzymatic breakdown of milk proteins during cheese ripening. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 332, p. 20-24, 1998.

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

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

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and others organs. **Laboratory Investigation**, Hagerstown, v. 12, p. 131-155, 1978.

WILKINSON, M. G. Acceleration of cheese ripening. In: Fox, P. F. (Ed.), **Cheese:** chemistry, physics and microbiology. New York: Champman & Hall, v. 1, p. 523-556, 1993.

WILKINSON, M. G. et al. Effects of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. **Lait,** Les Ulis, v. 72, n. 5, p. 458-459, 1992.

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