



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

Vivian Ribeiro Diamantino

Estudo do comportamento de diferentes tipos de amido em presença de caseína e
aplicação de amido em queijo fresco *light* como repositor de gordura

São José do Rio Preto
2018

Vivian Ribeiro Diamantino

Estudo do comportamento de diferentes tipos de amido em presença de caseína e aplicação de amido em queijo fresco *light* como repositor de gordura

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

Financiadora: CAPES

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi Franco

São José do Rio Preto
2018

Diamantino, Vivian Ribeiro

Estudo do comportamento de diferentes tipos de amido em presença de caseína e aplicação de amido em queijo fresco light como repositor de gordura / Vivian Ribeiro Diamantino. -- São José do Rio Preto, 2018.

132 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna

Coorientador: Célia Maria Landi Franco

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Queijo. 3. Gordura. 4. Amido. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 637.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Vivian Ribeiro Diamantino

Estudo do comportamento de diferentes tipos de amido em presença de caseína e aplicação de amido em queijo fresco *light* como repositor de gordura

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr^ª. Walkiria Hanada Viotto
FEA / UNICAMP – Campinas

Prof. Dr^ª. Vânia Regina Nicoletti Telis
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr^ª. Grazielle Aparecida Chiuchi Garcia
UNILAGO – São José do Rio Preto

Prof. Dr^ª. Ana Carolina Conti e Silva
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
01 de fevereiro de 2018

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Maria Teresa e Marcos,
por serem minha eterna inspiração.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna, pela oportunidade, paciência, amizade e orientação em todas as etapas do desenvolvimento deste projeto e à minha co-orientadora Dr^a. Célia Maria Landi Franco pelos conselhos valiosos.

Aos meus pais, Maria Teresa e Marcos por todo amor e dedicação e por estarem sempre ao meu lado, me dando força para seguir em frente e alcançar meus objetivos. À minha irmã, Vanessa, por ter sido minha companheira, não só ao longo da vida, como também durante o período do Doutorado, sempre me ajudando nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos do Laboratório de Leite e Derivados: Taís, Sabrina, Aline Souza, Carol e Bruna e aos amigos de outros laboratórios Mariana, Tatiane, Samara, Flávia, Marília e Márcia pela amizade, auxílio no laboratório e momentos de descontração, que tornaram esta longa caminhada muito mais feliz e prazerosa.

Em especial, ao amigo Walisson que contribuiu diretamente para a realização de todas as etapas desse projeto, sempre com disposição e bom humor.

Aos amigos, que mesmo longe, possuíram um papel muito importante nesta etapa em minha vida, contribuindo de diferentes formas para que eu chegasse até aqui: Augusto, Felipe, Ana Beatriz, Luana, Aline de Paula, Cecília, Kelly e Bruno.

À CAPES pela disponibilização de bolsa ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Ao Centro de Microscopia e Microanálise do IBILCE – UNESP, São José do Rio Preto – S.P., ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e à Prof^a. Dr^a. Patrícia Simone Leite Vilamaior, pelo auxílio na captura e interpretação das imagens de microscopia.

Aos técnicos Luíz Camolezzi, Luíz Falleiros, Alana, Tânia e Ginaldo, pelo auxílio nas mais diferentes situações no laboratório e nas análises requeridas.

À Prof^a. Dr^a. Walkiria Hanada Viotto e à Prof^a. Dr^a Vânia Regina Nicoletti Tellis, pelas valiosas sugestões durante o exame geral de qualificação.

Finalmente, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A redução do teor de gordura afeta principalmente a textura dos queijos, assim como o sabor e o rendimento de produção. O uso de repositores de gordura é uma das estratégias que vem sendo utilizadas para melhorar a qualidade de queijos com reduzido teor de gordura. O amido pode atuar como repositor de gordura melhorando a textura dos queijos em função de sua alta capacidade de retenção de água. No entanto, embora existam trabalhos que estudaram o amido como repositor de gordura em diferentes queijos, são escassos os trabalhos que estudaram o amido como repositor de gordura em queijos frescos. Neste trabalho, o objetivo foi estudar o comportamento de diferentes tipos de amidos de milho: nativos (comum - RMS, ceroso - WMS e com alto teor de amilose - HAMS) e modificados (acetilado/adipato - AAMS e hidroxipropilado/fosfatado - HPMS) em presença de caseína, selecionar os tipos mais promissores como repositores de gordura em queijos e avaliar os efeitos nas características físico-químicas, de textura de microestrutura e sensoriais de queijo fresco *light*. Para isso, foram produzidas dispersões de caseína e amido em diferentes proporções simulando as concentrações normalmente utilizadas para os repositores de gordura em queijos (0,5, 1,0 e 1,5%) e considerando a proporção de caseína no leite (2,5%). Nas dispersões de caseína/amido, foram realizadas as análises de propriedades de pasta e térmicas, poder de inchamento e solubilidade, assim como análises de quantificação de amido no soro e de microscopia em coágulos de queijo adicionados de amido. A partir dos resultados, selecionou-se dois amidos para aplicação em queijo. Foram produzidas as seguintes formulações: queijo fresco com teor reduzido de gordura, sem adição de amido (C), queijo fresco com teor reduzido de gordura e adição de 1% de AAMS (A) e queijo fresco com teor reduzido de gordura e adição de 1% de HPMS (H). Nos queijos, foram avaliados: composição centesimal, rendimento, acidez e sinérese, perfil de textura, microestrutura (por Microscopia Confocal de Varredura a Laser) e teste de aceitação (aparência, aroma, textura, sabor e aceitação global). Nas misturas de caseína e amido, no geral, com o aumento da concentração de amido na mistura, os amidos modificados apresentaram menores temperaturas de pico e baixos valores de variação de entalpia, necessitando de baixa temperatura para a gelatinização. Apresentaram ainda, menor tendência à retrogradação, alto poder de

inchamento e boa resistência às condições de processo. Ambos exibiram alta retenção na matriz de caseína, com baixíssima perda de amido no soro, além de permanecerem incorporados à matriz de caseína, comportando-se como um material de enchimento. Portanto, os amidos modificados foram considerados potenciais repositores de gordura e selecionados para a produção de queijo fresco com teor reduzido de gordura. Nos queijos, os amidos afetaram principalmente a dureza e a mastigabilidade. A dureza (N) foi consideravelmente menor para H ($2,58 \pm 1,50$) do que para A ($15,67 \pm 4,28$), quando comparada à C ($29,32 \pm 4,97$). A mesma tendência foi observada para a mastigabilidade (N): $0,91 \pm 0,60$ (H), $7,79 \pm 2,50$ (A) e $16,03 \pm 3,74$ (C). Além disso, os queijos do tratamento H também apresentaram o maior teor de umidade ($71,54 \pm 1,98\%$) quando comparado com A ($63,43 \pm 2,97\%$) e C ($59,67 \pm 0,79\%$), o que destaca a maior capacidade de retenção de água do HPMS, devido à sua base cerosa. No entanto, os consumidores gostaram moderadamente da textura ($7,22 \pm 1,38$) do queijo A, enquanto que desgostaram levemente da textura do queijo H ($4,69 \pm 2,08$) e de suas demais características sensoriais, em função de seu acentuado sabor ácido e de sua textura extremamente macia, mais semelhante à de um creme de queijo. Assim, o amido AAMS pode ser considerado um potencial repositore de gordura para queijos frescos, uma vez que diminuiu significativamente a dureza do queijo e teve uma boa aceitação de suas características sensoriais, podendo, desta forma, contribuir para a melhora da qualidade geral de queijos frescos com teor reduzido de gordura. Além disso, em função das características do amido HPMS observadas, estudos adicionais com a aplicação desse amido em queijos espalháveis (como cream cheese, creme de ricota ou creme de queijo fresco), assim como a caracterização físico-química, de textura, microbiológica e sensorial desses novos produtos, pode auxiliar na produção de queijos espalháveis *light*, de boa qualidade. Assim, o conhecimento obtido pode contribuir para o desenvolvimento de novas formulações para diferentes tipos de queijos frescos com teor reduzido de gordura, a serem lançados no mercado.

Palavras-chave: Queijo frescal; queijo com teor reduzido de gordura; amido modificado; propriedades de pasta; textura; microestrutura.

ABSTRACT

Reduction of fat content mainly affects the texture of cheese, as well as its flavor and yield. The use of fat replacers is one of the strategies that have been used to improve the quality of low fat cheeses. Starch may act as a fat replacer by improving the texture of cheeses due to its high water holding capacity. However, although there are studies on starch as a fat replacer in different cheeses, there are few studies that have been studied starch as a fat replacer in fresh cheeses, such as the traditional Brazilian fresh cheese. Therefore, the aim of this research was to study the behavior of different types of maize starches: native (common - RMS, waxy - WMS, and high amylose - HAMS) and modified (acetylated/adipate - AAMS and hydroxypropylated/phosphate - HPMS) in the presence of casein and to evaluate the effects of starch as fat replacer on the physico-chemical, texture, microstructure and sensorial characteristics of a reduced-fat Minas fresh cheese. Dispersions of casein and starch in different ratios were produced simulating the concentrations normally used for fat replacers in cheese (0.5, 1.0 and 1.5%), and the proportion of casein in milk (2.5%). Casein/starch dispersions were then analyzed for pasting properties, thermal properties, swelling power and solubility. There were also analyzed starch retention in casein matrix and microscopy of cheese curds added of starch. Reduced-fat cheeses were also produced with the starches selected in the previous tests. Three different formulations of fresh cheese were produced: a reduced fat control cheese without starch (C), a reduced fat cheese with 1% AAMS (A), and a reduced fat cheese with 1% HPMS (H). There were evaluated in the cheeses: gross composition, yield, acidity and syneresis on the storage time, instrumental texture profile, microstructure (Confocal Laser Scanning Microscopy) and sensory acceptability (appearance, aroma, texture and taste, as well as the overall acceptability). In the mixtures of casein and starch, generally, as starch concentration increased, the modified starches presented lower peak temperatures and low values of enthalpy variation, requiring low gelatinization temperatures. They also showed a lower tendency to setback, high swelling power and good resistance to processing conditions. Then, both starches showed high retention in the casein matrix, with very low starch loss in whey, besides being incorporated into the casein matrix, behaving like a filler, as observed by the microstructure of gels. Consequently, the modified starches were selected for the production and analysis of the

characteristics of reduced fat fresh cheeses. In cheeses, starch addition mainly affected hardness and chewiness. Hardness (N) significantly decreased, being more intense for H (2.58 ± 1.50) than for A (15.67 ± 4.28), when compared to C (29.32 ± 4.97). The same tendency was observed for chewiness (N): 0.91 ± 0.60 (H), 7.79 ± 2.50 (A), and 16.03 ± 3.74 (C). In addition, H cheeses also presented the highest moisture content (71.54 ± 1.98 %) when compared to A (63.43 ± 2.97 %), and C (59.67 ± 0.79 %), which highlights the highest water binding capacity of HPMS, possibly due to its waxy base. However, consumers moderately liked the texture (7.22 ± 1.38) of A cheese and generally slightly disliked H texture (4.69 ± 2.08) and its overall sensory characteristics, due to its high acidic flavor and its extremely soft texture that was more similar to a spreadable cheese than to a fresh cheese. Therefore, AAMS could be considered a potential fat replacer for fresh cheeses, as it significantly decreased cheese's hardness and had a good acceptability of its sensory characteristics, which may contribute to the improvement of the overall quality of reduced fat fresh cheeses. Furthermore, due to its intrinsic characteristics observed in this paper, additional studies of HPMS addition in spreadable cheeses (e.g. cream cheese, cottage cheese plain, or fresh cheese plain) and the study of their fisicochemical, textural, microbiological and sensorial characteristics may contribute to the development of high-quality reduced-fat spreadable cheeses. Thus, the knowledge obtained in the present work may contribute to the development of new formulations for different types of reduced-fat fresh cheeses, to be produced by the industry.

Keywords: fresh cheese; reduced-fat cheese; modified starch; pasting properties; texture; microstructure.

ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS

Este trabalho foi organizado em quatro capítulos para melhor distribuição e compreensão dos assuntos abordados. O capítulo I compreende a introdução e justificativa do trabalho, assim como a revisão bibliográfica do tema abordado. O capítulo II compreende a primeira parte do projeto, que consiste no estudo das características de diferentes amidos de milho (comum, ceroso, com alto teor de amilose, acetilado/adipato e hidroxipropilado/fosfatado) em dispersões com a caseína, assim como no estudo de retenção de amido na matriz de caseína e da microestrutura de coágulos de queijos contendo amido. Este capítulo foi redigido na forma de um artigo científico, em inglês, a ser submetido à publicação em periódico internacional. O capítulo III compreende a produção de queijos do tipo frescal, com teor reduzido de gordura e adicionados de amido e a avaliação dos efeitos do amido como repositor de gordura nas características físico-químicas, de textura, de microestrutura e sensoriais dos queijos. Este capítulo foi também redigido na forma de artigo científico, em inglês, a ser submetido à publicação em periódico internacional. O capítulo IV compreende as conclusões gerais obtidas com o presente trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - Comportamento do amido na presença de caseína e aplicação de amido como repositor de gordura em queijo fresco light	18
---	-----------

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Queijo fresco	22
3.2 Queijos com teor reduzido de gordura	24
3.3 Repositores de gordura	26
3.4 Amido: estrutura e características	28
3.5 Caseína: estrutura e características	36
3.6 Interação amido/caseína	41
3.7 Aplicação de repositores de gordura, à base de amido, em queijos	47
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

CAPÍTULO II - Starch as a potential fat replacer for application in cheese: behavior of different starches in casein/starch mixtures and in the casein matrix	58
--	-----------

1 Introduction	60
2 Material and methods	63
2.1 Materials	63
2.2 Study of starch properties in the presence of casein	64
2.2.1 Preparation of casein/starch mixtures	64
2.2.2 Pasting properties	64
2.2.3 Thermal properties	65
2.2.4 Swelling power	66
2.3 Study of starch interaction with casein matrix	66
2.3.1 Preparation of curd samples	66
2.3.2 Microstructural analysis	67
2.3.3 Starch content analysis	68
2.4 Statistical analysis	69
3 Results and discussion	70
3.1 Study of starch properties in the presence of casein	70
3.1.1 Pasting properties	70
3.1.2 Thermal properties	76
3.1.3 Swelling power	82
3.2 Starch behavior within casein matrix	85

3.2.1 Microstructural analysis	85
3.2.2 Starch content analysis	87
4 Conclusions	88
Acknowledgments	89
Declaration of interest	89
References	89

CAPÍTULO III - Effect of modified maize starches as fat replacers on textural, microstructural and sensory characteristics of a reduced-fat fresh cheese

94

1. Introduction	96
2. Material and methods	98
2.1. Material	98
2.2. Preliminary tests of cheese production with modified maize starch addition	99
2.3. Production of low fat fresh cheese	100
2.4. Chemical composition and physicochemical analyzes of the low-fat cheese samples	101
2.5. Texture profile analysis (TPA)	102
2.6. Microstructural analysis	102
2.7. Microbiological analyses	103
2.8. Sensory acceptability test	103
2.9. Statistical analyses	104
3. Results and discussion	105
3.1. Chemical composition and physicochemical analyzes of milk and cheese	105
3.2 Texture profile analysis (TPA)	110
3.3. Microstructure	112
3.4. Sensory Acceptability	115
4. Conclusions	117
Acknowledgements	118
References	118

CAPÍTULO IV - Conclusão Geral

126

ANEXOS

129

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Table 1. Pasting properties of starch, CN and CN/starch dispersions.....	73
Table 2. Gelatinization temperatures: onset (T_o), peak (T_p), and conclusion (T_c), and gelatinization enthalpy (ΔH_{gel}) of starch samples, CN and CN/starch dispersions.....	79
Table 3. Retrogradation temperatures: onset (T_o), peak (T_p) and conclusion (T_c), retrogradation enthalpy (ΔH_{ret}) and retrogradation rate (% R) of starch, CN and CN/starch dispersions	81
Table 4. Swelling power of starch, CN, and CN/starch dispersions at different temperatures.....	82
Table 5. Starch content in whey and starch retention in curds produced with modified starches.....	87

Capítulo III

Table 1. Chemical composition and yield of reduced-fat cheese samples.....	106
Table 2. Texture profile of reduced-fat cheese samples at 10 days of storage.....	111
Table 3. Sensory acceptability of reduced-fat cheeses at 10 days of storage.....	115

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Estrutura das moléculas de amilose (A) e amilopectina (B).....	29
Figura 2. Estrutura semicristalina do amido formada pelas regiões amorfas e cristalinas....	30
Figura 3. Esquema da interação entre as micelas de caseína: (a) micelas de caseína estericamente estabilizadas pela camada de caseinomacropeptídeo - CMP; (b) micelas de caseína após remoção da camada de CMP pela quimosina, resultando na aproximação das superfícies micelares.....	40
Figura 4. Perfil de pasta do amido de arroz ceroso (10% p/p) com proteínas do leite (10% p/p).....	45

Capítulo II

Figure 1. Pasting profile of casein:starch dispersions. Samples are casein in mixtures with: regular maize starch – RMS (A), waxy maize starch – WMS (B), acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS (C), hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS (D), and high-amylose maize starch – HAMS (E), in the proportions of 2.5:0.5 (—◆—), 2.5:1.0 (—■—), 2.5:1.5 (—▲—), and 0.0:1.0 (—✱—) casein:starch; F: pure calcium caseinate (—◆—); Temperature (—).....	71
Figure 2. Endothermic profile of casein:starch mixtures. Samples are casein in mixtures with: regular maize starch – RMS (A), waxy maize starch – WMS (B), acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS (C), hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS (D), and high-amylose maize starch – HAMS (E) in the proportions of 0:1 - pure starch (a), 2.5:0.5 (b), 2.5:1.0 (c), and 2.5:1.5 (d) casein:starch. F represents pure calcium caseinate endothermic profile.....	77
Figure 3. Laser scanning confocal micrographs of curds with 1.5% of the following starches: (A) AAMS, magnification: 10 x; (B) AAMS, magnification: 40 x; (C) HPMS, magnification: 10 x; (D) HPMS, magnification: 40 x. Starch: stained in green; Casein: stained in red. AAMS: normal acetylated/adipate maize starch; HPMS: waxy hydroxypropylated/phosphate maize starch.....	86

Capítulo III

Figure 1. Titratable acidity of the different cheese treatments during the storage period (4°C). C: Reduced-fat cheese (control); A: Reduced-fat cheese with AAMS (1%); H: Reduced-fat cheese with HPMS (1%). (n = 9).....	108
---	-----

Figure 2. Syneresis profile of the different cheese treatments during the storage period (4°C). C: Reduced-fat cheese (control); A: Reduced-fat cheese with AAMS (1%); H: Reduced-fat cheese with HPMS (1%). (n = 9). 109

Figure 3. Laser scanning confocal micrographs of cheese's matrix. C: Reduced-fat cheese without starch - Control; A: Reduced-fat cheese with 1% AAMS; H: Reduced-fat cheese with 1% HPMS. Magnification: 10 x. Starch: stained in green; Casein: stained in red. AAMS: normal acetylated/adipate maize starch; HPMS: waxy hydroxypropylated/phosphate maize starch..... 113

CAPÍTULO I

Comportamento do amido na presença de caseína e aplicação de amido como
respositor de gordura em queijo fresco *light*

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Especialistas em todo o mundo têm recomendado a redução da ingestão de gorduras, objetivando a obtenção de benefícios relacionados à saúde e à estética. Entretanto, a gordura possui papel fundamental na cremosidade, aparência, aroma, maciez e suculência dos alimentos. Em queijos frescos, a retirada da gordura irá afetar principalmente sua textura, dando origem a uma textura mais firme e elástica, conhecida como "borrachenta", além de proporcionar menor rendimento e o surgimento de sabores atípicos. Uma das estratégias que vêm sendo utilizadas para melhorar as características de queijos com teores reduzidos de gordura é o uso de repositores de gordura, os quais são ingredientes que podem ser incorporados aos alimentos para substituição total ou parcial da gordura, fornecendo menores calorias.

Dentre os repositores de gordura, o amido é um dos ingredientes mais utilizados em alimentos, devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade. Em queijos com teores reduzidos de gordura, o amido pode atuar aumentando a maciez e o rendimento dos queijos, em função de sua alta capacidade de retenção de água, após o processo de gelatinização. Entretanto, diferentes comportamentos durante o aquecimento são observados de acordo com os diferentes tipos de amido, o que afeta diretamente as características de seus géis. Amidos comuns (com 20 - 30% de amilose) se caracterizam pela formação de um gel consistente, enquanto amidos cerosos (com traços de amilose) formam géis fracos e coesivos, com baixa tendência à retrogradação. Ainda, amidos com alto teor de amilose (> 50% de amilose) formam filmes com facilidade, necessitando, porém, de altas temperaturas de gelatinização. Por outro lado, amidos quimicamente modificados, principalmente estabilizados e inter cruzados, são amplamente utilizados na indústria de alimentos, por possuírem propriedades tecnológicas melhoradas,

como: redução das temperaturas de gelatinização, menor tendência à retrogradação e maior resistência às condições de processo. Porém, embora existam alguns estudos sobre o comportamento das proteínas do leite e diferentes amidos, muitos aspectos fundamentais ainda continuam sem resposta, como as características de gelatinização do amido em presença da caseína e o comportamento do amido gelatinizado na matriz de caseína do queijo. Assim, o estudo do comportamento de diferentes tipos de amidos nativos e modificados, tanto em misturas com caseína, quanto na matriz de coágulos de queijo, pode auxiliar na elucidação do comportamento do amido na matriz de caseína e, conseqüentemente, na sua utilização como um potencial repositor de gordura. Além disso, a aplicação prática desses amidos na produção de queijos tipo frescal, com teor reduzido de gordura, juntamente com o estudo de suas características tecnológicas e sensoriais, poderá complementar o conhecimento a respeito dos efeitos do amido, como repositor de gordura, na melhora das características gerais de queijos frescos com reduzido teor de gordura. Este conhecimento poderá auxiliar a indústria de alimentos no desenvolvimento de novos produtos lácteos *light*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar as características de gelatinização de diferentes amidos de milho em presença de caseína, assim como observar o comportamento de seus géis na matriz de caseína, e avaliar a aplicação de amido, como repositor de gordura, em queijo fresco *light*.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o comportamento de diferentes amidos de milho (comum, ceroso, com alto teor de amilose, comum acetilado/adipato e ceroso hidroxipropilado/fosfatado) em presença de caseína, por meio da determinação das propriedades de pasta, térmicas, poder de inchamento e solubilidade de dispersões de amido e caseína, em diferentes concentrações, assim como avaliar a retenção do amido na massa do queijo e o comportamento dos géis de amidos na matriz de caseína;
- Aplicar o(s) amido(s) selecionado(s) em queijo fresco *light* e avaliar os efeitos deste(s) amido(s) como repositor(es) de gordura nas características físico-químicas, de textura, de microestrutura e sensoriais do queijo fresco *light*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Queijo fresco

O queijo fresco envolve um processo relativamente simples de produção, sendo considerado pronto para o consumo logo após sua fabricação. A popularização deste queijo na América Latina está relacionada ao seu elevado rendimento de produção e ao baixo investimento em estocagem e conservação, o que possibilita um retorno rápido do investimento e custos menores ao consumidor. Os queijos frescos muito consumidos na América Latina incluem: Panela, Fresco Mexicano, Ranchero, Blanco, Oaxaca, Asadero, Adobera, Requeijão, Ricota e Minas Frescal (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994; RAMÍREZ-LÓPEZ; VÉLEZ-RUIZ, 2012; SANT'ANA et al., 2013).

No Brasil, o queijo Minas frescal é um queijo fresco genuinamente nacional e um dos queijos mais consumidos no Brasil (MAGENIS et al., 2014). O processo convencional de produção ocorre por meio da utilização de enzimas coagulantes que irão desestabilizar as micelas de caseína, promovendo sua precipitação. A posterior expulsão da fase aquosa (soro), com consequente formação de uma massa, cuja base é caseína e gordura darão origem ao queijo, após sua enformagem e refrigeração (MAGENIS et al., 2014). É produzido com leite pasteurizado, utilizando renina e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas e, tradicionalmente, utiliza cultura *starter* mesofílica acidolática composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994; BURITI; ROCHA; SAAD, 2005).

É classificado como um queijo semi-gordo (25 a 44,9% de gordura) e de muita alta umidade (maior que 55%) (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997). Apresenta coloração esbranquiçada, consistência macia e úmida, textura fechada, com poucas olhaduras mecânicas, além de sabor suave, levemente ácido e salgado (CUNHA; VIOTTO; VIOTTO, 2006).

Além disso, por ser um produto fresco, de massa crua, e por isso, altamente perecível, é consumido, geralmente, nos primeiros quinze dias após sua fabricação. Sua estocagem sob refrigeração é fundamental para prevenir o desenvolvimento de micro-organismos e retardar os fenômenos bioquímicos que ocorrem durante o armazenamento. Esses principais fenômenos são a proteólise e a acidificação, que influenciam diretamente na qualidade do produto final, causando alterações no produto, tais como, amarelamento da casca, maciez excessiva e sabor acentuadamente ácido (BRASIL, 1996; DORNELLAS, 1997; PERRY, 2004; SANGALETTI et al., 2009).

Embora o queijo fresco possua um curto tempo de vida útil e não seja submetido ao processo de maturação, o alto teor de umidade deste queijo associado à utilização de coagulantes proteolíticos e cultura lática, produzem considerável proteólise (DORNELLAS, 1997). Inicialmente, as caseínas são hidrolisadas em uma série de grandes e médios peptídeos, pela atividade do coagulante residual, da plasmina e de outras enzimas endógenas proteolíticas. Os peptídeos são então hidrolisados em peptídeos menores e em aminoácidos por proteases e peptidases de bactérias acidoláticas adicionadas, ou de bactérias provenientes de contaminação (UPADHYAY et al., 2004). A acidificação ocorre devido à transformação da lactose em ácido láctico pela ação da microbiota natural do leite e da cultura lática, o que contribui para a conservação e a formação de sabor e textura característicos do produto. A acidez produzida

durante a coagulação é baixa, em torno de 0,2%, podendo atingir aproximadamente 1,0% durante armazenamento refrigerado (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

3.2 Queijos com teor reduzido de gordura

A busca por alimentos com teores reduzidos de gordura tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos. Essa tendência está diretamente relacionada com as recomendações mundiais para redução da ingestão de gorduras, principalmente das gorduras saturadas, associando essa redução à benefícios ligados à saúde e à estética (ROSENTHAL, 2003; O'CONNOR; O'BRIEN, 2016). Embora as recomendações médicas e nutricionais mundiais tenham recentemente aumentado os limites para ingestão de gorduras saturadas (de 7% para 10%), o excesso de gordura saturada ainda é considerado prejudicial. Esse aumento nos limites foi baseado em estudos recentes que mostraram que com a indicação de redução de gordura saturada, houve um aumento de consumo de outros nutrientes, tais como carboidratos refinados, o que pode ter proporcionado grande impacto no aumento do risco de doença cardiovascular e diabetes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013). A gordura saturada, em quantidades ideais, é essencial para o bom funcionamento do organismo, constituindo membranas celulares e participando do armazenamento de vitaminas A, D, E e K. O excesso de gordura saturada, no entanto, pode provocar o acúmulo de colesterol ruim (LDL) nos vasos sanguíneos, podendo ocasionar doenças cardiovasculares (PINHEIRO; PENNA, 2004; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013).

Neste contexto, houve um aumento na procura por queijos com baixos teores de gordura pelos consumidores. Conforme a legislação brasileira, para um produto ser considerado *light* ou com teor reduzido de gordura (*reduced-fat*) ele deve apresentar redução de pelo menos 25% de gordura na matéria seca, quando comparada à sua variedade integral. Entretanto, em outros países (nos Estados Unidos, por exemplo) é comum encontrar queijos com redução de até 50% de gordura na matéria seca, sendo chamados de *low-fat cheeses* ou queijos com baixos teores de gordura (JOHNSON, 2002).

Os consumidores, no entanto, esperam que esses produtos *light* possuam características sensoriais praticamente idênticas aos dos queijos com teor integral de gordura, o que é muito difícil de se alcançar de forma consistente para a grande maioria dos queijos, especialmente para aqueles com reduções maiores que 50% (MISTRY, 2001; JOHNSON, 2002). Isso ocorre por que a gordura apresenta propriedades fundamentais nos alimentos. Além de sua função energética, a gordura influencia as propriedades físicas, sensoriais e reológicas dos queijos contribuindo principalmente para sua cremosidade, aparência, aroma, odor, maciez e suculência (PINHEIRO; PENNA, 2004; KARIMI et al., 2015). Por este motivo, é um grande desafio produzir queijos com baixos ou reduzidos teores de gordura que apresentem características sensoriais e tecnológicas desejáveis. A remoção da gordura no queijo está diretamente relacionada ao surgimento de textura mais dura e elástica, conhecida como "borrachenta", além de proporcionar sabor característico menos intenso, amargor, odores atípicos e cor indesejável. Além disso, queijos com baixo teor de gordura, normalmente apresentam baixo rendimento, menor derretimento e maturação mais lenta (RODRÍGUEZ, 1998; PINHEIRO; PENNA, 2004; KARIMI et al., 2015).

Esta textura caracterizada como "borrachenta" dos queijos com teores reduzidos de gordura ocorre em função de sua matriz estrutural mais densa (RODRÍGUEZ, 1998). Isto ocorre porque a gordura no queijo encontra-se aprisionada mecanicamente na matriz de caseína, agindo como pontos de fratura em sua estrutura, o que promove a maciez típica dos queijos com teor integral de gordura. Ao ser removida, ocorre uma maior interação entre as cadeias de proteínas da matriz e a estrutura do queijo se torna relativamente mais densa e firme (PINHEIRO; PENNA, 2004).

Nos últimos anos, algumas alternativas vêm sendo estudadas com o intuito de melhorar os aspectos negativos dos queijos com teores reduzidos de gordura, tais como: mudanças no processo de produção, uso de culturas adjuntas e uso de repositores de gordura.

3.3 Repositores de gordura

Dentre as alternativas para substituição de gordura em queijos, o uso de repositores de gordura vem mostrando resultados promissores. Entretanto, nenhuma das estratégias consegue substituir totalmente todas as contribuições da gordura nos alimentos (DRAKE; SWANSON, 1995; RODRÍGUEZ, 1998; KARIMI et al., 2015).

Os repositores de gorduras são ingredientes que podem ser incorporados aos alimentos, para substituição total ou parcial da gordura, fornecendo menores calorias que as gorduras. Em geral, a maioria dos repositores de gordura, quando usados com moderação por adultos, é considerada segura, desempenhando importante papel na redução do teor de gordura nos

alimentos (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION REPORTS, 2005; O'CONNOR; O'BRIEN, 2016).

Os repositores de gordura normalmente dividem-se em duas classes: os substitutos de gordura e os imitadores de gordura. Os substitutos de gordura são compostos à base de lipídios e podem substituir a gordura nos alimentos usando a mesma concentração (peso por peso), promovendo propriedades similares às da gordura, com baixo ou nenhum valor energético. Estes compostos, frequentemente são chamados de gorduras sintéticas, por não existirem normalmente na natureza. Um exemplo de gordura sintética é a esterificação de açúcares com ácidos graxos. Estas gorduras sintéticas não contribuem para o valor calórico dos produtos em razão de sua estrutura química não ser metabolizada ou absorvida no processo digestivo humano (ROSENTHAL, 2003). Entretanto, embora seja permitido nos EUA para fritura de alimentos, os efeitos desses compostos no organismo ainda não são totalmente conhecidos e por isso, ainda não são permitidos em alguns países (JANDACEK et al., 2012).

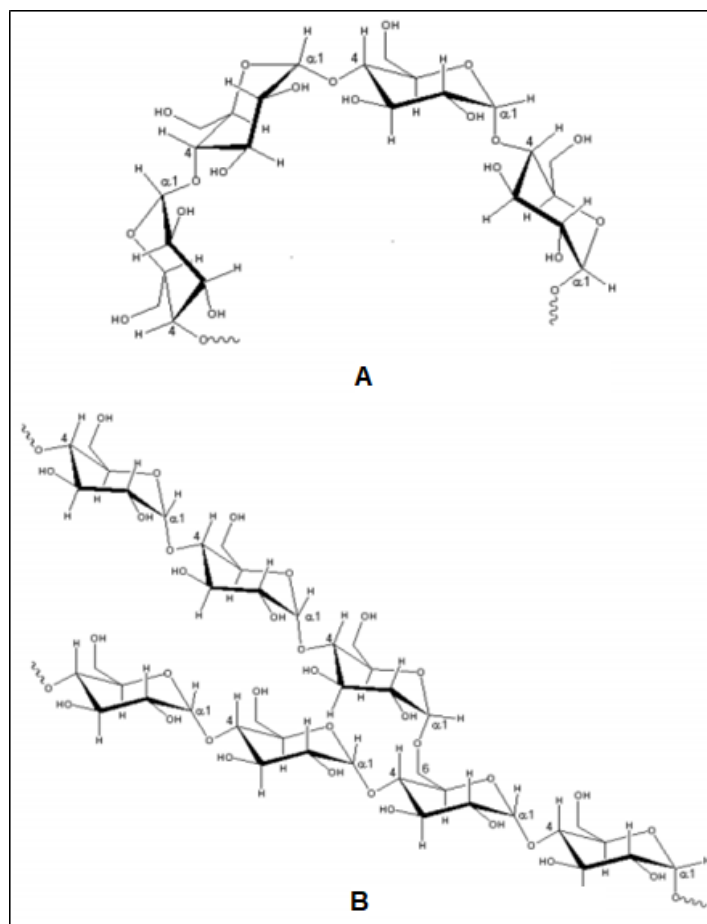
Por este motivo, os imitadores de gordura são amplamente utilizados por serem primariamente carboidratos ou proteínas. Eles atuam restando umidade e criando uma sensação de lubrificação similar à dos produtos com teor integral de gordura. Porém, são incapazes de substituir as propriedades funcionais apolares da gordura, tais como palatabilidade, cremosidade e sabor (ROSENTHAL, 2003; KAVAS et al., 2004; KOCA; METIN, 2004). Dentre os imitadores de gordura, o amido é um dos ingredientes mais utilizados em alimentos, devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade (O'CONNOR; O'BRIEN, 2016).

3.4 Amido: estrutura e características

O amido é a principal fonte de reserva dos vegetais. Ele ocorre normalmente na natureza na forma de grânulos presentes no interior das células vegetais, principalmente de raízes, cereais, sementes e tubérculos, sendo o milho, a batata, o trigo, o arroz e a mandioca, as principais fontes de obtenção de amido no mundo (SINGH et al., 2003; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). No Brasil, a maior fonte botânica de produção de amido é o milho. Isto se deve principalmente ao fato deste cereal possuir uma produção expressiva no país, considerado o terceiro maior produtor de milho no mundo, com estimativa de produção de 95 milhões de toneladas entre os anos de 2017 e 2018 (GUTH, 2017).

Estruturalmente, os grânulos de amido são constituídos principalmente por misturas heterogêneas de duas macromoléculas: a amilose e a amilopectina, que diferem entre si de acordo com o tamanho molecular e grau de ramificação (SINGH et al., 2003; ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008). A amilose é uma molécula essencialmente linear formada por unidades de glicose unidas entre si por ligações α -1,4 (Figura 1.A), enquanto a amilopectina é uma molécula altamente ramificada, também composta de unidades de glicose unidas entre si por ligações em α -1,4 em sua parte linear, porém com 5 a 6% de ligações α -1,6 constituindo os pontos de ramificação (ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008), conforme Figura 1.B.

Figura 1. Estrutura das moléculas de amilose (A) e amilopectina (B).

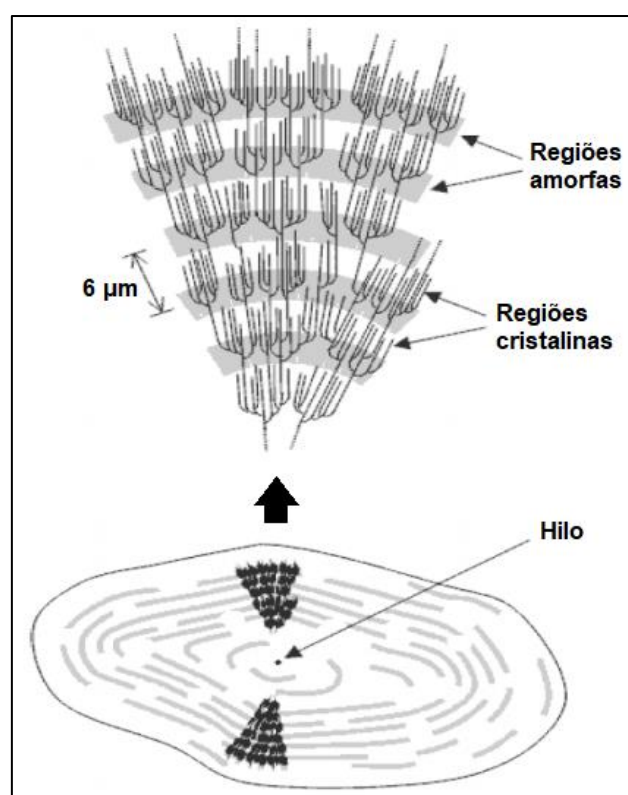


Fonte: Adaptado de Denardin e Silva (2009).

O grânulo de amido possui estrutura semicristalina. A amilose e a amilopectina encontram-se arranjadas no interior dos grânulos, formando camadas que alternam entre regiões cristalinas e amorfas, o que dá origem à sua estrutura característica semicristalina (Figura 2). A cristalinidade é associada à amilopectina, enquanto que a amilose está associada às regiões amorfas. As cadeias ramificadas da amilopectina formam duplas hélices fortemente empacotadas constituindo as regiões cristalinas. Os pontos de ramificação da amilopectina localizam-se nas regiões amorfas, onde, frequentemente, a amilose é encontrada entremeada com a amilopectina, embora possa se encontrar também na forma de feixes. Porém, quando se

encontra entremeadada à amilopectina, é a amilose que mantém as moléculas de amilopectina unidas durante a transição térmica, mantendo com isso a integridade dos grânulos de amido (BULÉON et al., 1998; SINGH et al., 2003; JANE, 2006; JANE, 2007; BEMILLER; WHISTLER, 2010).

Figura 2. Estrutura semicristalina do amido formada pelas regiões amorfas e cristalinas



Fonte: Adaptado de Denardin e Silva (2009).

Os grânulos de amido, de diferentes tipos, variam entre si de acordo com a densidade de empacotamento molecular, o que afeta sua cristalinidade, determinada por análise de difração por raio-X. O amido comumente encontrado nos cereais é classificado como padrão cristalino do tipo A, que indica que o amido possui cristais densamente empacotados, necessitando de

maiores temperaturas para dissociação dos grânulos na gelatinização, do que amidos de outras fontes botânicas (MANTHEY, 2016). É justamente em função desta estrutura semicristalina estável que os grânulos de amido, em geral, não são solúveis à temperatura ambiente (BEMILLER; WHISTLER, 2010).

Quando o amido é aquecido em excesso de água ocorre o fenômeno conhecido como gelatinização do amido. A gelatinização é a desestruturação da organização molecular no interior do grânulo de amido. Com o aquecimento, as duplas hélices das amilopectinas vão sendo dissociadas, havendo perda da cristalinidade do amido, o que promove o inchamento dos grânulos, em função da maior facilidade de interação de moléculas de água com as cadeias de amilopectina. Com o resfriamento, interações intermoleculares envolvendo a amilose e a amilopectina ocorrem, aumentando a viscosidade do meio e promovendo a formação de um gel. No entanto, diferentes comportamentos durante o aquecimento são observados de acordo com os diferentes tipos de amidos, em função de diferenças em sua composição e estrutura, o que afeta as características dos géis (TÁRREGA; VÉLEZ-RUIZ; COSTELL, 2005; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008; KETT et al., 2013). A amilopectina contribui, geralmente, com a formação de consistência gomosa ou pegajosa no gel, devido à sua solubilidade, enquanto que a amilose irá contribuir para as características de gelatinização. Sendo assim, amidos com variados conteúdos de amilose proporcionam diferentes texturas aos alimentos (PINHEIRO; PENNA, 2004).

O teor de amilose varia entre os diferentes tipos de amidos. No geral, o teor de amilose dos amidos de diferentes fontes botânicas encontra-se no intervalo de 20 a 30%. Os amidos de milho comum contêm entre 25 a 28% de amilose. Entretanto, algumas variedades de

determinados cereais, tais como milho, cevada e arroz, são constituídas quase que totalmente por amilopectina, sendo denominadas pelo termo "ceroso" (*waxy*), enquanto que, outros amidos possuem teores de amilose acima de 50% e são denominados de "amidos com alto teor de amilose" (*high-amylose*) (WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009).

O amido de milho comum produz géis consistentes, bastante utilizados em produtos que requerem viscosidade à quente, no entanto, não é muito indicado para produtos que necessitam de armazenamento sob refrigeração, devido a ocorrência da retrogradação, que é diretamente influenciada pela amilose. Os amidos cerosos praticamente não possuem a amilose para entremear as moléculas de amilopectina, portanto, exibem uma estrutura pouco empacotada e, conseqüentemente, se dispersam com maior facilidade, produzindo desta forma, géis com altas viscosidade de pico, claros e com menor resistência às condições de processamento. Entretanto, também em função de seu baixíssimo teor de amilose, amidos cerosos apresentam maior estabilidade a baixas temperaturas. Por outro lado, os amidos com alto teor de amilose gelificam e formam filmes com facilidade, devido ao seu alto conteúdo de amilose, porém necessitam de altas temperaturas de gelatinização em função de sua estrutura densamente empacotada, pela formação de duplas hélices entre as cadeias longas de amilose (JANE, 2007; WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009).

Em amidos de cereais, a amilose pode estar presente no grânulo, tanto na forma de amilose livre, como na forma de complexos amilose-lipídio. Isso ocorre porque amidos de cereais contêm altos teores de lipídios, os quais não podem ser extraídos com facilidade, sendo responsáveis pela formação de complexos, assim como pelo desenvolvimento de cor e aromas característicos. Entretanto, a formação desses complexos pode afetar as propriedades estruturais

e tecnológicas dos grânulos de amidos (BULÉON et al., 1998). Lipídios e fosfolipídios são conhecidos por formarem complexos com as longas cadeias de amido, tanto com a amilose, quanto, em menor grau, com as cadeias longas da amilopectina, resultando em um inchamento restrito do grânulo. Amidos cerosos, no entanto, contêm pequenas quantidades de lipídios, em função de seu menor teor de amilose, enquanto amidos com altos teores de amilose contêm a maior quantidade de lipídios (BEMILLER; WHISTLER, 2010).

Os amidos podem ainda serem modificados com a finalidade de atenderem as mais diversas aplicações na indústria alimentícia, em função da melhoria de suas propriedades. A grande maioria das modificações aplicadas aos amidos são realizadas para que estes consigam resistir às condições de calor, acidez e cisalhamento, normalmente encontradas nos processos industriais, além de também conferirem maior resistência à retrogradação (TÁRREGA; VÉLEZ-RUIZ; COSTELL, 2005; DAMODARAN; PARKING; FENNEMA, 2008). Diversas são as modificações que podem ser aplicadas aos amidos, no geral, eles podem ser modificados enzimaticamente, quimicamente ou fisicamente. Comumente, as modificações mais aplicadas aos amidos são: hidrólise ácida ou enzimática, oxidação, formação de ligações cruzadas, esterificação, eterificação, adição de grupos hidrofóbicos, pré-gelatinização, atrito mecânico e microparticulação (FRANCO et al., 2001; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Dentre as modificações aplicadas aos amidos, as modificações químicas são as que apresentam os maiores efeitos na funcionalidade dos amidos. A maioria dessas modificações é produzida com uso de compostos que reagem com grupos hidroxil das cadeias de amido, formando grupos éter e éster. Amidos eterificados ou esterificados com reagentes monofuncionais resistem às associações entre as cadeias, que reduzem a tendência do gel de

amido à precipitação, reduzindo sua tendência à retrogradação. Por este motivo, este tipo de modificação é conhecido como estabilização. Por outro lado, reagentes bifuncionais irão se ligar ao mesmo tempo a duas cadeias de amido diferentes, produzindo os amidos inter cruzados que, entre outras características, apresentam importante papel na alta resistência termomecânica destes amidos (TÁRREGA; VÉLEZ-RUIZ; COSTELL, 2005; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

Amidos que são ao mesmo tempo estabilizados e inter cruzados (como por exemplo o amido hidroxipropilado/fosfatado e o amido acetilado/adipato), usualmente, têm temperaturas de gelatinização e de pasta menores, produzem pastas com maiores viscosidades e apresentam outras propriedades atribuídas ao inter cruzamento e à estabilização, sempre levando em consideração características intrínsecas ao seu amido base. Em geral, os amidos modificados frequentemente usados em alimentos são amidos estabilizados e inter cruzados (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

O amido é normalmente utilizado em uma grande diversidade de produtos com a funcionalidade de estabilização, emulsificação e agente de corpo (KETT et al., 2013). Porém, com relação ao seu uso como repositor de gordura em alimentos, pontos positivos, assim como pontos negativos podem ser observados. Alguns pontos positivos incluem o seu baixo preço, a facilidade de aquisição e a redução significativa no valor calórico (comparado ao valor energético das gorduras), apresentando ainda baixa restrição toxicológica por serem ingredientes geralmente reconhecidos como seguros (GRAS). Entretanto, a estabilidade ao calor, à acidez, ao congelamento e descongelamento e às tensões de cisalhamento não é garantida em todos os casos, para todos os amidos. Outro ponto negativo, é que dependendo do

tipo de amido e da quantidade utilizada, pode-se mascarar, em certo grau, sabores característicos do produto, podendo haver também contribuição com leve sabor residual do amido. No geral, os imitadores de gordura à base de amido, tendem a desempenhar um bom papel em produtos com alto teor de umidade. Assim, são frequentemente utilizados em produtos lácteos, tais como: iogurtes, sobremesas lácteas, sorvetes e queijos processados. Nestes produtos, os amidos apresentam função texturizante e espessante, e conferem maior estabilidade e cremosidade ao produto final (LUCCA; TEPPER, 1994; PINHEIRO; PENNA, 2004; O'CONNOR; O'BRIEN, 2011).

Desta forma, em queijos com teores reduzidos de gordura, o amido poderá atuar melhorando a textura em função de sua alta capacidade de retenção de água (BROWN; McMANNUS; McMAHON, 2012). Entretanto, Diamantino e colaboradores (2014) observaram que embora a adição de um amido de milho ceroso modificado, com adição de anidrido octenil succínico, tenha aumentado o teor de umidade e a capacidade de retenção de água em queijo Minas frescal com teor reduzido de gordura, este aumento não foi suficiente para melhorar as características de textura e o rendimento dos queijos. Os autores sugeriram, como uma das possíveis causas, a perda de parte do amido no soro por falta de interação com a matriz, ou ainda que a concentração utilizada não foi suficiente para causar descontinuidade na matriz de caseína. Por outro lado, outros autores sugerem a ocorrência de interação do amido com a caseína, seja sob a forma de ligações cruzadas entre as moléculas de amido e de caseína, ou ainda, pela simples retenção mecânica do amido gelatinizado na matriz de caseína, funcionando como um material de enchimento (GOEL; SINGHAL; KULKARNI, 1999; ZALESKA; RING; TOMASIK, 2001; NOISUWAN et al., 2008; ZUO et al., 2008; YE; HEWITT, 2009).

3.5 Caseína: estrutura e características

O queijo pode ser definido como um concentrado lácteo constituído por proteína, lipídios, cálcio, fósforo, vitaminas e água, produzido pelo processo de coagulação, que visa concentrar a proteína do leite, retendo a gordura juntamente com os demais compostos. A proteína do leite, responsável pelo processo de coagulação, e por isso, considerada primordial na produção de queijos, é a caseína (FOX; McSWEENEY, 1998; PERRY, 2004).

A caseína representa aproximadamente 80% das proteínas do leite, é constituída primordialmente pelas frações α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, que se encontram nas proporções estimadas de 4,0:1,0:3,5:1,5, respectivamente. De maneira geral, pode-se dizer que a fração κ -caseína, embora em menor quantidade, exerce um importante papel protetor sobre as outras frações, ao formar um complexo estável, denominado micela, que evita a precipitação das demais frações de caseína, em presença de cálcio solúvel. Sendo assim, o fenômeno da coagulação do leite se deve basicamente à perda da estabilidade das micelas de caseína (OLIVEIRA, 1986; FARRELL et al., 2006; PERRY, 2004).

Sabe-se que as micelas de caseína se encontram normalmente dispersas no leite na forma de agregados de caseína e fosfato de cálcio. Essas micelas apresentam diâmetros médios que variam entre 150 a 200 nm e são altamente hidratadas, com aproximadamente 3,5 kg de água/kg de proteína. Assim, embora as caseínas representem aproximadamente 2,5% dos componentes do leite, as micelas ocupam aproximadamente 10% do volume total de leite (DALGLEISH; CORREDIG, 2012).

Ao longo dos anos, a estrutura das micelas de caseína vem sendo muito estudada e debatida. Algumas teorias foram criadas, porém apresentam pontos divergentes entre si, e por

isso, sua complexa estrutura ainda não foi totalmente elucidada (HORNE, 2006; DALGLEISH; CORREDIG, 2012).

As proteínas que constituem a caseína são fosfoproteínas e dividem-se em dois grupos, as sensíveis ao cálcio e as não sensíveis ao cálcio, que previnem ou inibem a precipitação do grupo sensível na presença de cálcio. A κ -caseína é não-sensível ao cálcio, enquanto que α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ , são altamente fosforiladas, e por isso, sensíveis ao cálcio. As caseínas apresentam natureza anfipática e, cada uma, mostra seu próprio padrão de segregação em regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Assim, é possível inferir para cada uma delas, um papel na formação da estrutura das micelas de caseína e, de fato, alguns modelos estruturais foram criados (HORNE, 2006).

Para descrever a parte interna das micelas, dois modelos estruturais foram criados: o modelo submicelar e o modelo de *nanoclusters*. O modelo submicelar deriva da observação de que proteínas, na presença de caseinato de sódio, formam pequenos agregados, unidos por ligações não-covalentes, quando dispersos em meio aquoso. Dessa forma, este modelo sugere, basicamente, que as micelas de caseína são formadas por agregados, denominados submicelas, que são unidos entre si por fosfato de cálcio. O conhecimento de que a κ -caseína é encontrada principalmente na superfície das micelas, implica que pelo menos dois tipos de submicela devam existir: a rica em κ -caseína e a pobre em κ -caseína (DALGLEISH; CORREDIG, 2012).

O modelo de *nanoclusters*, mais recente, deriva da observação de que os fosfopeptídeos, presentes na β -caseína, seriam capazes de estabilizar o fosfato de cálcio, em soluções, cujas concentrações este normalmente precipitaria. Assim, esse modelo se baseia na hipótese de que o fosfato de cálcio e as caseínas se agregariam em *nanoclusters* por meio de interações não

covalentes e, ao mesmo tempo, com outras caseínas, formando as micelas (HORNE, 2006; DALGLEISH, 2011). Como a κ -caseína não pode participar da formação de *nanoclusters*, pela ausência de regiões fosfatadas disponíveis para se associarem com os agregados de proteínas, a κ -caseína se associaria aos *nanoclusters* por meio de interações não covalentes para formar a camada superficial. Assim, a κ -caseína atua como um agente monofuncional de terminação de cadeia, estabilizando os *nanoclusters*. Dessa forma, as micelas teriam uma subestrutura, contratando com a hipótese submicelar anteriormente criada. Essa nova hipótese acaba sendo o inverso do modelo submicelar: ao invés de frações de caseína ligadas por fosfato de cálcio, existem aglomerados de fosfato de cálcio/caseína unidos por ligações não covalentes entre os grupos fosfato das caseínas e o fosfato de cálcio (HORNE, 2006; DALGLEISH, 2011; DALGLEISH; CORREDIG, 2012).

Em relação à superfície da micela, existe um consenso de que, praticamente todas, senão todas, as frações de κ -caseína estejam presentes na superfície. Uma parte da fração de κ -caseína, o caseinomacropéptido – CMP (que compreende os resíduos dos aminoácidos 106 a 169 da proteína), se estende além da superfície da micela, formando uma espécie de prolongamento. Os prolongamentos criam uma camada ao redor das micelas, estimada em 5 a 10 nm de espessura. Essa camada proporciona uma estabilização estérica para as micelas, evitando sua aproximação e, conseqüentemente, sua precipitação (Figura 3.a) (FARRELL et al., 2006; CORREDIG et al., 2011).

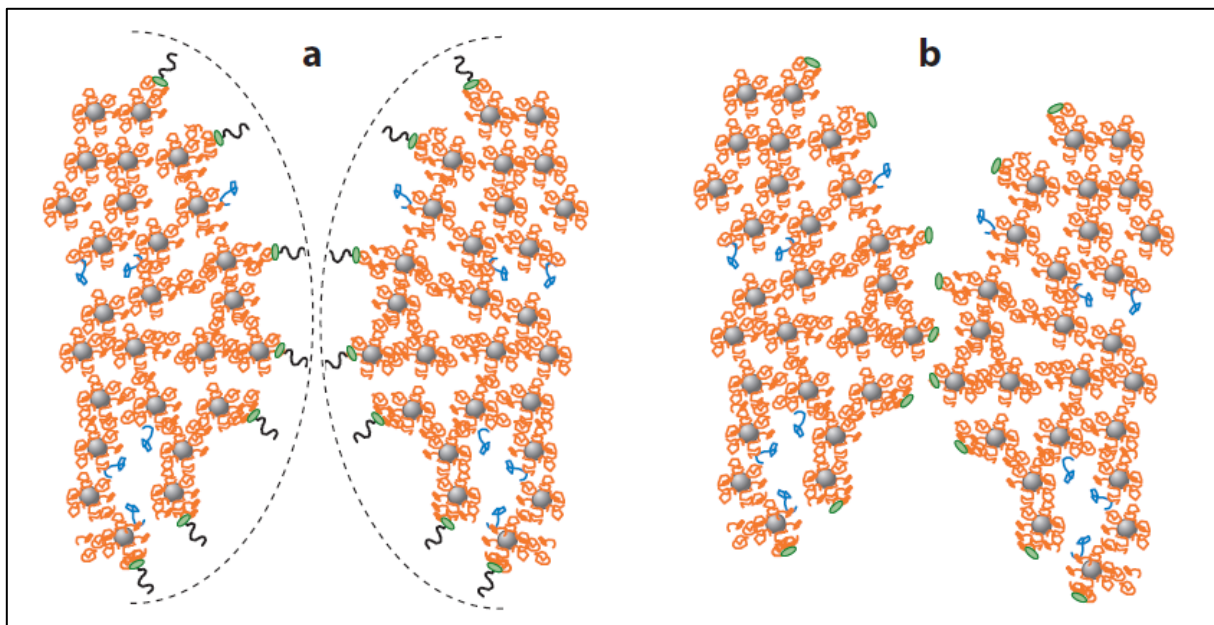
Uma vez que a existência da camada formada pela κ -caseína é universalmente aceita, algumas questões ainda continuam sem resposta, como a distribuição da κ -caseína na superfície da micela. Sabe-se que κ -caseína é capaz de formar agregados oligoméricos por meio de

ligações dissulfeto. Sendo assim, existe a dúvida se os prolongamentos da κ -caseína poderiam formar agregados, semelhantes a “cachos”, ou se estes apresentam-se soltos na superfície micelar. Outra hipótese é a de que a quantidade de κ -caseína disponível seria insuficiente para cobrir toda a superfície micelar e que, por isso, outras caseínas também poderiam estar presentes na camada superficial (DALGLEISH, 2011; CORREDIG et al., 2011; DALGLEISH; CORREDIG, 2012).

O comportamento das micelas durante o processamento depende quase que inteiramente da estrutura e das propriedades da superfície micelar. Pelo fato das micelas serem estabilizadas pela repulsão estérica criada pela camada polieletrólítica da κ -caseína, qualquer processo que remova a região C-terminal da κ -caseína reduz a estabilidade coloidal das micelas (DALGLEISH; CORREDIG, 2012).

No processo de coagulação do leite, a quimosina hidrolisa as frações de κ -caseína em uma posição específica (entre os aminoácidos 105-106), liberando a região C-terminal da κ -caseína, o caseinomacropéptido (CMP), promovendo uma transição sol-gel (Figura 3.b). Durante o primeiro estágio dessa reação enzimática, há um aumento no coeficiente de difusão das micelas em função da remoção gradual da camada formada pelos prolongamentos da κ -caseína. Em um determinado momento, a estabilização estérica gerada pelos poucos prolongamentos de κ -caseína restantes, é insuficiente para manter as micelas separadas, e elas começam a se aproximar. Com a aproximação das micelas, interações hidrofóbicas promovem a união entre as partículas, juntamente com determinada quantidade de cálcio iônico. O aumento no teor de cálcio aliado à progressiva liberação de CMP, auxilia na agregação das partículas (CORREDIG et al., 2011; KETHIREDIPALLI et al., 2011).

Figura 3. Esquema da interação entre as micelas de caseína: (a) micelas de caseína estericamente estabilizadas pela camada de caseinomacropeptídeo - CMP; (b) micelas de caseína após remoção da camada de CMP pela quimosina, resultando na aproximação das superfícies micelares.



Legenda: α - e β -caseínas agrupadas (laranja) unidas ao fosfato de cálcio (esferas cinza); interações hidrofóbicas da β -caseína (azul); para- κ -caseína (verde) e cadeias de CMP (preto) da κ -caseína, na superfície externa da micela. Zona de ação do efeito estérico indicada por linhas tracejadas. Espaços vazios representam o espaço ocupado por moléculas de água. Fonte: Adaptado de Dalgleish e Corredig (2012).

A perda progressiva da camada de CMP e a conseqüente instabilidade das micelas proporciona uma boa compreensão do processo de coagulação no leite não tratado termicamente. No leite aquecido em temperaturas acima de 70 °C ocorre desnaturação das proteínas do soro. Embora a κ -caseína seja hidrolisada pela quimosina adicionada para a coagulação, as micelas não se agregam bem. Isso porque a presença das proteínas de soro desnaturadas impede a aproximação das micelas ao impedir que as regiões interajam entre si na superfície micelar (KETHIREDIPALLI et al., 2011).

Além disso, quando a coagulação é induzida por adição de ácido, a desestabilização das micelas ocorre por um processo totalmente diferente. As mudanças ocorrem não só na camada

estérica da micela, mas também em sua estrutura interna. A redução do pH de 6,6 a 5,3 provoca a liberação progressiva de íons de fosfato de cálcio, magnésio e citrato do interior da micela. Além disso, todo o fosfato inorgânico é solubilizado quando atinge-se pH 5,2 e a maioria dos íons de cálcio restantes são solubilizados quando o pH 4,6 é atingido. Esta perda de estabilidade é explicada pela diminuição da carga negativa nas caseínas, que tornam-se insuficientes para gerar repulsão (HORNE, 2008). Na superfície micelar, a diminuição da carga negativa do CMP juntamente com a diminuição do pH provoca o colapso da camada de κ -caseína, uma vez que as interações intra e inter-cadeias do CMP já não são mais suficientes para manter as cadeias afastadas, reduzindo a estabilização estérica das micelas. Portanto, as micelas podem difundir-se umas sobre às outras, por meio de forças atrativas de curto alcance, que promovem a transição sol-gel. Essa agregação normalmente ocorre muito perto do ponto isoelétrico das caseínas, a um pH de aproximadamente 4,8 (CORREDIG et al., 2011; DALGLEISH; CORREDIG, 2012).

3.6 Interação amido/caseína

No geral, em sistemas que incluem proteínas do leite e hidrocoloides, podem ocorrer interações de natureza segregativa ou associativa. Em fase aquosa, as proteínas do leite (caseínas e proteínas do soro) e os hidrocoloides formam soluções poli-eletrolíticas. Assim, nessas misturas, frequentemente ocorrerá a separação de fases ou o comportamento, de um dos componentes, como um material inerte na fase do outro (interações segregativas), ou ainda, a formação de complexos (interações associativas). Por outro lado, a interação associativa de

simples miscibilidade entre os componentes raramente irá ocorrer, sendo obtida apenas em condições e concentrações dos polímeros muito específicas (SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998; CORREDIG et al., 2011).

Um grande número de polissacarídeos foram descritos como sendo termodinamicamente incompatíveis com proteínas. Isto ocorre quando polissacarídeos não-iônicos são adicionados às proteínas do leite. Geralmente, a incompatibilidade termodinâmica é observada quando as interações solvente/biopolímeros são mais favorecidas quando comparadas às interações biopolímero/biopolímero. Isso proporciona a ocorrência da chamada “separação de fases segregativa”, uma vez que cada biopolímero se concentra em uma fase separada. As interações associativas geralmente ocorrem por atração eletrostática entre porções de proteínas e polissacarídeos, carregados de forma oposta. Pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas também podem contribuir na estabilização dos complexos formados. Complexos solúveis podem formar-se em valores de pH estritamente específicos, quando as forças de repulsão eletrostática são minimizadas. Como as principais forças envolvidas na complexação associativa de proteínas e polissacarídeos são de natureza eletrostática, as características das interações dependerão das condições ambientais, como o pH do meio. Além disso, a rigidez e a densidade de carga do polissacarídeo pode influenciar o tipo de agregado formado (CORREDIG et al., 2011).

Nesse contexto, apesar do importante significado industrial das misturas de proteínas do leite e amido, pouca pesquisa encontra-se disponível a respeito das interações entre esses biopolímeros. Sabe-se que a concentração dos componentes na mistura, origem botânica e composição do amido e o tipo de processamento aplicado são fundamentais para entender as

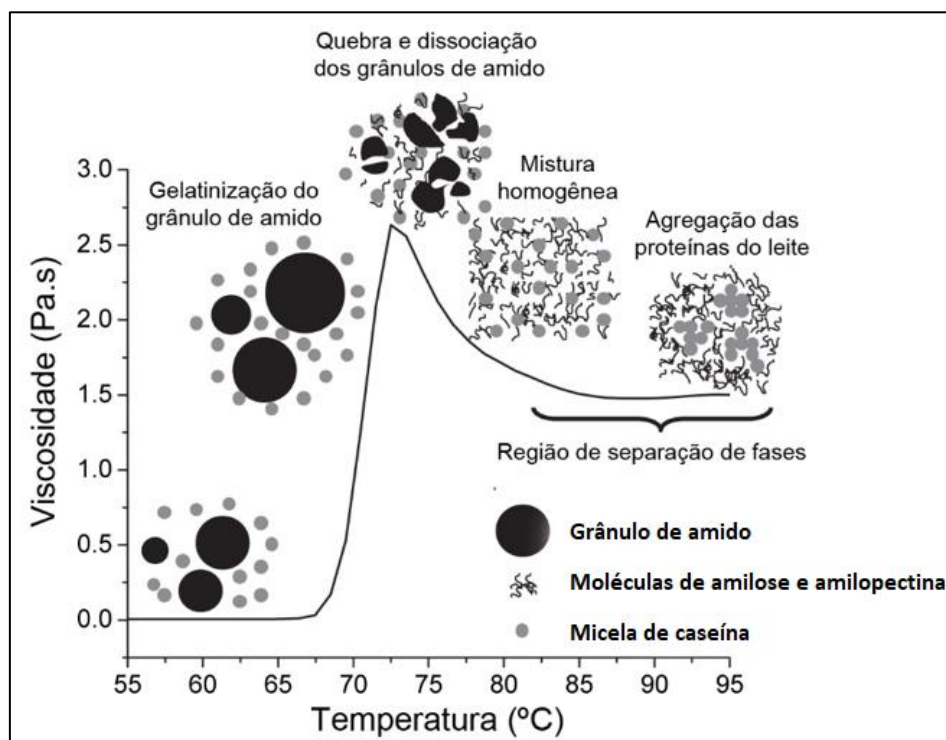
mudanças que ocorrem nesses sistemas. Além disso, como os amidos nativos possuem baixa resistência ao cisalhamento e térmica, e alta tendência à retrogradação, os amidos modificados quimicamente que mantêm a estrutura granular durante o processamento, geralmente, são preferidos em aplicações lácteas (CORREDIG et al., 2011). Porém, no que diz respeito ao tipo e ao mecanismo de interação, no geral, os estudos com misturas de proteínas do leite/amido, disponíveis na literatura, são conflitantes, pois apresentam ocorrência tanto de interações associativas, quanto de interações segregativas (MATIGNON et al., 2014).

Goel, Singhal e Kulkarni (1999) sugerem, em função da presença de muitos grupos hidrofílicos, tais como -OH, -NH₂, -COOH e -SH, nas cadeias laterais alquila da caseína, uma possível ocorrência de ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila dos amidos. No entanto, a maioria das interações associativas disponíveis na literatura foram observadas em misturas de proteínas do leite com amido de batata. Este amido apresenta características aniônicas por conter, naturalmente, grupos fosfato esterificados à cadeia de amilopectina (CORREDIG et al., 2011). Zaleska, Ring e Tomasik (2001) estudaram a formação de complexos, entre amido de batata e a caseína, com diferentes concentrações, produzidos através de eletrossíntese. Os autores observaram maior tendência à formação de complexos na concentração de 1:1 amido:caseína, diminuindo-se essa tendência à medida que se aumenta a concentração de caseína. Os autores sugeriram ainda que a formação dos complexos estaria relacionada com a presença dos grupos fosfato das moléculas de amilopectina do amido de batata, dos grupos hidroxil, tanto do amido, quanto dos grupos amina da caseína, e ainda, dos grupos carboxílicos presentes na caseína.

No geral, as propriedades das misturas de proteínas do leite com amidos não-iônicos são consequência da incompatibilidade termodinâmica ou de interações segregativas entre os componentes (CORREDIG et al., 2011). Noisuwan e colaboradores (2008) observaram em misturas com proteínas do leite que os componentes do amido, amilose e amilopectina, lixiviados dos grânulos durante a gelatinização, promoveram a separação de fases. Na gelatinização de 10% p/p de amido de arroz comum e ceroso em misturas com diferentes produtos à base de proteínas do leite (10% p/p), os grânulos de amido se dissociaram, e, após o resfriamento, os agregados de proteínas ficaram retidos na matriz do amido gelatinizado e resfriado. A Figura 4 mostra uma representação esquemática das etapas envolvidas desde o início do aquecimento, até a separação de fases da mistura de amido de arroz ceroso com proteínas do leite.

Por outro lado, o leite adicionado de amidos modificados (mais resistentes à lixiviação de amilose e amilopectina, durante a formação do gel) causa um aumento substancial no volume dos grânulos de amido inchados, provocando interrupção da matriz de caseína, porém, sem ocasionar separação de fases, funcionando como um material de enchimento inerte (AZIM et al., 2010). Azim e colaboradores (2010) sugeriram a ausência de interações entre os grânulos de amido de milho ceroso inter cruzado e as micelas de caseína, durante a coagulação ácida de géis contendo 1% e 2,5% de amido em leite. Os autores confirmaram que os grânulos de amido gelatinizados se apresentaram entremeados à matriz proteica do gel, funcionando como um material de enchimento.

Figura 4 - Perfil de pasta do amido de arroz ceroso (10% p/p) com proteínas do leite (10% p/p).



Fonte: Adaptado de Considine et al. (2011).

Zuo e colaboradores (2008), ao estudarem a coagulação ácida de leite adicionado de 2% de amido comum de arroz, demonstraram que para amidos nativos, as temperaturas de gelatinização ideais são aquelas que promovem o maior inchamento dos grânulos, sem, contudo, promover a ruptura. Assim, os autores defendem a teoria de que os amidos inchados funcionam como materiais de enchimento inertes, que absorvem água da fase contínua durante o inchamento, concentrando as proteínas do leite em regiões específicas. Enquanto que, em altas temperaturas, quando a maioria dos grânulos se encontram gelatinizados e dissociados em suas frações moleculares, o sistema tenderá à separação de fases.

Matignon e colaboradores (2014) estudaram as microestruturas de sistemas binários e ternários de amido/carragena/proteínas do leite, utilizando coloração múltipla e Microscopia

Confocal de Varredura a Laser, para avaliar possíveis interações entre essas moléculas. Os autores sugeriram a ocorrência de interações carragena/amido e carragena/proteínas do leite por meio de interações associativas da carragena com as proteínas endógenas do amido e da carragena com a caseína, respectivamente. Porém, os autores não apontaram interações observáveis entre as proteínas do leite e amido. Além disso, quando a carragena, o amido (de milho ceroso estabilizado e inter cruzado - acetilado/adipato) e as proteínas do leite encontravam-se na mesma mistura, preferencialmente, as interações carragena/caseína foram formadas. De maneira geral, a sobreposição das imagens mostrou uma co-localização entre as matrizes de carragena e caseína, formando um único aglomerado, o que confirmaria a interação entre os polímeros. Enquanto que, os grânulos de amido inchados apresentaram-se aprisionados na matrix de carragena/caseína.

Assim, quando amidos normais, gelatinizados em temperaturas inferiores que a temperatura de ruptura dos grânulos, ou quando amidos modificados (resistente à ruptura), gelatinizados, são adicionados ao leite para posterior processo de coagulação, os grânulos de amido tendem a agir como materiais de enchimento, absorvendo água e aumentando de volume, o que faz com que as proteínas se concentrem em regiões, promovendo a interrupção da matriz de caseína (ZUO et al., 2008; AZIM et al. 2010; CORREDIG et al., 2011).

De maneira geral, quando dois biopolímeros tão complexos como o amido e caseína são misturados, uma ampla faixa de interações e efeitos nas propriedades físico-químicas do sistema podem ocorrer e irão depender, como mencionado anteriormente, das suas concentrações relativas, da origem botânica e composição do amido, das condições do meio e do tipo de processamento aplicado (CONSIDINE et al., 2011; CORREDIG et al., 2011).

Assim, o estudo do comportamento de diferentes amidos em presença da caseína pode auxiliar na elucidação do comportamento do amido na matriz de caseína e, conseqüentemente, no entendimento de sua eficiência como repositor de gordura em queijos.

3.7 Aplicação de repositores de gordura, à base de amido, em queijos

Encontram-se disponíveis na literatura, alguns estudos com a finalidade de avaliar o uso de diferentes amidos ou de imitadores de gordura comerciais, à base de amido, nas características tecnológicas de diferentes tipos de queijo. Sipahioglu, Alvarez e Solano-Lopez (1999) estudaram a funcionalidade do amido de mandioca e da lecitina, como imitadores de gordura, em queijo Feta com teor reduzido de gordura. Os queijos foram produzidos com 1% de um repositor à base de amido de mandioca modificado (N-Lite™), ou 0,2% de lecitina, ou ainda, a combinação de 0,5% de N-Lite™ e 0,1% de lecitina. O queijo com teor reduzido de gordura adicionado do repositor à base de amido de mandioca apresentou a maior umidade (67,6%) entre as formulações. No geral, a alta capacidade de absorção de água do amido e da lecitina aumentaram o rendimento e diminuíram a dureza dos queijos Feta, com teor reduzido de gordura. Além disso, a combinação de amido de mandioca e lecitina melhorou o sabor, textura e aceitabilidade geral dos queijos Feta.

O efeito de repositores de gordura à base de proteínas e de carboidratos na microestrutura de queijos Cheddar com baixo teor de gordura foram estudados por Aryana e Haque (2001). Foram utilizados os repositores: Dairy Lo® (1% p/v) e Simplese® (1,5% p/v) à base de proteínas e 1,2% p/v Stellar® (amido de milho modificado) e 0,2% p/v Novagel® (mistura de celulose e

goma guar) à base de carboidratos. Os substitutos Simplese® e Novagel® conferiram textura desejável ao queijo, por promoverem descontinuidade da matriz de caseína, observada na análise de microestrutura. Enquanto que, essa descontinuidade na matriz de caseína não foi observada nas microestruturas dos queijos com adição de Dairy Lo® e Stellar®. Possivelmente, estes repositores promoveram maciez ao queijo por conferirem menor número de camadas na interface proteína-gordura, após período de maturação, uma vez que, quanto maior o número dessas camadas, maior é a resistência ao esmagamento. Portanto, os diferentes tipos de repositores utilizados afetaram de maneira diferente as características dos queijos.

Kavas e colaboradores (2004) estudaram os efeitos da redução de gordura na composição, dureza e propriedades sensoriais de queijo branco em conserva (*White Pickled Cheese*), assim como os efeitos de imitadores de gordura na melhoria das características dos queijos com teores reduzidos de gordura. Foram utilizados: 0,5% de Perfectamylgel MB (amido modificado de batata), 0,4% Satiagel ME4 (k-carragena), Dairy LO® (proteína concentrada de soro) e Simplese® D-100 (proteína microparticulada de leite e ovo) em concentração de 300 g/60 kg de leite. O tipo de substituto de gordura não influenciou o sabor dos queijos, e embora o queijo com teor integral em gordura tenha apresentado a pontuação mais alta, todos os queijos foram considerados aceitos pelos provadores, sem apresentarem sabor residual ou amargor. A adição de substitutos de gordura não foi suficiente para melhorar significativamente as características de textura desses queijos, porém, de maneira geral, os queijos com adição do repositores à base de amido (Perfectamylgel MB®), assim como os que continham Satiagel ME4® e Dairy LO® apresentaram boa aceitação de seus atributos sensoriais, em comparação com o queijo com baixo teor de gordura, sem repositores.

Zisu e Shah (2005) estudaram os efeitos da combinação de pré-acidificação, imitadores de gordura (0,25%) e culturas produtoras de exopolissacarídeos (EPS) em queijo Muçarela com 6% de gordura. Foram produzidos: (1) queijo com adição de cultura produtora de EPS (controle); (2) queijo com cultura produtora de EPS e OptaMax[®] (imitador de gordura à base de amido de milho ceroso); (3) queijo com pré-acidificação, cultura produtora de EPS e OptaMax[®] e (4) queijo com pré-acidificação, cultura produtora de EPS e Versagel[®] (uma mistura de α -globulina, goma carragena e goma xantana). A umidade nos queijos adicionados de imitadores de gordura foi aumentada, melhorando o rendimento e a textura. A pré-acidificação do leite e o uso de OptaMax[®] proporcionaram maior umidade e maior rendimento. Os queijos que continham OptaMax[®] apresentaram melhor derretimento e extensibilidade em comparação com os que possuíam Versagel[®]. A combinação de uso de culturas produtoras de EPS, de pré-acidificação e do repositor de gordura à base de amido (OptaMax[®]) aumentou o rendimento dos queijos com baixo teor de gordura, além de resultar em melhores características de textura do que o queijo Muçarela com baixo teor de gordura, sem adição de imitadores.

Diamantino e colaboradores (2014) estudaram o efeito da aplicação de 0,5% (p/p) de amido de milho ceroso octenilsuccinilado nas características de queijo Minas frescal com teor reduzido de gordura. Os autores observaram que a adição de amido, aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) a umidade e diminuiu a sinérese do queijo Minas frescal *light*. Entretanto, sua adição não foi capaz de melhorar as características de textura e o rendimento dos queijos, provavelmente pela perda de parte do amido adicionado no soro, ou ainda pela quantidade de amido adicionada, que pode não ter sido suficiente para aumentar a capacidade de retenção de água no queijo, a ponto de reduzir sua dureza e aumentar seu rendimento.

Na maioria dos casos citados, os amidos proporcionaram melhora na textura, aumento da capacidade de retenção de água e do rendimento, diminuíram a dureza e não influenciaram negativamente as características sensoriais dos queijos adicionados. No entanto, estudos de aplicação de amidos, como repositores de gordura, em queijos frescos, assim como a avaliação de suas características tecnológicas, são bastante escassos. Neste contexto, o estudo do efeito de diferentes amidos como repositor de gordura, nas características gerais de queijo frescal *light*, pode contribuir com a indústria láctea ao avaliar uma alternativa para melhorar a qualidade desses produtos a serem lançados no mercado.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION REPORTS. Position of the American Dietetic Association: fat replacers. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 105, n. 2, p. 266-275, 2005.

ARYANA, K. J.; HAQUE, Z. U. Effect of commercial fat replacers on the microstructure of low-fat Cheddar cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 166-177, 2001.

BEMILLER, J.N.; WHISTLER, R. **Starch: Chemistry and Technology**, 3. Ed., Burlington: Academic Press, 2009, p. 149-227.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 352, de 04 de Setembro de 1997. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijos Minas Frescal**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Poder Executivo, Brasília, DF, 04 Set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 146, de 07 de Março de 1996. **Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Poder Executivo, Brasília, DF, 07 mar. 1996.

BROWN, K. M.; McMANNUS, W. R.; McMAHON, D. J. Partitioning between curd and whey and effect on curd syneresis and gel microstructure. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 12, p. 6871-6881, 2012.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis – Mini review. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 12, p. 1279-1288, 2005.

CONSIDINE, T.; NOISUWAN, A.; HEMAR, Y.; WILKINSON, B.; BRONLUND, J.; KASAPIS, S. Rheological investigations of the interactions between starch and milk proteins in model dairy systems: A review. **Food Hydrocolloids**, London, v. 25, n. 8, p. 2008-2017, 2011.

CORREDIG, M.; SHARAFBAFI, N.; KRISTO, E. Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. **Food Hydrocolloids**, London, v. 25, n. 8, p. 1833-1841, 2011.

CUNHA, C. R.; VIOTTO, W. H.; VIOTTO, L. A. Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat “Minas Frescal” cheese manufacture: Effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 3, p. 215-224, 2006.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of casein micelles: review and possible improvements. **Soft Matter**, London, v. 7, n. 6, p. 2265-2272, 2011.

DALGLEISH, D. G.; CORREDIG, M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 3, n. 1, p. 49-67, 2012.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. **Fennema's Food Chemistry**. 4. Ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2008, p. 130-135.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.

DIAMANTINO, V. R.; BERALDO, F. A.; SUNAKOZAWA, T. N.; PENNA, A. L. B. Effect of octenyl succinylated waxy starch as a fat mimetic on texture, microstructure and physicochemical properties of Minas fresh cheese. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 56, n. 2, p. 356-362, 2014.

DORNELLAS, J. R. F. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise e “shelf life” do queijo minas frescal**. 1997. 96 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997

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

FARRELL, H. M. Jr., MALIN E. L., BROWN, E. M., QI, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, London, 11, n. 2-3, p. 135-147, 2006.

FRANCO, C. M. L.; WONG, K. S.; YOO, S. H.; JANE, J. L. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 79, n. 2, p. 243-248, 2002.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Milk Proteins. Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 146-238.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de Queijos - Manual Técnico para Produção Industrial de Queijos**. 1. ed., São Paulo: Editora Dipemar Ltda, 1994. 118 p.

GOEL, P. K.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Studies on interactions of corn starch with casein and casein hydrolysates. **Food Chemistry**, Barking, v. 64, n. 3, p. 383-389, 1999.

GUTH, T. L. F. **Panorama do milho**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/2017/33a-ro/panorama-do-milho-tome-guth.pdf/@@download/file/Panorama%20do%20Milho%20-%20Tome%20Guth.pdf>> Acesso em: 02. Dez. 2017.

HORNE, D. S. Casein micelle structure and stability. In: THOMPSON, A.; BOLAND; M. SINGH, H. **Milk Proteins: From Expression to Food**. New York: Academic, 2008. p. 133–162.

HORNE D. S. Casein micelle structure: models and muddles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, London, v. 11, n. 2-3, p. 148-153, 2006.

JANDACEK, R. J. Review of the effects of dilution of dietary energy with olestra on energy intake. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 105, n. 5, p.1124-1131, 2012.

JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **The Japanese Society of Applied Glycoscience**, Tokyo, v. 53, n. 3, p. 205-213, 2006.

JANE, J. Structure of starch granules. **Journal of Applied Glycoscience**, Tokyo, v. 54, n.1, p. 31-36, 2007.

JOHNSON, M. E. Cheese - low-fat cheese. In: HOGINSKI, H. (Ed.), **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Oxford: Elsevier, 2002. p. 438-444.

KARIMI, R.; AZIZI, M. H.; GHASEMLOU, M.; VAZIRI, M. Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 119, p. 85–100, 2015.

KAVAS, G.; OYSUN, G.; KINIK, O.; UYSAL, H. Effect of some fat replacers on chemical, physical and sensory attributes of low-fat white pickled cheese. **Food Chemistry**, Barking, v. 88, n. 3, p. 381-388, 2004.

KETHIREDDIPALLI, P.; HILL, A. R.; DALGLEISH, D. G. 2011. Interaction between casein micelles and whey protein/ κ -casein complexes during renneting of heat-treated reconstituted skim milk powder and casein micelle/serum mixtures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 4, p. 1442-1448.

KETT, A. P.; CHAURIN, V.; FITZSIMONS, S. M.; MORRIS, E. R.; O'MAHONY, J. A.; FENELON, M. A. Influence of milk proteins on the pasting behaviour and microstructural characteristics of waxy maize starch. **Food Hydrocolloids**, London, v. 30, n. 2, 661-671, 2013.

KOCA, N.; METIN, M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh Kashar cheeses produced by using fat replacers. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, n. 4, p. 365-373, 2004.

LUCCA, P. A.; TEPPER, B. J. Fat replacers and the functionality of fat foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 12-19, 1994.

MAGENIS, R. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; STEPHAN, M. P.; EGITO, A. S.; DAGUER, H. Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. **Food Control**, Vurrey, v. 45, p. 22-28, 2014.

MANTHEY, F. A. Starch: Sources and processing, In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. 1. Ed. Vol. 1. Oxford: Academic Press, 2016, p. 160-174.

MISTRY, V. V. Low fat cheese technology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4-7, p. 413-422, 2001.

NOISUWAN, A.; BROLAND, J.; WILKINSON, B.; HEMAR, Y. Effect of milk protein products on the rheological and thermal (DSC) properties of normal rice starch and waxy rice starch. **Food Hydrocolloids**, London, v. 22, n. 1, p. 174-183, 2008.

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

O'CONNOR, T. P.; O'BRIEN, N. M. Butter and Other Milk Fat Products - Fat Replacers, In: FUQUAY, J. W. (Ed.), **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2011. p. 528-532.

O'CONNOR, T. P.; O'BRIEN, N. M. Fat Replacers, In: SMITHERS, G. (Ed.), **Reference Module in Food Science**, 1. ed. Oxford: Elsevier, 2016. p. 1-5.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. 2. ed. Campinas: Ed. Unicamp, 1986. 146 p.

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.

PUTSEYS, J. A., LAMBERTS, L. DELCOUR, J.A. Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. **Journal of Cereal Science**, London, v. 51, n.3, p. 238-247, 2010.

RAMÍREZ-LÓPEZ, C.; VÉLEZ-RUIZ, J. F. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, Puebla, v. 6, n. 2, p. 131-148, 2012.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2004. 184 p.

ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 620-628, 2008.

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

ROSENTHAL, A. J., Low-fat foods - Types and Manufacture, In: CABALLERO, B. (Ed.), **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2. ed. Oxford: Academic Press, 2003, p. 3612-3617.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S. G. C.; YAGASAKI, C. A.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SANT'ANA, A. M. S.; BEZERRIL, F. F.; MADRUGA, M. S.; BATISTA, A. S. M.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 12, p. 7442-7453, 2013.

SIPAHIOGLU, O.; ALVAREZ, V. B.; SOLANO-LOPEZ, C. Structure, physico-chemical and sensory properties of feta cheese made with tapioca starch and lecithin as fat mimetics. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 11, p. 783-789, 1999.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, Barking, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. In: **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n.1, Rio de Janeiro: SBC – Núcleo Interno de Publicações, 2013, p. 8-9. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2013/Diretriz_Gorduras.pdf> Acesso em: 15 jan. 2016.

SYRBE, A.; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, H. Polymer science concepts in dairy systems - An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 3, p. 179-193, 1998.

TÁRREGA, A.; VÉLEZ-RUIZ, J.F.; COSTELL, E. Influence of milk on the rheological behaviour of cross-linked waxy maize and tapioca starch dispersions. **Food Research International**, Barking, v. 38, n. 7, p. 759–768, 2005.

UPADHYAY, V. K.; McSWEENEY, P. L. H.; MAGBOUL, A. A. A.; FOX, P. F. Proteolysis in cheese during ripening. In: FOX, P. F. et al. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 3. ed. v. 1. London: Elsevier Academic Press, 2004.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 748-753, 2009.

YE, A.; HEWITT, S. Phase structures impact the rheological properties of rennet-casein-based imitation cheese containing starch. **Food Hydrocolloids**, London, v. 23, n. 3, p. 867-873, 2009.

ZALESKA, H.; RING, S.; TOMASIK, P. Electrosynthesis of potato starch-casein complexes. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 509-515, 2001.

ZISU, B., SHAH, N. P. Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstructure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6-9, p. 957–972, 2005.

ZUO, J. Y., HEMAR, Y., HEWITT, S., SAUNDERS, A. Effect of the extent of pasting on the dynamic rheological properties of acidified skim milk gels containing normal rice starch. **Food Hydrocolloids**, London, n. 22, v. 8, p. 1567-1573, 2008.

CAPÍTULO II*

Starch as a potential fat replacer for application in cheese: behavior of different
starches in casein/starch mixtures and in the casein matrix

* Este manuscrito será submetido ao periódico International Dairy Journal, que apresenta Fator de impacto = 2.067 e classificação A2 no Qualis/CAPES.

**Starch as a potential fat replacer for application in cheese: behavior of different starches
in casein/starch mixtures and in the casein matrix**

Vivian R. Diamantino^{1*}, Mariana S. Costa¹, Sebastião R. Taboga², Patrícia S. L. Vilamaior², Célia M. L. Franco¹, Ana Lúcia B. Penna^{1†}

UNESP - São Paulo State University, ¹Department of Food Engineering and Technology, ²Department of Biology, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Abstract

The behavior of different types of native and modified starch (regular maize starch – RMS, waxy maize starch – WMS, high-amylose maize starch – HAMS, acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS, and hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS) in the presence of casein were studied aiming to understand their potential use as fat replacers for application in cheese. The pasting, thermal properties, and swelling power of casein/starch dispersions were evaluated, as well as their behavior in the casein matrix and quantification of starch in whey. Casein/starch dispersion simulates the concentrations of fat replacers frequently used in cheese (0.5%, 1.0%, and 1.5% of starch) and the concentration of casein found in milk (2.5%). The two modified starches (AAMS and HPMS) presented the best results at high concentrations. They showed high viscosities (peak and final), indicating a high potential for water retention in cheese, as well as lower peak temperatures and lower

[†]Corresponding authors: R. Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 17 32212266; Fax: +55 17 32212299. E-mail address: analucia@ibilce.unesp.br (A.L.B. Penna); vivian.diamantino@hotmail.com (V.R. Diamantino).

variation of enthalpy (ΔH), requiring thereby lower gelatinization temperatures. They also showed other important characteristics to produce reduced-fat cheese, such as low tendency for retrogradation, high swelling power, and good resistance under processing conditions. Finally, to the very low loss in whey of both modified starches and their presence embedded in the protein matrix, they can be considered promising fat replacers in cheese; HPMS also showed a more open structure and a higher retention rate in curd than AAMS.

Keywords: corn starch, pasting properties, thermal properties, swelling power, confocal microscopy, liquid chromatography.

1 Introduction

Experts around the world recommend a reduced-fat intake to obtain health and esthetic benefits. However, fat has a key role in food creaminess, appearance, aroma, tenderness and juiciness. In cheese, the removal of fat will mainly affect its texture, resulting in a product with a "rubbery" texture – more elastic and firm – besides lower yield of cheese production and atypical flavors (O'Connor & O'Brien, 2011; Rosenthal, 2003).

One of the strategies that have been used to improve the characteristics of cheese with reduced-fat content is the use of fat replacers. Fat replacers are ingredients that can be incorporated into food products, for total or partial replacement of fat, but with fewer calories. Among fat replacers, starch is largely used due to its low cost and high availability (Mistry, 2001; O'Connor & O'Brien, 2011).

When starch is heated in excess of water, a process of gelatinization occurs.

Gelatinization is the disruption of molecular organization within the starch; the amylopectin double helices dissociate, with loss of crystallinity, and the granules swell by binding water. As the starch paste cools, intermolecular interactions involving amylose and amylopectin molecules occur, increasing the medium viscosity and forming a gel. Nevertheless, different behaviors during the heating and cooling processes are normally shown by either native or modified starches due to the differences in their compositions; such differences affect the characteristics of gels (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2008; Kett et al., 2013; Tárrega, Vélez-Ruiz, & Costell, 2005).

Regular maize starches normally contain between 25-28% amylose and produce consistent gels after cooking. Waxy starches generally contain little or no amylose, and produce weak, clear and sticky gels with a high peak viscosity and low retrogradation tendency. Finally, high-amylose starches normally contain more than 50% amylose (reaching up to 70%), and present high gelatinization temperatures and capacity of forming films (BeMiller & Whistler, 2010; Parker & Ring, 2001).

Some types of modifications can be made in native starches to improve the gel's characteristics. Many of these modifications are applied to reduce the retrogradation tendency of pastes and to improve their resistance to heat, shear, and acid conditions. Most chemical modifications have been produced with reagents that react with hydroxyl groups, forming esthers and ethers. Esterified or etherified starches with monofunctional reagents resist the interchain associations, which will reduce the tendency of the starch gel to precipitate, due to the retrogradation process; thus, this modification is called stabilization. On the other hand, the use of bifunctional reagents produces crosslinked starches, which present a higher thermomechanical resistance, among other characteristics. Starches that have been both

crosslinked and stabilized (e.g. hydroxypropilated distarch phosphate, and acetylated distarch adipate) usually have lower gelatinization and pasting temperatures, produce pastes with higher viscosity values and show some other attributes of crosslinking and stabilization, considering its base starch. Modified food starches are often both crosslinked and stabilized (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2008; Tárrega, Vélez-Ruiz, & Costell, 2005).

Due to their natural property of binding extra water, starches may be used as fat replacers in a diversity of food products, as they can create a sense of lubricity similar to that of full-fat products (Sipahioglu, Alvarez, & Solano-Lopez, 1999). In reduced-fat cheese, starches may act improving texture due to their high-water retention capacity (Brown, McMannus, & McMahon, 2012). The concentrations of starch used as fat replacers in cheese available in the literature normally ranges from 0.5 to 1.5 % (Aryana; Haque, 2001; Diamantino et al., 2014; Kavas et al., 2004; Sipahioglu, Alvarez, & Solano-Lopez, 1999). Diamantino et al. (2014) reported that even though the addition of a modified waxy maize starch increased the moisture content and water holding capacity of a reduced-fat fresh cheese, its addition was insufficient to improve the yield of production and texture parameters of the cheese. The authors suggested as possible causes the loss of starch in whey, caused by the lack of interaction between starch and casein or the amount of starch used (0.5%) that may be insufficient. On the other hand, Goel, Singhal and Kulkarni (1999) indicate a possible occurrence of cross-linking between casein and starch, since proteins contain many hydrophilic groups such as -OH, -NH₂, -COOH, and -SH in their alkyl side chains, which can interact with hydroxyl groups of starch.

Although starches and milk proteins, separately, have been extensively studied, there have been few studies on the microstructural characteristics, gelatinization, pasting, rheological properties, and other physico-chemical properties of casein/starch mixtures (Considine et al.,

2011; Goel, Singhal, & Kulkarni, 1999; Kett et al., 2013; Noisuwan et al., 2008; Sun et al., 2016). Furthermore, to the best of our knowledge, there are no studies on the starches' properties in the presence of casein, aiming to understand their behavior and potential functionality as a fat replacer in cheese.

Therefore, the aim of our study was to investigate the behavior of different types of native starch (regular maize starch – RMS, waxy maize starch – WMS, and high-amylose maize starch – HAMS) and modified starch (acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS, and hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS) in casein dispersions and casein matrix, aiming to evaluate their potential use as fat replacers in cheese.

2 Material and methods

2.1 Materials

Commercial maize starches were supplied by Cargill Starches and Sweeteners South America (São Paulo, SP, Brazil). Three types of pure native starch (regular maize starch – RMS, waxy maize starch – WMS, and high-amylose maize starch – HAMS) and two types of modified pure starch (acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS, and hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS) were used in this study. The calcium caseinate (CN) was Caseical™ (pure calcium caseinate) obtained from Danone, Medical Nutrition Division (São Paulo, SP, Brazil).

2.2 Study of starch properties in the presence of casein

2.2.1 Preparation of casein/starch mixtures

In order to evaluate the properties of the five different starches in the presence of casein, casein/starch dispersions were produced. To simulate the concentrations of fat replacers frequently used in cheese, mixtures of CN and starch in the proportions of 2.5:0.5, 2.5:1.0, and 2.5:1.5 (CN:starch) were produced, taking into account that starch will be gelatinized in milk before cheese production and the concentration of casein in 100 g milk is about 2.5 g. In addition, dispersions of each pure starch and pure CN were produced as controls, totaling 21 trials. Maintaining these proportions of casein:starch, the concentrations of the solutions varied for each test and are detailed described in the topics 2.2.2, 2.2.3 and 2.2.4.

2.2.2 Pasting properties

The pasting properties (peak, breakdown, setback and final viscosities - RVU, and pasting temperature - °C) of casein/starch dispersions were determined through a Rapid Visco-Analyzer (RVA-4, Newport Scientific, Warriewood, Australia). Casein/starch dispersions in deionized water (20% w/w – 2.5 g sample/12.5 g water) and pure casein and starch samples (10% w/w – 2.5 g sample/25 g water) were prepared in RVA aluminum canisters. Plastic stirring paddles were placed in the canisters containing the samples, and this system was attached to the RVA. A heating and cooling cycle method commonly used for starch pasting studies was applied as follows: the samples were stirred at 960 rpm and heated to 50 °C, then the stirring

was decreased to 160 rpm for the rest of the analysis. Temperature was kept at 50 °C/1 min. The samples were then heated from 50 to 95 °C at a rate of 6 °C/min, and the temperature kept at 95 °C/5 min. Then, samples were cooled down to 50 °C at a rate of 6 °C/min, totaling 23 min of analysis (Chaisawang & Suphantarika, 2006; Putseys et al., 2010; Tárrega, Vélez-Ruiz, & Costell, 2005). The results were analyzed through Thermocline for Windows software (version 2.2, Newport Scientific) using the STD2 (Standard 2) thermal treatment profile. All the analyses were carried out in triplicate.

2.2.3 Thermal properties

The thermal properties of the casein/starch dispersions were determined using a differential scanning calorimeter (DSC - Pyris1, Perkin Elmer Co., Waltham, MA, USA). Casein/starch dispersions were prepared following the concentrations previously described in item 2.2.1. Each sample (i.e. pure casein and starch and their mixtures) was weighed (2 mg in dry basis) in aluminum pans and added of deionized water (6 mL). The pans were hermetically sealed and kept at room temperature for 24 h to equilibrate the distribution of water. The samples were scanned at a rate of 10 °C/min at temperatures ranging from 25 °C to 125 °C. An empty pan was used as reference. The gelatinization endotherm as well as the gelatinization temperatures: onset (T_o), peak (T_p) and conclusion (T_c), and the gelatinization enthalpy (ΔH_{gel}) were obtained in triplicate using Pyris 1 software (Perkin Elmer) (Villas-Boas & Franco, 2016). After the analysis, the pans were stored at 5 °C for 7 days and the thermal properties related with starch retrogradation were evaluated using the same equipment and parameters. The percentage of retrogradation (%R) was calculated as the ratio between the retrogradation enthalpy (ΔH_{ret})

and the gelatinization enthalpy (ΔH_{gel}) multiplied by 100 (Sandhu & Singh, 2007).

2.2.4 Swelling power

Swelling power of starches, casein and casein/starch dispersions were determined in duplicate following a modified method by Mandala and Bayas (2004), and Chaisawang and Supphantharika (2006). Starch, casein and casein/starch dispersions (1% w/w – 0.2 g sample in 20 g distilled water) were put into centrifuge tubes with closed screw caps and heated in a shaking water bath for 30 min, at different temperatures: 55, 65, 75, 85 and 95 °C. After heating, the tubes were kept at room temperature until they reached approximately 25 °C and were then centrifuged at 3,000 x *g* at 25 °C/15 min. The precipitated gel was weighed, and the swelling power was calculated as the ratio of the precipitated gel weight to the weight of its sample (dry basis). The analyses were carried out in duplicate.

2.3 Study of starch interaction with casein matrix

2.3.1 Preparation of curd samples

Curd samples were prepared using the starch samples which presented high viscosity values (peak and final), indicating a high potential for water retention in cheese, as well as lower peak temperatures and lower variation of enthalpy (ΔH), requiring thereby lower gelatinization temperatures, which is important for the adequate coagulation of cheese. Curd samples were produced in centrifuge tubes (50 mL), according to an adapted method by Brown, McManus,

and McMahon (2012), using the AAMS and HPMS samples at 1.5%. Starch samples (1.5 g.100 mL⁻¹) were dispersed in cold standardized milk (1.5% fat) and then heated to 70 °C for 1 min in order to allow the starch samples to become gel, without hardly affecting their whey proteins. The milk with gelatinized starch was cooled to 35 °C. A control sample without starch was also prepared. After reaching 35 °C, the following ingredients were added: 0.025 g.100 mL⁻¹ calcium chloride (Synth, Labsynth Produtos para Laboratório Ltd., Diadema, SP, Brazil), 0.2 mL/100 mL starter culture (R-704, 50 U, Christian Hansen, Horsholm, Denmark) composed of *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* strains, diluted in ultra high temperature (UHT) skim milk, and 2.5 g.100 L⁻¹ chymosin (Chy-max, Chymosin Powder, Christian Hansen) previously diluted in water. The ingredients were stirred for 2 min, and coagulation was allowed to occur for 45 min. Then, the gel was cut with a spatula vertically with three cuts in each of two perpendicular directions. The tubes containing the gels were centrifuged at 500 x *g* at 25 °C/15 min, followed by another centrifugation at 1,000 x *g* at 25 °C/15 min. The whey released was collected and stored in freezer (-80 °C) for its posterior use in the starch content analysis, while the centrifuged gel were maintained at 5 °C for its posterior use in the microstructural analysis.

2.3.2 Microstructural analysis

The samples were prepared for microstructural analysis (by Laser Scanning Confocal Microscopy - LSCM), according to a modified method by Van de Velde et al. (2003) and Brown, McManus, and McMahon (2012). The curd was diced, measuring approximately 0.5 cm³, and frozen in liquid nitrogen for 10 min. The frozen curd samples were cut (1 mm-thick slices) at -18 °C with a cryostat equipment (Leica CM1850, Leica Biosystems, Oberkochen, BW,

Germany) and directly mounted on glass slides. The samples were fixed in a solution of 4% paraformaldehyde and 4% glutaraldehyde in phosphate buffer (0.1M) for 5 min, and subsequently washed with water. Then, the samples were stained with eosin (0.1%) for 2 min, washed with ethanol 95% (twice), and subsequently stained with fluorescein 5-isothiocyanate (FITC) (0.1%) for 10 min, in absence of light. A droplet of water was added to each sample and they were covered with a coverslip. The slides were maintained protected from light, until their visualization through the microscope (Zeiss LSM 710 Confocal Microscope - Carl Zeiss AG, Oberkochen, BW, Germany). The observations were carried out in 10x and 40x, and the images were analyzed through Zen 2010 software (Zeiss, Carl Zeiss AG).

2.3.3 Starch content analysis

Starch content in whey was measured in duplicate by liquid chromatography quantification of glucose using a HPAEC-PAD system (ICS 3000, Dionex Corporation, Sunnyvale, USA) equipped with an AS40 automatic sampler (adapted from Casarotti et al., 2014). The samples preparations were as follows: 25 mL of whey released from each curd sample (with AAMS, with HPMS, and without starch) were added of 10% HCl solution (50 mL HCl + 5 mL deionized water) and heat-treated at 120 °C for 20 min in autoclave to disrupt glycosidic linkages. The samples were then centrifuged (10,000 x *g* for 15 min) and their supernatant was collected.

The supernatant from each sample was filtered through membrane filters with 0.22- μ m pore diameters (Millipore®, Darmstadt, Germany) and injected into a HPAEC-PAD system (20 mL sample loop). Separation was achieved using a Dionex CarboPac™ PA1 guard column (250

× 2 mm) and a Dionex CarboPac™ PA1 column (250 × 2 mm). The flow rate was 1.0 mL/min at 30 °C. All eluents were prepared with ultrapure water (18 MΩ.cm) with N₂ sparging. Eluent A was 200 mM sodium hydroxide, and eluent B was 1,000 mM sodium acetate and 100 mM sodium hydroxide. The gradient elution was as follows: linear gradient from 0 to 24 mM sodium hydroxide (0-14 min), linear gradient from 24 to 107 mM sodium hydroxide and 0 to 70 mM sodium acetate (14-25 min), and constant concentration of 24 mM sodium hydroxide (25-30 min).

The quantification of starch in the samples was carried out by multiplying their glucose content by 0.9 (conversion factor for glucose to starch). Previously, the glucose content of AAMS and HPMS whey samples had been deducted from the glucose content of the control sample to eliminate the quantification of glucose resulted from lactose hydrolysis. The starch retention in curd was calculated by the ratio between the amount of starch that remained in cheese and the total starch added in curd, multiplied by 100.

2.4 Statistical analysis

Analyses of variance (ANOVA) were performed in order to evaluate the significant differences among data. Tukey's multiple comparison test was used to compare the mean values. A probability of 0.05% was used to establish statistical significance. The statistical analyses were conducted using Statistica 7.0 program (StatSoft, Inc., 2004, Tulsa, OK, USA).

3 Results and discussion

3.1 Study of starch properties in the presence of casein

3.1.1 Pasting properties

In general, the properties of starch gels were affected by the concentrations of starch in the dispersions (Fig. 1 and Table 1). In most of the samples, low concentrations of starch in the mixture resulted in lower viscosity values (peak, breakdown, final and setback), probably due to the dilution effect of starch. However, some differences were also observed, mainly for pasting temperatures and peak viscosities, which may be attributed to an interaction between the different types of starch and casein.

The high amylose starch (HAMS) did not present viscosity over the experiment; neither for any of the mixtures with casein, nor for the pure starch sample (10% w/w) (Fig. 1.E). The high amylose content of the HAMS (more than 50%) generates a densely packed molecular structure, resulting in low molecular mobility and, therefore, in high gelatinization temperatures, usually close to 100 °C (see DSC results in Table 2) (Srichuwong et al., 2005; Copeland et al., 2009). Such high temperatures are impossible to be achieved when using the RVA equipment, which reaches a maximum temperature of 95 °C. Consequently, the HAMS was certainly not gelatinized under the heating conditions of the RVA, generating very low viscosities; additionally, it was not affected by the presence of casein in the mixtures.

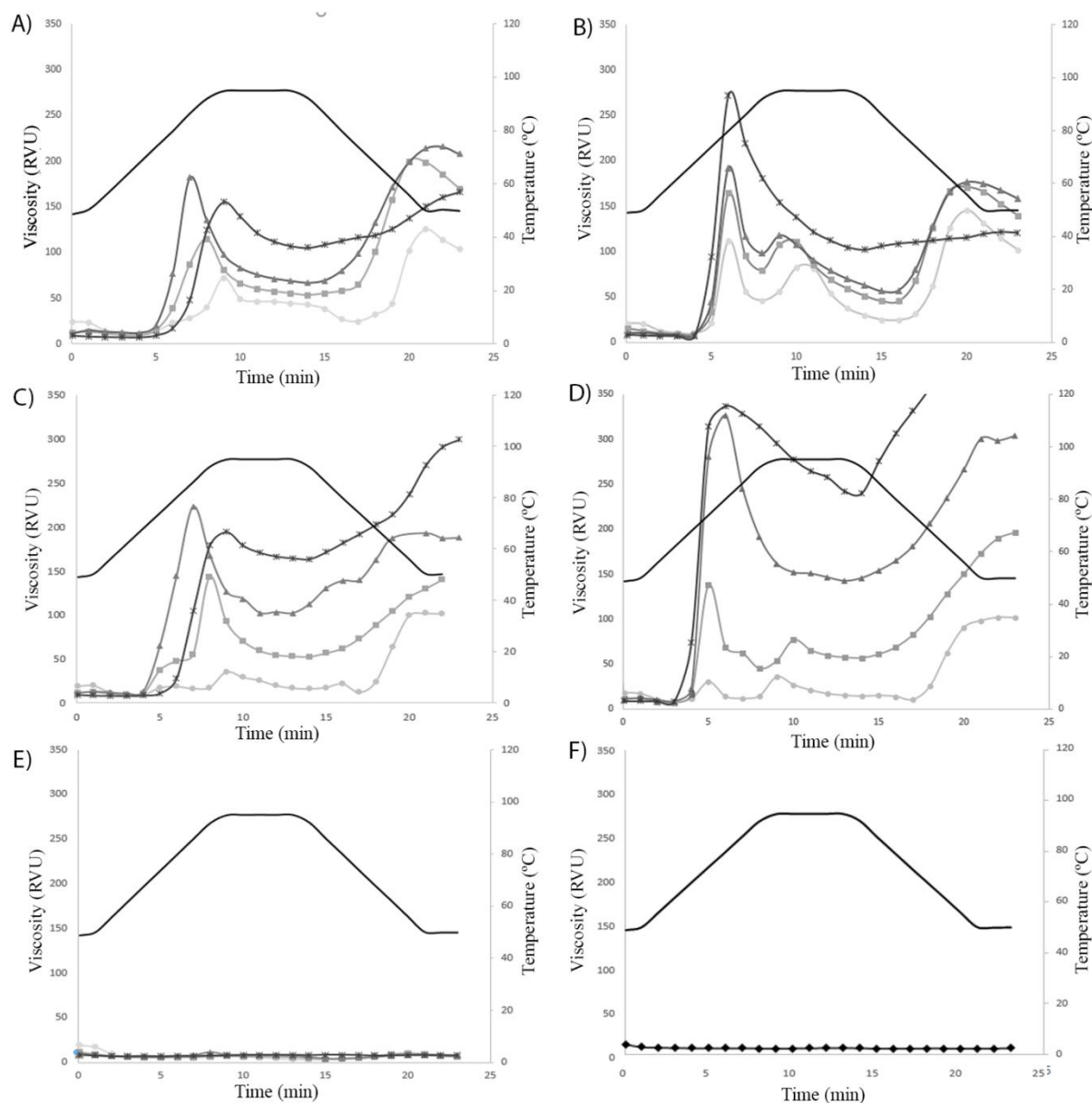


Figure 1. Pasting profile of casein/starch dispersions. Samples are casein in mixtures with: regular maize starch – RMS (A), waxy maize starch – WMS (B), acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS (C), hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS (D), and high-amylose maize starch – HAMS (E), in the proportions of 2.5:0.5 (—○—), 2.5:1.0 (—■—), 2.5:1.5 (—▲—) casein:starch (at 20% w/w), and 0.0:1.0 (—✱—) casein:starch (at 10% w/w); F: pure calcium caseinate at 20% w/w (—◆—); Temperature (—).

Among the studied starch samples, with exception of the HAMS, the regular maize starch (RMS) presented the highest pasting temperatures (Table 1). Higher pasting temperatures

indicate higher starch gelatinization resistance caused by high structural stability. The lower the temperature, the easier the cooking, and subsequently, the gelatinization of starch (Copeland et al., 2009; Tester & Morrison, 1990). A high structural stability is expected for regular maize starches due to their higher amylose content (when compared to waxy starches) and high lipid content. The natural presence of lysophospholipid in maize starch forms complexes with amylose and the very long branched chains of amylopectin, resulting in lower swelling power and lower heat paste viscosity (Putseys et al., 2010; Singh et al., 2003), as observed in this study by the low peak viscosity values of the RMS starch samples.

However, in the mixtures, whose concentrations of starch are very low when compared to pure starch dispersion, pasting temperatures were very close to the pure starch sample (at 10% w/w solids in water) for 1% of starch addition (1.0:2.5 starch: casein at 20% w/w solids in water). For 1.5% starch addition (1.5:2.5 starch: casein at 20% w/w solids in water), the pasting temperatures were even lower, overcoming the dilution effect of starch that normally increases pasting temperature. This effect may be attributed to the presence of casein. According to Goel, Singhal and Kulkarni (1999), starch pastes are suspensions of swollen particles dispersed in a macromolecular medium. It can be considered that proteins are located within the continuous phase, and thus the volume of the phase accessible to the proteins is reduced; this causes an increase in concentration in the continuous medium, which results in a high viscosity. The swollen particles are mainly composed of amylopectin, while the continuous medium consists of amylose. It is probably the amylose interaction with casein that dominate the system. This theory explains the highest peak viscosity of the sample with 1.5% starch addition, as well as its lowest pasting temperatures, when compared to the other RMS samples in the present study.

Table 1. Pasting properties of starch, CN and CN/starch dispersions.

Samples	Pasting temperature	Viscosity (RVU)			
		Peak	Breakdown	Final	Setback
RMS*	85.85 ^b ± 0.26	151.47 ^b ± 1.18	51.11 ^d ± 2.39	161.53 ^b ± 0.12	161.17 ^a ± 2.24
0.5%RMS+CN	92.83 ^a ± 0.02	82.69 ^d ± 2.43	61.05 ^c ± 0.85	98.59 ^c ± 1.90	76.95 ^d ± 0.32
1.0%RMS+CN	84.48 ^b ± 0.04	138.12 ^c ± 3.16	87.59 ^b ± 2.14	160.86 ^b ± 3.80	110.33 ^c ± 2.79
1.5%RMS+CN	74.40 ^c ± 0.00	180.96 ^a ± 1.50	116.56 ^a ± 1.58	196.42 ^a ± 5.38	132.01 ^b ± 5.29
WMS*	71.58 ^c ± 0.02	261.27 ^a ± 0.57	166.76 ^b ± 0.08	116.11 ^c ± 0.00	21.60 ^c ± 0.49
0.5%WMS+CN	75.00 ^a ± 0.20	110.97 ^d ± 0.45	86.70 ^d ± 0.61	103.04 ^d ± 1.98	78.77 ^b ± 2.14
1.0%WMS+CN	73.20 ^{a,b} ± 0.00	196.54 ^c ± 1.13	150.50 ^c ± 1.29	140.83 ^b ± 1.82	94.79 ^a ± 1.66
1.5%WMS+CN	72.35 ^b ± 0.00	232.30 ^b ± 2.18	178.01 ^a ± 2.35	154.14 ^a ± 0.40	99.85 ^a ± 0.57
AAMS*	74.80 ^c ± 0.00	187.76 ^b ± 3.36	31.44 ^c ± 1.42	286.68 ^a ± 4.04	130.35 ^a ± 2.10
0.5%AAMS+CN	90.75 ^a ± 0.05	34.23 ^d ± 0.65	23.14 ^d ± 0.32	95.11 ^d ± 1.42	84.03 ^c ± 1.09
1.0%AAMS+CN	88.28 ^b ± 1.03	138.56 ^c ± 3.28	88.72 ^b ± 2.14	148.64 ^c ± 4.21	98.80 ^b ± 5.34
1.5%AAMS+CN	70.73 ^c ± 0.02	236.96 ^a ± 2.95	140.51 ^a ± 2.55	170.73 ^b ± 1.94	74.28 ^d ± 2.35
HPMS*	65.55 ^b ± 0.00	327.94 ^b ± 0.89	93.78 ^b ± 5.17	483.82 ^a ± 2.14	249.66 ^a ± 2.14
0.5%HPMS+CN	63.58 ^c ± 0.04	37.58 ^d ± 0.04	28.85 ^d ± 0.45	100.62 ^d ± 4.57	91.88 ^d ± 4.17
1.0%HPMS+CN	68.35 ^a ± 0.00	136.58 ^c ± 4.29	83.62 ^c ± 2.47	194.19 ^c ± 4.53	141.24 ^c ± 2.71
1.5%HPMS+CN	67.55 ^{a,b} ± 0.00	342.91 ^a ± 3.16	204.02 ^a ± 4.33	296.91 ^b ± 1.09	158.02 ^b ± 2.27
HAMS*	-	7.98 ^c ± 0.45	0.65 ^c ± 0.29	7.71 ^a ± 0.23	0.38 ^c ± 0.17
0.5%HAMS+CN	-	9.01 ^b ± 0.17	6.04 ^a ± 0.36	6.8 ^b ± 0.43	3.83 ^a ± 0.28
1.0%HAMS+CN	-	7.31 ^c ± 0.66	3.99 ^b ± 0.57	6.53 ^b ± 0.45	3.21 ^{a,b} ± 0.09
1.5%HAMS+CN	-	10.80 ^a ± 0.04	6.72 ^a ± 0.08	6.92 ^b ± 0.20	2.83 ^b ± 0.08
CN	-	8.34 ± 1.02	1.24 ± 0.36	7.55 ± 0.59	0.40 ± 0.14

Values are the mean of three replications ± standard deviation. ^{a, b, c, d} Different letters in the same column for each sample differ significantly ($p \leq 0.05$). Samples are casein - CN in mixtures with: regular maize starch – RMS, waxy maize starch – WMS, acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS, hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS, and high-amylose maize starch – HAMS, in the proportions of 1:0 (pure casein), 2.5:0.5, 2.5:1.0, and 2.5:1.5 casein:starch in the concentration of 20% w/w. * Pure starch dispersions are in the concentration of 10% w/w.

Although the acetylated/adipate maize starch (AAMS) has a regular maize starch as its base, its properties significantly changed due to modifications. The AAMS is simultaneously a crosslinked and a stabilized starch and presents properties of these two types of modification. This type of starch generally has lower pasting temperatures, higher peak viscosity, and a reduced tendency of retrogradation, compared to a native regular starch (Damodaran, Parkin, &

Fennema, 2008). These properties corroborate with the results found for the AAMS samples (Table 1; Fig. 1.C) and are important characteristics for a starch being used as a fat replacer in reduced-fat fresh cheese. Lower pasting temperatures are desirable for the cheese production since high thermal treatments affect negatively the coagulation process. At temperatures above 75 °C at the pH of milk (~ 6.5), whey proteins can participate in sulphydryl-disulphide interchange reactions which lead to the formation of disulphide-linked complexes with caseins fractions, thus causing profound effects on the functionality of the milk protein system, disturbing rennet coagulation (Fox & McSweeney, 1998). Additionally, the same tendency observed for RMS of increasing peak viscosity and decreasing pasting temperature were observed for the sample with 1.5% starch addition. This may be also due to the interaction of casein with amylose leached to the starch granules (Goel, Singhal, & Kulkarni, 1999).

Waxy maize starch (WMS) samples presented low pasting temperatures, higher peak viscosity and lower setback viscosity values when compared with regular maize starch samples (Fig. 1.B), since waxy starch is almost entirely composed of amylopectin molecules (Jane, 2007). Amylopectin promotes a higher swelling of the starch and, consequently, higher peak viscosity values due to the high quantity of available hydroxyl groups in its branched chains. In addition, lower setback viscosity values are observed because they are related to the amylose retrogradation, which provides the cold paste firmness characteristic. Amylose molecules are almost inexistent in waxy starches, thereby promoting the weak and sticky gels characteristic of waxy starch. Despite some important properties for a fat replacer in cheese displayed by WMS, this type of starch presented a fast decline of the curve between peak and minimum viscosity values (Fig. 1.B). This is an undesirable feature because it indicates low shear-resistance and low stability under processing conditions, common for the cheese production. In addition, for

the mixtures, the same tendency observed for regular starches of increasing in peak viscosity and reducing of pasting temperatures were not observed for WMS, and this may be due to the lack of amylose in waxy starch, while this polysaccharide may interact with casein in the macromolecular medium, increasing these parameters.

The waxy hydroxypropylated/phosphate maize starch (HPMS), also a crosslinked/stabilized starch, presented a slower decline in the curve between time and viscosity (i.e. a larger peak base), which indicates more resistance to processing conditions (Fig. 1.D) compared to the fast decline (i.e. sharp peak base) observed for WMS (Fig. 1.B). This increase in starch resistance is hardly associated with the crosslinking by distarch phosphate esters that are responsible for the higher stability of this starch when compared to native waxy maize starches (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2008). The HPMS samples also showed the lowest pasting temperatures of the study (Table 1), possibly because hydroxypropylation generally reduces the starch pasting temperatures, which is relevant to cheese production as they reduce the necessary energy to cook and accelerate the gel formation (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2008). On the other hand, the HPMS samples presented higher setback values, even for the pure dispersion. The high setback values of the HPMS samples may be associated to their very high final viscosity value which influences directly setback values and increases the consistency of the gels. The characteristic high final viscosity of this type of starch is probably caused due to the combination of modifications applied on it, by increasing the water binding capacity of waxy starch through stabilization and maintaining granules resistance, avoiding breakdown and subsequent decreasing in viscosity through the crosslinking process.

Therefore, the modified starches presented more promising results to be used as fat replacers in cheese. In the mixtures, the AAMS presented low pasting temperatures, high peak

viscosity values, and a high resistance to process conditions, compared to RMS, while HPMS presented the lowest pasting temperatures and the highest peak viscosity values as well as a considerable resistance to process conditions (Table 1).

3.1.2 Thermal properties

In general, the presence of casein did not affect the thermal properties of the starch samples (Fig. 2). For onset, peak, and conclusion temperatures, there were small changes in the values among the different concentrations of starch/casein mixtures for a single type of starch (Table 2). However, the gelatinization enthalpy values (ΔH) were higher in pure starch dispersions compared to those in the starch/casein mixtures, since they present a larger proportion of starch than the mixtures. For the same reason, there was a small increase in ΔH , as the concentrations of starch increased in the mixtures (Table 2). Therefore, the presence of CN did not influence significantly the thermal properties of the starch dispersions probably because pure CN did not dissociate at the temperatures applied in the study (25 - 125 °C), and no endotherm was formed (Fig. 2.F). Additionally, the CN thermal resistance was so high that no endotherm peak was observed even under high temperature conditions, e.g., 25 °C to 200 °C, using a stainless-steel pan (data not shown).

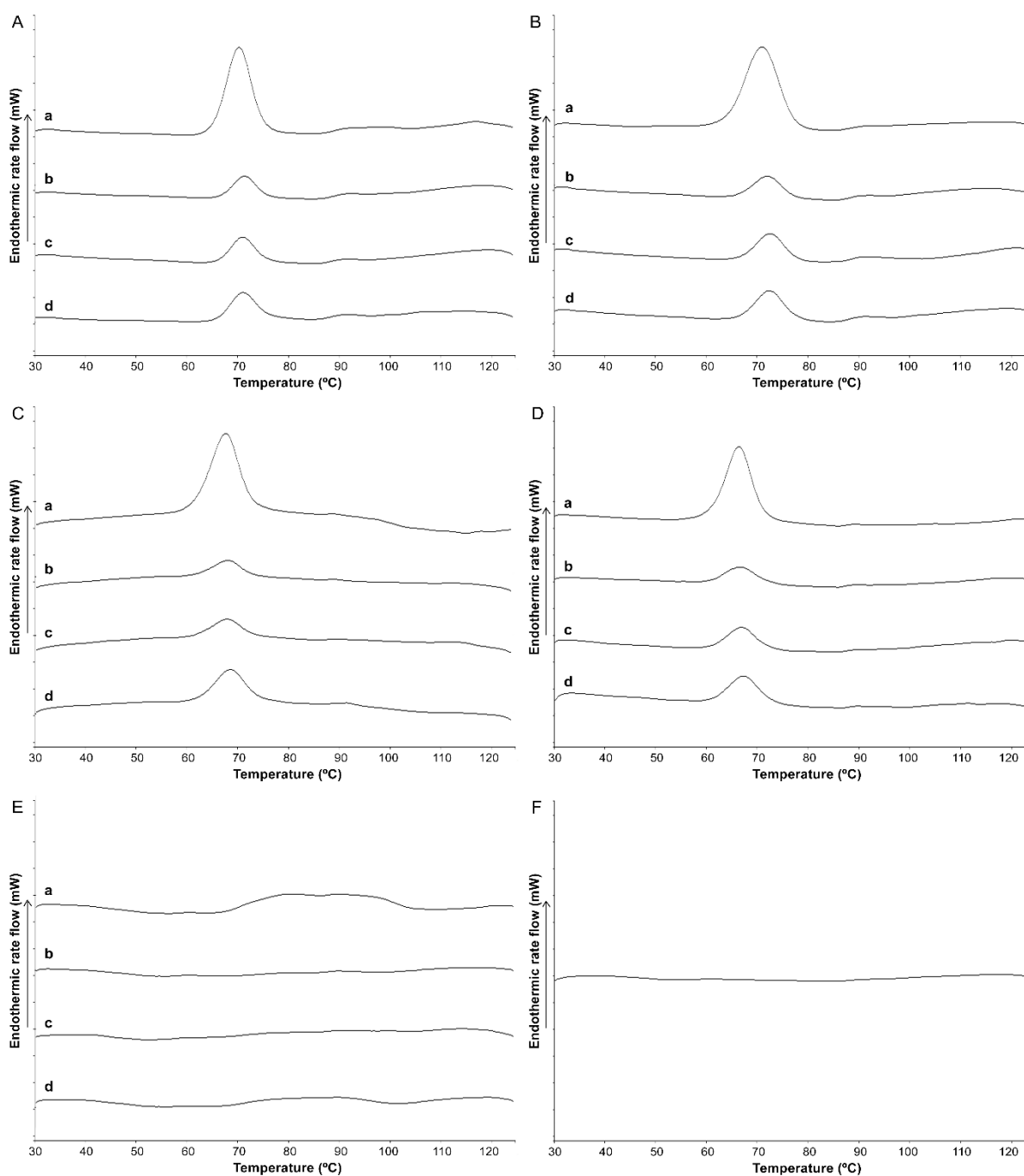


Figure 2. Endothermic profile of casein:starch mixtures. Samples are casein in mixtures with: regular maize starch – RMS (A), waxy maize starch – WMS (B), acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS (C), hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS (D), and high-amylose maize starch – HAMS (E) in the proportions of 0:1 - pure starch (a), 2.5:0.5 (b), 2.5:1.0 (c), and 2.5:1.5 (d) casein:starch. F represents pure calcium caseinate endothermic profile.

The gelatinization enthalpy (ΔH) was higher for the WMS compared to the other starch samples (Table 2). ΔH is the energy needed for dissociating the double helices from the crystalline regions. In these regions, starch molecules are found to be highly packed. The presence of amylose interrupts the compaction of the structure, decreasing the energy necessary for the occurrence of gelatinization (Jane, 2007). Since waxy starches are almost totally composed of amylopectin, their ΔH is normally higher than that of regular starch. However, the modified waxy starch (HPMS) presented lower ΔH values than the WMS (Table 2).

It may possibly occur due to the presence of hydroxypropyl groups that interact with amylopectin chains avoiding their self-association and the formation of double helices, promoting a less dense structure requiring less energy for dissociating the crystalline regions. In addition, the high-amylose starch dispersions (HAMS) presented the lowest ΔH values (Table 2) because they have more amorphous regions, therefore, less energy is required for the crystals fusion (Singh et al., 2003).

High gelatinization temperatures were observed for both the RMS and the WMS (Table S2). High gelatinization temperatures are associated to more densely packed crystalline structures and a higher molecular order (Srichuwong et al., 2005), which is characteristic of the native maize starch structure, since it presents a type A crystalline pattern (BeMiller & Whistler, 2009). Considerable lower gelatinization temperatures were observed for the AAMS and the HPMS (Table 2), possibly due to the modification process of both starch samples, which improves their stabilization. Acetyl and hydroxypropyl radicals interact with amylopectin chains, promoting a chains repulsion which opens their structure and facilitates water penetration; consequently, lower temperatures are required for gelatinization. On the other hand, the highest gelatinization temperatures of the HAMS dispersions (Table 2) are due to their

densely packed molecular structure, which in turn is due to the double helices formation by the long amylose chains (BeMiller & Whistler, 2009).

Table 2. Gelatinization temperatures: onset (T_o), peak (T_p), and conclusion (T_c), and gelatinization enthalpy (ΔH_{gel}) of starch samples, CN and CN/starch dispersions.

Samples	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	ΔH_{gel} (J.g ⁻¹)
RMS	65.61 ^c ± 0.23	70.05 ^c ± 0.29	73.63 ^b ± 0.51	14.41 ^a ± 0.41
CN + 0.5%RMS	67.43 ^a ± 0.00	71.39 ^a ± 0.00	75.02 ^a ± 0.13	3.04 ^d ± 0.03
CN + 1.0%RMS	67.11 ^a ± 0.21	71.06 ^{a,b} ± 0.29	75.00 ^a ± 0.03	3.89 ^c ± 0.19
CN + 1.5%RMS	66.60 ^b ± 0.09	70.81 ^b ± 0.09	75.70 ^a ± 0.10	4.77 ^b ± 0.28
WMS	65.66 ^b ± 0.30	71.11 ^b ± 0.26	76.13 ^b ± 0.34	17.04 ^{a,b} ± 0.88
CN + 0.5%WMS	67.88 ^a ± 0.53	72.65 ^a ± 0.09	76.98 ^{a,b} ± 0.15	3.51 ^{b,c} ± 0.13
CN + 1.0%WMS	67.79 ^a ± 0.65	72.72 ^a ± 0.01	77.85 ^b ± 1.06	4.41 ^c ± 0.25
CN + 1.5%WMS	67.33 ^a ± 0.27	72.55 ^a ± 0.17	76.95 ^{a,b} ± 0.61	5.60 ^d ± 0.14
AAMS	61.92 ^a ± 0.67	67.81 ^a ± 0.25	72.46 ^b ± 0.26	14.04 ^a ± 0.20
CN + 0.5%AAMS	61.58 ^a ± 0.29	68.04 ^a ± 0.16	72.15 ^{a,b} ± 0.62	2.58 ^d ± 0.22
CN + 1.0%AAMS	61.87 ^a ± 0.31	68.15 ^a ± 0.19	73.23 ^{a,b} ± 0.41	3.81 ^c ± 0.51
CN + 1.5%AAMS	62.74 ^a ± 0.90	68.37 ^a ± 0.33	73.56 ^a ± 0.61	6.17 ^b ± 0.02
HPMS	61.65 ^b ± 0.10	66.73 ^b ± 0.01	71.53 ^a ± 0.02	13.78 ^a ± 0.20
CN + 0.5%HPMS	62.66 ^a ± 0.05	67.30 ^a ± 0.08	71.70 ^a ± 0.68	2.70 ^d ± 0.08
CN + 1.0%HPMS	62.54 ^a ± 0.12	67.48 ^a ± 0.26	72.09 ^a ± 0.30	3.45 ^c ± 0.25
CN + 1.5%HPMS	62.54 ^a ± 0.07	67.38 ^a ± 0.17	72.49 ^a ± 0.45	4.68 ^b ± 0.14
HAMS	67.46 ^a ± 0.96	89.45 ^a ± 0.00	102.68 ^a ± 0.02	10.73 ^a ± 0.35
CN + 0.5%HAMS	68.13 ^a ± 0.19	89.36 ^a ± 0.09	95.38 ^c ± 0.20	0.75 ^d ± 0.04
CN + 1.0%HAMS	68.90 ^a ± 1.40	89.46 ^a ± 0.00	102.36 ^a ± 1.07	2.30 ^c ± 0.12
CN + 1.5%HAMS	69.39 ^a ± 0.50	89.01 ^a ± 0.35	98.56 ^b ± 1.76	3.29 ^b ± 0.33
CN	-	-	-	-

Values are the mean of three replications ± standard deviation. ^{a, b, c, d} Different letters in the same column for each sample differ significantly ($p < 0.05$). Samples are casein - CN in mixtures with: regular maize starch – RMS, waxy maize starch – WMS, acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS, hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS, and high-amylose maize starch – HAMS in the proportions of 0.0:1.0 (pure starch), 2.5:0.5, 2.5:1.0, and 2.5:1.5 casein:starch.

In the storage period after starch gelatinization, an aggregation of starch molecules tends to occur; such phenomenon is known as retrogradation (Srichuwong et al., 2005). In general,

retrograded starches showed lower onset, peak, and conclusion temperatures (Table 3) than non-retrograded starches (Table 2). This reduction is due to an improper alignment of the amylopectin chains during reassociation, causing the formation of less organized and less stable crystalline structures compared to those of native starches (Srichuwong et al., 2005). Consequently, less energy is required to melt the restructured crystals, and therefore, ΔH of retrograded starches is also lower than that of the non-retrograded starches.

Similarly, the retrogradation rate (% R) represents the self-association of amylopectin chains over time and is closely related to the retrogradation that occurs in starch products during the storage period. As expected, the HAMS presented low % R due to the formation of double helices between amylose chains, which promotes higher stability. In addition, lower % R values were observed for the waxy maize starch (WMS) and for the modified starch samples (AAMS and HPMS) than for the RMS (Table 3), which is expected, respectively, due to the low percentage of amylose in waxy starches (only traces), and the stabilization modification process which can reduce the tendency of native starch retrogradation. A low retrogradation tendency is desirable since water exudation is considered a problem in fresh cheese – especially reduced-fat ones – since it is a refrigerated product and therefore more susceptible to retrogradation during its storage period.

Therefore, as observed for pasting properties, in most cases, the modified starch samples presented better results to be used as fat replacers in cheese. They present lower peak temperatures (T_p) and lower ΔH values than the other starch dispersions, an important characteristic for the industry, since they are easier to cook, require low energy for gelatinization, and produce high pasta viscosity values, as seen in the RVA results (Table 1). In addition, they present lower retrogradation rates than the regular starch, as well as the waxy

starch, which is an important characteristic since fresh cheese is maintained under refrigeration during storage.

Table 3. Retrogradation temperatures: onset (T_0), peak (T_p) and conclusion (T_c), retrogradation enthalpy (ΔH_{ret}) and retrogradation rate (% R) of starch, CN and CN/starch dispersions.

Samples	T_0 (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	ΔH_{ret} (J.g ⁻¹)	% R
RMS	37.25 ^a ± 0.32	50.48 ^a ± 0.29	62.07 ^a ± 0.14	8.46 ^a ± 0.28	58.71
CN + 0.5%RMS	37.36 ^a ± 0.56	50.56 ^a ± 0.00	60.56 ^{a,b} ± 0.10	3.75 ^b ± 0.28	123.36
CN + 1.0%RMS	39.22 ^a ± 1.37	51.31 ^a ± 0.60	60.66 ± 0.65	3.72 ^b ± 0.10	95.63
CN + 1.5%RMS	38.60 ^a ± 0.28	51.03 ^a ± 0.60	60.29 ± 0.41	4.34 ^c ± 0.11	90.99
WMS	37.58 ^c ± 0.27	53.09 ^a ± 1.68	62.02 ^a ± 0.69	3.99 ^a ± 0.41	23.42
CN + 0.5%WMS	44.34 ^a ± 0.48	51.23 ^a ± 0.59	59.79 ^a ± 1.72	0.59 ^c ± 0.03	16.81
CN + 1.0%WMS	42.15 ^b ± 0.14	51.24 ^a ± 0.59	60.93 ^a ± 0.95	1.40 ^b ± 0.16	31.75
CN + 1.5%WMS	38.25 ^c ± 0.36	51.40 ^a ± 0.75	61.02 ^a ± 0.75	0.88 ^{b,c} ± 0.00	15.71
AAMS	37.30 ^b ± 0.60	53.25 ^a ± 0.26	62.44 ^a ± 0.45	3.54 ^a ± 0.08	25.21
CN + 0.5%AAMS	44.57 ^a ± 0.15	53.32 ^a ± 1.84	61.39 ^a ± 0.18	0.92 ^b ± 0.04	35.66
CN + 1.0%AAMS	44.69 ^a ± 0.14	53.56 ^a ± 0.09	61.11 ^a ± 0.31	1.00 ^b ± 0.27	26.25
CN + 1.5%AAMS	45.07 ^a ± 0.44	54.85 ^a ± 1.18	62.75 ^a ± 2.92	1.04 ^b ± 0.50	16.86
HPMS	40.47 ^a ± 0.51	56.42 ^a ± 0.26	74.91 ^b ± 0.42	3.37 ^a ± 0.08	24.46
CN + 0.5%HPMS	40.44 ^a ± 0.03	55.91 ^a ± 0.92	78.89 ^a ± 1.25	1.27 ^c ± 0.30	47.04
CN + 1.0%HPMS	39.47 ^a ± 1.18	56.16 ^a ± 0.50	79.00 ^a ± 1.13	1.60 ^{b,c} ± 0.17	46.23
CN + 1.5%HPMS	39.40 ^a ± 0.50	55.83 ^a ± 0.00	77.55 ^a ± 0.34	1.89 ^b ± 0.18	40.38
HAMS	84.65 ^a ± 0.91	92.60 ^a ± 0.00	102.08 ^a ± 0.12	2.02 ^a ± 0.01	18.83
CN + 0.5%HAMS	84.11 ^a ± 0.19	87.47 ^c ± 0.20	91.14 ^d ± 0.16	0.20 ^d ± 0.00	26.67
CN + 1.0%HAMS	84.16 ^a ± 0.32	88.66 ^{b,c} ± 0.75	94.12 ^c ± 1.27	0.40 ^c ± 0.00	33.48
CN + 1.5%HAMS	83.37 ^a ± 0.34	88.74 ^a ± 0.50	96.90 ^b ± 0.22	0.73 ^b ± 0.03	22.19
CN	-	-	-	-	-

Values are the mean of three replications ± standard deviation. ^{a, b, c, d} Different letters in the same column for each sample differ significantly ($p \leq 0.05$). Samples are casein - CN in mixtures with: regular maize starch – RMS, waxy maize starch – WMS, acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS, hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS, and high-amylose maize starch – HAMS in the proportions of 0.0:1.0 (pure starch), 2.5:0.5, 2.5:1.0, and 2.5:1.5 casein:starch. % R = $(\Delta H_{ret}/\Delta H_{gel}) \times 100$; ΔH_{gel} = Gelatinization enthalpy.

Table 4. Swelling power of starch, CN, and CN/starch dispersions at different temperatures.

Samples	Temperatures (°C)				
	55	65	75	85	95
RMS	1.84 ^{D,a} ± 0.02	4.45 ^{C,a} ± 0.01	10.44 ^{B,a} ± 0.03	12.97 ^{B,a} ± 0.16	16.72 ^{A,a} ± 0.91
CN + 0.5%RMS	1.38 ^{B,a} ± 0.15	1.29 ^{B,d} ± 0.03	3.11 ^{A,c} ± 0.24	3.56 ^{A,c} ± 0.03	3.02 ^{A,b} ± 0.31
CN + 1.0%RMS	1.48 ^{C,a} ± 0.14	1.60 ^{C,c} ± 0.09	3.67 ^{B,b} ± 0.05	4.69 ^{A,b} ± 0.23	3.09 ^{B,b} ± 0.38
CN + 1.5%RMS	1.56 ^{C,a} ± 0.22	1.85 ^{C,b} ± 0.05	4.15 ^{B,b} ± 0.01	5.03 ^{A,b} ± 0.03	4.00 ^{B,b} ± 0.01
WMS	2.10 ^{E,a} ± 0.03	5.58 ^{D,a} ± 0.01	9.79 ^{C,a} ± 0.41	25.76 ^{A,a} ± 0.77	22.51 ^{B,a} ± 0.46
CN + 0.5%WMS	0.90 ^{C,b} ± 0.14	1.12 ^{C,b} ± 0.13	3.87 ^{B,c} ± 0.00	4.40 ^{A,b} ± 0.11	4.08 ^{A,B,b} ± 0.18
CN + 1.0%WMS	0.98 ^{D,b} ± 0.07	1.59 ^{C,b} ± 0.35	5.13 ^{B,b} ± 0.03	7.32 ^{A,b} ± 0.07	4.55 ^{B,b} ± 0.36
CN + 1.5%WMS	0.97 ^{D,b} ± 0.17	1.74 ^{C,b} ± 0.13	5.96 ^{B,b} ± 0.11	8.07 ^{A,b} ± 0.09	5.70 ^{B,b} ± 0.24
AAMS	2.81 ^{D,a} ± 0.04	9.65 ^{C,a} ± 0.07	12.94 ^{B,a} ± 0.06	13.57 ^{A,a} ± 0.98	12.90 ^{B,a} ± 0.26
CN + 0.5%AAMS	2.37 ^{D,a} ± 0.32	3.23 ^{C,c} ± 0.05	3.63 ^{B,C,d} ± 0.08	3.73 ^{B,b} ± 0.16	4.71 ^{A,c} ± 0.11
CN + 1.0%AAMS	1.68 ^{D,a} ± 1.32	4.10 ^{C,c} ± 0.15	4.64 ^{B,c} ± 0.17	4.72 ^{B,b} ± 0.00	5.79 ^{A,c} ± 0.39
CN + 1.5%AAMS	2.61 ^{C,a} ± 0.41	5.24 ^{B,b} ± 0.42	5.47 ^{B,b} ± 0.11	5.30 ^{B,b} ± 0.25	7.45 ^{A,b} ± 0.47
HPMS	7.02 ^{C,a} ± 0.69	16.77 ^{A,a} ± 0.64	16.67 ^{A,a} ± 0.52	15.61 ^{B,a} ± 0.35	16.50 ^{A,a} ± 0.83
CN + 0.5%HPMS	2.36 ^{C,b} ± 0.14	3.97 ^{B,c} ± 0.13	4.65 ^{A,c} ± 0.12	3.80 ^{B,d} ± 0.11	4.55 ^{A,c} ± 0.18
CN + 1.0%HPMS	2.68 ^{C,b} ± 0.07	5.44 ^{A,B,b,c} ± 0.35	5.75 ^{A,b,c} ± 0.12	4.83 ^{B,c} ± 0.07	5.73 ^{A,b,c} ± 0.36
CN + 1.5%HPMS	2.77 ^{D,b} ± 0.17	6.02 ^{B,C,b} ± 0.13	6.49 ^{B,b} ± 0.04	5.70 ^{C,b} ± 0.09	7.26 ^{A,b} ± 0.24
HAMS	2.25 ^{D,a} ± 0.03	2.67 ^{C,D,a} ± 0.06	3.18 ^{C,a} ± 0.00	4.05 ^{B,a} ± 0.01	5.65 ^{A,a} ± 0.00
CN + 0.5%HAMS	1.00 ^{A,b} ± 0.00	1.00 ^{A,b} ± 0.00	1.01 ^{A,b} ± 0.00	1.00 ^{A,b} ± 0.00	1.01 ^{A,b} ± 0.00
CN + 1.0%HAMS	1.00 ^{A,b} ± 0.00	1.01 ^{A,b} ± 0.00	1.01 ^{A,b} ± 0.00	1.01 ^{A,b} ± 0.00	1.02 ^{A,b} ± 0.00
CN + 1.5%HAMS	1.00 ^{A,b} ± 0.00	1.01 ^{A,b} ± 0.00	1.01 ^{A,b} ± 0.00	1.01 ^{A,b} ± 0.00	1.02 ^{A,b} ± 0.00
CN	1.18 ^A ± 0.11	0.99 ^A ± 0.13	1.27 ^A ± 0.06	1.65 ^A ± 0.06	1.25 ^A ± 0.04

Values are the mean of three replications ± standard deviation. ^{A, B, C, D, E} Different letters in the same line differs significantly ($p \leq 0.05$). ^{a, b, c, d} Different letters in the same column, for each sample, differ significantly ($p \leq 0.05$). Samples are casein - CN in mixtures with: regular maize starch – RMS, waxy maize starch – WMS, acetylated/adipate maize starch with regular basis – AAMS, hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis – HPMS, and high-amylose maize starch – HAMS in the proportions of 0.0:1.0 (pure starch), 2.5:0.5, 2.5:1.0, and 2.5:1.5 casein:starch.

3.1.3 Swelling power

As expected, CN did not present considerable swelling power values at any of the tested temperatures (55 - 95 °C), which contributed to a non-relevant effect of casein on casein/starch mixtures of any of the five starch samples tested at any concentrations (Table 4). Generally, the casein/starch mixtures presented the same profile of pure starch dispersions, but with lower

values due to the dilution effect of the starch in the presence of casein.

The swelling power values increased as temperature increased for almost all the samples. It occurs because as the temperature of a starch suspension increases, starch hydrogen bonds gradually break, water molecules bind with free hydroxyl groups, and granules expand (Rickard, Asaoka, & Blanshard, 1991). Additionally, different swelling power values were observed among the different types of studied starch. This occurs mainly because of the inherent characteristics of each starch (Table 4).

High amylose starch dispersions presented the lowest swelling power values that did not increase considerably at the tested temperatures. This occurs because a considerable swelling of starch will only occur near their gelatinization temperatures (when hydrogen bonds begin to dissociate), and high amylose starches normally present high gelatinization temperatures, close to 100 °C, e.g.; in this study, the conclusion temperatures of casein:HAMS dispersions ranged from 95 to 102 °C (Table 2). These high gelatinization temperatures are due to high amylose starches' characteristic structure, which may form double helices because of the interaction of amylose chains, creating a crystalline structure (Copeland et al., 2009; Jane, 2007).

The waxy maize starch samples presented high swelling power values, alone and in the mixtures with casein. Waxy starch is almost only composed of amylopectin, and its swelling power is most influenced by amylopectin content due to the high availability of hydroxyl groups in its branched chains (Singh et al., 2003). In general, the swelling power of the WMS dispersions increased as temperature increased, reaching a maximum at 85 °C, when most granules are swollen; then, their swelling power decreased due to the granules rupture, which occurs in consequence of the low intermolecular resistance of WMS granules, caused by their low amylose content.

Regular starch (RMS) presented, in general, lower swelling power when compared to WMS, AAMS, and HPMS in function of its considerable amylose content and it is well known that the presence of amylose is a swelling inhibitor (Singh et al., 2003). Another important characteristic is its higher thermal stability, without a decrease in the swelling power as temperature increases. Regular maize starch has considerable amylose and lipid contents, which restrict its swelling power, but increase its resistance to high temperatures.

The modified starch samples (AAMS and HPMS) presented, alone and in the mixtures with casein, considerable high swelling and great resistance to high temperatures, without decreasing their swelling power over the experiment, probably due to their crosslinking modification. The bifunctional ingredients bind two different starch chains, decreasing the starch swelling power and increasing stability (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2008). Consequently, even a starch with a waxy maize base, such as HPMS, presents a great resistance under high temperature conditions. In addition, both modified starches presented the highest swelling power at 65 °C. This is important because this temperature is lower than temperature in which milk is pasteurized (72 °C) and without hardly negatively affecting the coagulation of milk for cheese production.

In most situations, the AAMS and HPMS samples presented high swelling power values and great resistance to high temperatures. In addition, the HPMS samples presented the highest swelling power at 65 °C (temperature of milk pasteurization for cheese production) among the starch samples. This result corroborates with the pasting and thermal properties results that appoint the modified starches as more promising fat replacers in cheese. However, an in-depth study may be necessary to provide a better understanding of the interaction of these starch samples within the casein matrix of cheese. Therefore, the modified starches (AAMS and

HPMS) were selected to continue the study of starch behavior within the casein matrix.

3.2 Starch behavior within casein matrix

3.2.1 Microstructural analysis

The micrographs of gels containing HPMS and AAMS showed swollen starch granules (stained in green) embedded in a protein matrix (stained in red) (Fig. 3), indicating that the starch added, or at least a great part of it, remained in the casein matrix, not being released in whey.

The gel with AAMS (Figs. 3.A and 3.B) showed a considerable interruption of the casein matrix by the starch; however, their swollen granules were smaller and not well distributed in the matrix, compared to those of HPMS, forming agglomerates. The gels with HPMS (Figs 3.C and 3.D) presented a more open structure than the gels with AAMS. The protein network of HPMS gels appeared to be less compact due to their larger swollen particles and their more homogenous distribution over the matrix. Such larger HPMS swollen particles are probably due to the higher swelling power of this starch when compared to AAMS (Table 4), which is also an important characteristic, since a high-water binding capacity may improve the texture of reduced-fat cheese. In addition, a more open structure is desirable to improve textural characteristics of reduced-fat cheese. This occurs because fat acts as fracture points in the matrix, interrupting the protein-protein interactions and decreasing hardness. Such protein-protein interactions result in harder reduced-fat cheese (Sipahioglu, Alvarez, & Solano-Lopez, 1999).

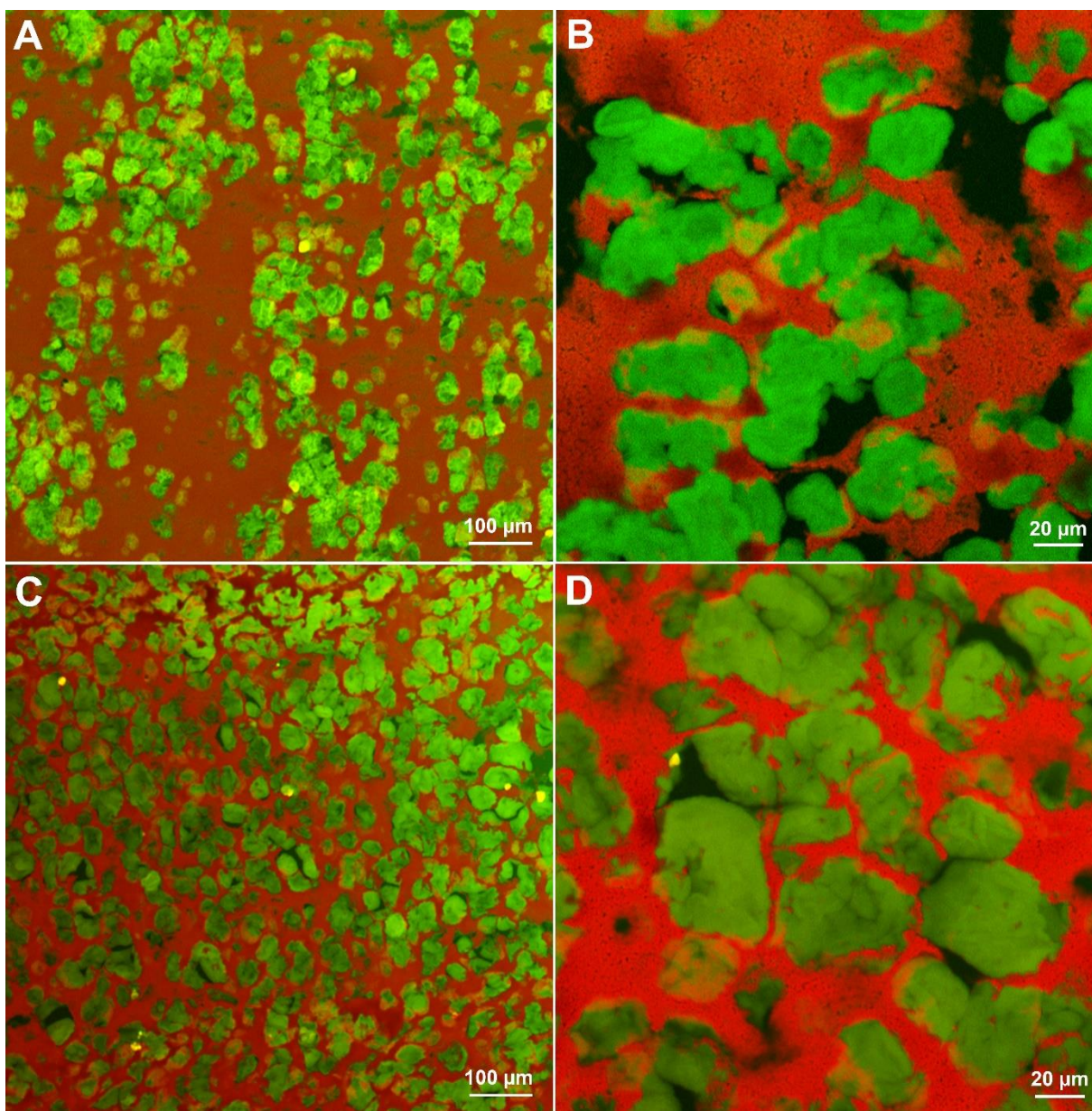


Figure 3. Laser scanning confocal micrographs of curds with 1.5% of the following starches: (A) AAMS, magnification: 10 x; (B) AAMS, magnification: 40 x; (C) HPMS, magnification: 10 x; (D) HPMS, magnification: 40 x. Starch: stained in green; Casein: stained in red. AAMS: normal acetylated/adipate maize starch; HPMS: waxy hydroxypropylated/phosphate maize starch.

Therefore, the presence of both starches embedded in the casein matrix, causing its interruption, suggests a potential use of both starches as fat replacers in cheese. Nonetheless, HPMS promoted a more open and homogenous structure for the gel and may be considered the

most promising fat replacer among the studied starches. On the other hand, this highest interruption in the casein matrix promoted by HPMS may be so intense that it would promote a softer than ideal cheese. A texture analysis of two cheese products, each added of a different starch, would contribute to this knowledge.

3.2.2 Starch content analysis

The presence of added starch for the gels production was qualitatively shown through the image of starch embedded in the casein matrix, as seen on the microstructural analysis (Fig. 3). However, it is important to quantify the real content of starch that remained in the matrix, as its functionality as a fat replacer will only be achieved if a considerable amount of starch remains in the casein matrix.

The whey released from the curd samples presented very low starch contents, and consequently, both starches showed high retention in curd (Table 5). However, HPMS showed a slightly higher retention in curd, possibly due to its larger swollen granules (when compared to those of AAMS) which may have contributed to a more mechanical entrapment of the starch within the protein matrix.

Table 5 – Starch content in whey and starch retention in curds produced with modified starches.

Attribute	AAMS	HPMS
Total starch in whey (g/100 g)	0.210 ^a ± 0.39	0.049 ^b ± 0.04
Starch retention in curd (%)	86.0	96.9

Values are the mean of replications ± standard deviation. ^{a, b} Different letters in the same column for each sample differ significantly ($p \leq 0.05$). Samples are whey released from curd produced with the regular acetylated/adipate maize starch (AAMS) and waxy hydroxypropylated/phosphate maize starch (HPMS).

Brown, McManus, and McMahon (2012) observed a considerable lower value of starch retention in curd for a normal waxy corn starch (70%), when compared to the retention found for a waxy corn starch in this present study (96.9%). This difference, however, may be associated with the modifications of the HPMS, which improved starch retention, probably by increasing its water binding capacity through stabilization, and maintaining its granules resistance, avoiding their breakdown, through the crosslinking process. The same authors also observed similar values of starch retention in curd (90%) for waxy rice and instant tapioca starch samples.

4 Conclusions

In general, the modified starches at the concentration of 1.5% in the mixtures presented the best results for being used as fat replacers in reduced-fat cheese. They produced high pasta viscosity values, which indicate high water binding capacity and a potential moisture increase in cheese. They also presented lower peak temperatures and lower ΔH values, therefore were considered easy to cook, requiring lower gelatinization temperatures. Additionally, they presented low retrogradation rates, which is important since fresh cheese is a refrigerated product. Finally, they presented a considerably high swelling power at 65 °C and a great resistance under the cheese processing conditions. Furthermore, the AAMS and HPMS also appeared embedded in the casein matrix and presented a very low content of starch released in whey, thus being considered promising fat replacers in cheese; however, between the two of them, the HPMS may be considered a better alternative, as it presented a more open structure and a higher retention rate in curd.

Acknowledgments

This work was sponsored by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - Project 307155/2015-3) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) The authors are grateful to Cargill for supplying the starches, and to Mr. Luiz Roberto Falleiros Júnior and Dra. Márcia Maria de Souza Moretti for their technical assistance with the microscopy and chromatography analyses.

Declaration of interest

There are no conflicts of interests associated with this publication.

References

- BeMiller, J. N., & Whistler, R. (2009). *Starch: Chemistry and Technology*, 3 ed. (pp. 149-227). Burlington: Academic Press.
- Brown, K. M., McMannus, W. R., & McMahon, D. J. (2012). Partitioning between curd and whey and effect on curd syneresis and gel microstructure. *Journal of Dairy Science*, 95 (12), 6871-6881.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis – Mini review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23 (2), 85-112.

- Casarotti, S. N., Monteiro, D. A., Moretti, M. M. S., & Penna, A. L. B. (2014). Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International*, 59, 67-75.
- Chaisawang, M., & Supphantharika, M. (2006). Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 20 (5), 641 - 649.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23 (6), 1527-1534.
- Considine, T., Noisuwan, A., Hemar, Y., Wilkinson, B., Bronlund, J., & Kasapis, S. (2011). Rheological investigations of the interactions between starch and milk proteins in model dairy systems: A review. *Food Hydrocolloids*, 25 (8), 2008-2017.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. (2008). *Fennema's Food Chemistry*. 4 ed. (pp. 130-135). Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.
- Diamantino, V. R., Beraldo, F. A., Sunakozawa, T. N., & Penna, A. L. B. (2014). Effect of octenyl succinylated waxy starch as a fat mimetic on texture, microstructure and physicochemical properties of Minas fresh cheese. *LWT – Food Science and Technology*, 56 (2), 356-362.
- Fox, P. F., McSweeney, & P. L. H. Milk Proteins. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. (pp. 146-238). London: Blackie Academic & Professional.
- Goel, P. K., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (1999). Studies on interactions of corn starch with casein and casein hydrolysates. *Food Chemistry*, 64 (3), 383-389.

- Jane, J. Structure of starch granules. (2007). *Journal of Applied Glycoscience*, 54 (1), 31-36.
- Kett, A. P., Chaurin, V., Fitzsimons, S. M., Morris, E. R., O'mahony, J. A., & Fenelon, M. A. (2013). Influence of milk proteins on the pasting behaviour and microstructural characteristics of waxy maize starch. *Food Hydrocolloids*, 30 (2), 661-671.
- Mandala, I. G., & Bayas, E. (2004). Xanthan effect on swelling, solubility and viscosity of wheat starch dispersions. *Food Hydrocolloids*, 18 (2), 191-201.
- Mistry, V. V. (2001). Low fat cheese technology. *International Dairy Journal*, 11, (4-7), 413-422.
- Noisuwan, A., Broland, J., Wilkinson, B., & Hemar, Y. (2008). Effect of milk protein products on the rheological and thermal (DSC) properties of normal rice starch and waxy rice starch. *Food Hydrocolloids*, 22 (1), 174-183.
- O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2011). Butter and Other Milk Fat Products - Fat Replacers. In Fuquay, J. W. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2 ed. (pp. 528-532.). San Diego: Academic Press.
- Parker, R., & Ring, S. G. (2001). Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science*, 34 (1), 1-17.
- Putseys, J. A., Lamberts, L., & Delcour, J. A. (2010). Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *Journal of Cereal Science*, 51 (3), 238-247.
- Rickard, J. R., Asaoka, M. A., & Blanshard, J. M. V. (1991). The physicochemical properties of cassava starch. *Tropical Science*, 31 (3), 89-207.

- Rosenthal, A. J. (2003). Low-fat foods - Types and Manufacture. In Caballero, B. (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2 ed. (pp. 3612-3617). Oxford: Academic Press.
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., & Gill, B. S. (2003) Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81 (2), 219-231.
- Sipahioglu, O., Alvarez, V. B., & Solano-Lopez, C. (1999). Structure, physico-chemical and sensory properties of feta cheese made with tapioca starch and lecithin as fat mimetics. *International Dairy Journal*, 9 (11), 783-789.
- Srichuwong, S., Sunarti, T. C., Mishima, T., Isono, N., & Hisamatsu, M. (2005). Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. *Carbohydrate Polymers*, 60 (4), 529-538.
- Sun, N., Liang, Y., Yu, B., Tan, C., & Cui, B. (2016). Interaction of starch and casein. *Food Hydrocolloids*, 60, 572-579.
- Tárrega, A., Vélez-Ruiz, J. F., & Costell, E. (2005). Influence of milk on the rheological behaviour of cross-linked waxy maize and tapioca starch dispersions. *Food Research International*, 38 (7), 759-768.
- Tester, R. F., & Morrison, W. R. (1990). Swelling and gelatinization of starches. Effects of amylopectins, amyloses and lipids. *Cereal Chemistry*, 67 (6), 551-557.
- Van de Velde, F.; Weinbreck, F.; Edelman, M. W.; Van der linden, E.; & Tromp, R. H. (2003). Visualization of biopolymers mixtures using confocal scanning laser microscopy

(CSLM) and covalent labelling techniques. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 31 (1-4), 159-168.

Villas-Boas, F., & Franco, C. M. L. (2016). Effect of bacterial β -amylase and fungal α -amylase on the digestibility and structural characteristics of potato and arrowroot starches. *Food Hydrocolloids*, 52 (1), 795-803.

CAPÍTULO III[‡]

Effect of modified maize starches as fat replacers on textural, microstructural and sensory characteristics of a reduced-fat fresh cheese

[‡] Este manuscrito será submetido ao periódico Food Research International, que apresenta Fator de impacto = 3.086 e classificação A1 no Qualis/CAPES.

Effect of modified maize starches as fat replacers on textural, microstructural and sensory characteristics of a reduced-fat fresh cheese

Vivian R. Diamantino^{1*}, Walisson G. Rodrigues¹, Taís F. Borgonovi¹, Sebastião R. Taboga², Patrícia S. L. Vilamaior², Célia M. L. Franco¹, Ana Lúcia B. Penna^{1§}

UNESP - Sao Paulo State University, ¹Department of Food Engineering and Technology, ²Department of Biology, Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil

Abstract

The effect of two different modified maize starch types, acetylated distarch adipate (AAMS) and hydroxypropilated distarch phosphate (HPMS), was investigated on the technological, physicochemical, textural, microstructural and sensory characteristics of a reduced-fat fresh cheese. Cheese was produced according to three treatments: a reduced-fat control cheese without starch (C), a reduced-fat cheese with 1% AAMS (A), and a reduced-fat cheese with 1% HPMS (H). Analyses of the chemical composition, water-holding capacity (WHC), yield, texture profile (hardness, elasticity, cohesiveness and chewiness), microstructure (Laser Scanning Confocal Microscopy), and sensory acceptability (appearance, aroma, texture, flavor and overall acceptability) were evaluated. Starch addition mainly affected cheese's hardness and chewiness. The decrease in hardness (N) was more intense for H (2.58 ± 1.50) than for A (15.67 ± 4.28), when compared to C (29.32 ± 4.97) cheese. The same tendency was

[§]Corresponding authors: R. Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 17 32212266; Fax: +55 17 32212299. E-mail address: analucia@ibilce.unesp.br (A.L.B. Penna); vivian.diamantino@hotmail.com (V.R. Diamantino).

observed for chewiness (N): 0.91 ± 0.60 (H), 7.79 ± 2.50 (A), and 16.03 ± 3.74 (C). In addition, H cheese samples also presented the highest wet basis moisture content (71.54 ± 1.98 %) when compared to A (63.43 ± 2.97 %), and C (59.67 ± 0.79 %), which highlights the highest water binding capacity of HPMS, possibly due to its waxy base. However, in a nine-point scale, consumers moderately liked the texture (7.22 ± 1.38) and the other sensory properties of A cheese samples and generally slightly disliked H texture (4.69 ± 2.08) as well as the other sensory properties, possibly by its intense acidic taste and its extremely soft texture that was more similar to a spreadable cheese than to a fresh cheese. Therefore, AAMS could be considered a potential fat replacer for fresh cheeses, as it significantly decreased cheese's hardness and had a good acceptability of its sensory characteristics.

Keywords: acetylated distarch adipate, hydroxypropilated distarch phosphate, texture profile analysis, laser scanning confocal microscopy, sensory acceptability.

1. Introduction

High incidence of overweight and obesity have been observed worldwide. According to some statistics, more than 50% of men and 60% of women will be overweight or obese in Latin America by 2030 (Obesity Society, 2015). The consumption of energy dense food and beverages, especially the high-fat ones, allied to a sedentary life style, are considered the major causes of obesity and overweight all over the world (Ferrão et al., 2016).

In this context, as cheese is a rich source of lipids, innovative cheese varieties with fat reduction have been widely developed by the dairy industry and demanded by consumers.

However, consumers expect these products to have almost the same sensory characteristics of their full-fat counterparts, which is virtually impossible to achieve due to the fundamental role of fat in sensory characteristics and functionality of cheese (Mistry, 2001; Ferrão et al., 2016).

Cheese with reduced-fat content, frequently may exhibit poor flavor and defects in texture. The mainly defects regarding reduced-fat fresh cheese include an increased hardness and a rubbery texture, caused by the formation of a denser protein matrix than those of the full-fat ones. In full-fat cheese, fat is trapped mechanically in the matrix, acting as fracture points and promoting their typical softness. When fat is removed, it allows a greater protein-protein interaction between casein chains, which creates a more compact matrix structure and a consequently more firm, chewy, and rubbery texture (Karimi et al., 2015; Mohammed, 2015; Rodríguez, 1998).

Fresh cheese is widely consumed in Brazil and it is produced by enzymatic coagulation of milk with rennet, with or without starter cultures. It is whitish in color and exhibits soft texture, slightly acidic taste, high moisture content, and present short shelf-life (Magenis et al., 2014; Sant'Ana et al., 2013). It is commercialized in cylindrical shape, ranging from 0.3 kg to 5 kg, and is classified as a semi-fat (from 25.0 to 44,9 % fat) and very high moisture cheese (> 55 % moisture) (Brasil, 1996).

One of the strategies that have been used to improve reduced-fat cheeses quality is the use of fat replacers, which are ingredients used to totally or partially replacing fat in food (Karimi et al., 2015). Among the fat replacers, starch has low cost and is used in a wide range of dairy products with the functionalities of stabilization, emulsification and structuring ability (Kett et al., 2013). In cheese, it may improve texture by binding water, which creates a sense of lubricity (Brown, McMannus, & McMahon, 2012). A variety of modifications are applied to

native starch, mainly to reduce their retrogradation tendency, and to improve their resistance to heat, shear, and acid conditions. Both crosslinked and stabilized starches, such as acetylated distarch adipate and hydroxypropilated distarch phosphate, have lower gelatinization and pasting temperatures, and produce pastes with high viscosity values (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2008; Tárrega, Vélez-Ruiz, & Costell, 2005).

Although, there exists considerable reports that have studied the effect of starch addition on the overall characteristics of different types of cheese, such as Mozzarella cheese (Zisu & Shah, 2005), Feta cheese (Sipahioglu et al., 1999), White pickled cheese (Kavas et al., 2004), processed cheese (Fu & Nakamura, 2017; Ye, Hewitt & Taylor, 2009), and imitation cheese (Duggan et al., 2008; Mounsey & O’Riordan, 2008; Noronha et al., 2008; Ye & Hewitt, 2009), there are few reports that have described the use of starch as a fat replacers in fresh cheese (Diamantino et al., 2014). To the best of our knowledge there are no reports that have studied the addition of a maize acetylated distarch adipate with regular basis (AAMS) and a maize hydroxypropilated distarch phosphate with waxy basis (HPMS) as fat replacers in fresh cheese.

Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of two different modified maize starches (AAMS and HPMS) in the technological, physicochemical, textural, microstructural and sensory characteristics of a reduced-fat fresh cheese.

2. Material and methods

2.1. Material

Two commercial modified maize starch samples were supplied by Cargill Starches and

Sweeteners South America (São Paulo, SP, Brazil): an acetylated/adipate maize starch with regular basis (AAMS) and a hydroxypropylated/phosphate maize starch with waxy basis (HPMS).

Calcium chloride (Synth) was obtained from Labsynth Produtos para Laboratório Ltda. (Diadema, SP, Brazil), and starter culture composed of *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* (R-704, 50 U) and chymosin (Chy-max) were supplied by Christian Hansen (Horsholm, Denmark).

High temperature short time (HTST) pasteurized cow's milk (1.5% fat) was obtained from Xandô Laticínios Ltda. (Araras, SP, Brazil). Milk were evaluated by total solids, fat, solids-not-fat, protein contents and density using an Ekomilk - M instrument (Bulteh 2000 Ltda, Stara Zagora, Bulgaria); the presence of antibiotics was detected using the Snap Beta-Lactam Test (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA) and the presence of alkaline phosphatase was determined using an Alkaline Phosphatase Kit (Laborclin Produtos para Laboratório Ltda., Pinhais, PR, Brazil).

2.2. Preliminary tests of cheese production with modified maize starch addition

In the previous study covered by chapter II, among the different maize starches tested, AAMS and HPMS presented the best results for being used as potential fat replacers in cheese model. In mixtures with casein, both starches presented high peak viscosity values, and consequently, high water binding capacity, as well as low gelatinization temperatures (between 65-70 °C), low retrogradation rates, and a great resistance under cheese processing conditions. It was also observed that all these properties increased as the starch concentrations tested (0.5,

1.0, and 1.5%) increased. In a preliminary test, it was firstly tested the production of cheese using the highest concentration of starch evaluated in this previous study (1.5%). However, the water holding capacity in cheese samples after the addition of 1.5 % of both modified starch types were so intense that negatively affected the fresh cheese's texture. The cheese samples produced became so soft that were more similar to a spreadable cheese than to a fresh cheese. Therefore, it was tested the 1.0 % concentration of both starches, evaluated in the previous study, for cheese production and cheese samples were visually similar to whole fresh cheese. Consequently, the concentration of 1.0 % of starch (1 g starch/100 mL milk) was selected to be used in the present study.

2.3. Production of low fat fresh cheese

Low fat fresh cheese was produced, in three independent processing, using three different treatments: a reduced-fat control cheese without starch (C), a reduced-fat cheese with AAMS (A), and a reduced-fat cheese with HPMS (H). For A and H treatments, both starch types (1 g/100 mL milk) were dispersed in cold milk and then heated to 70 °C (1 min) in order to allow the gelatinization of starch, without overall affecting milk's whey proteins. The milk with gelatinized starch (formulations A and H) was cooled to 35 °C as well as the milk without starch (formulation C) was warmed until 35 °C. At this point, the production process was the same for all formulations. After reaching 35 °C, the following ingredients were added in milk (15 L), for each formulation: 0.025 g/100 mL calcium chloride (Synth), 0.2 mL/100 mL starter culture (R-704, 50 U) diluted in ultra high temperature (UHT) processing skimmed milk, and 2.5 g/100 L chymosin previously diluted in filtered water. Cheeses were produced in a automatic tank for

cheese manufacturing with temperature control (Biasinox, Lambari, MG, Brazil). The ingredients were stirred for 2 min, and coagulation occurred after 45 min. Then, the curd was cut into 1 cm³ pieces and stirred for 20 min allowing the formation of a coese curd mass. Approximately 75% of the whey (11 L) was drained, and 2.5 g of salt (NaCl)/100 g cheese was added. The curd was stirred for 3 min for the salt distribution, and the final whey was drained. Then, the curd was placed into cylindrical plastic molds that were turned upside down on a flat surface, ten minutes later. The molds were maintained under refrigeration (4 °C) and turned two more times at intervals of 60 min. The cheese samples were then stored under refrigeration (4 °C) for approximately 24 h to allow for whey drainage. After this period, the cheese samples were immersed in a potassium sorbate solution (10 g/100 mL) for 60 s, posteriorly drained under refrigeration for 60 min, vacuum-packaged in plastic bags and stored under refrigeration (4 °C).

2.4. Chemical composition and physicochemical analyzes of the low-fat cheese samples

For chemical composition, cheese samples were analyzed in triplicate after 3 days of storage. That were determined: moisture, by drying the sample to a constant weight at 70 °C for 24 h under vacuum (AOAC, 1997), fat, using the Gerber-Van Gulik method (Brasil, 2006), fat in dry matter (FDM), using the following formula: $FDM = (fat/total\ solids) \times 100$; total nitrogen content, using the micro-Kjeldahl method (AOAC, 1997) and the conversion factor of 6.38 to determine protein content, ash content, through incineration at 550 °C (AOAC, 1997), and salt content, using an argentometric method that utilizes the previously obtained ash (Brasil, 2006). The cheese yield (Y kg/100 kg) was determined from the ratio of kg cheese produced/kg milk used. After 3, 10 and 17 days of storage, the titratable acidity was assayed and expressed in

lactic acid equivalents (AOAC, 1997) and the percentage of syneresis was calculated as the weight of whey released from each cheese in its package (g), after the different storage times, divided by the weight of cheese in the same package (g) and multiplied by 100 (Buriti et al., 2005).

2.5. Texture profile analysis (TPA)

After 10 days of storage, a texture profile analysis (TPA) of the cheese samples was performed using a TA-XT2i texturometer (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, England) to evaluate the TPA parameters of hardness, springiness, cohesiveness and chewiness. A total of 15 cylindrical samples (2.0 cm diameter x 2.5 cm height) were obtained from each treatment of the three independent processing, totaling 45 samples for each treatment. The samples were taken at least 1 cm away from the cheese surface. They were maintained under refrigeration (4 °C) and prepared a few minutes before analysis. The texturometer was equipped with a 36 mm diameter cylindrical aluminum probe. The operating conditions were double compression, test speed of 1 mm/s, and compression of 50% of the sample (adapted from Buriti et al., 2005; Fritzen-Freire, Müller, Laurindo, & Prudêncio, 2010).

2.6. Microstructural analysis

Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM) was performed on C, A, and H cheese samples obtained after 10 days of storage. The samples were prepared according to a modified method by Van de Velde et al. (2003) and Brown, McManus, and McMahon (2012). Cheese

samples was diced (0.5 cm^3), and frozen in liquid nitrogen for 10 min. The frozen cheese samples were cut (1 mm thick slices) at -18°C with a cryostat equipment (Leica CM1850, Leica Biosystems, Oberkochen Germany) and directly mounted on glass slides. The samples were fixed in a solution of 4% paraformaldehyde and 4% glutaraldehyde in phosphate buffer (0.1M) for 5 min, and subsequently washed with water. Then, the samples were stained with eosin (0.1%) for 2 min, washed with ethanol 95% (twice), and subsequently stained with fluorescein 5-isothiocyanate (FITC) (0.1%) for 10 min, in absence of light. A droplet of water was added to each sample and they were covered with a coverslip. The slides were maintained protected from light, until their visualization through the microscope (Zeiss LSM 710 Confocal Microscope - Carl Zeiss AG, Oberkochen Germany). The observations were carried out in 10x and 40x magnification, and the images were analyzed through Zen 2010 software (Zeiss, Carl Zeiss AG).

2.7. Microbiological analyses

The microbiological quality of cheese samples was evaluated according to APHA (1992) methods. After 3 days of storage, samples were taken for the following analyzes: fecal coliform count (MPN/g), coagulase-positive staphylococci count (CFU/g), and the presence of *Lysteria monocytogenes* and *Salmonella* sp. in 25 g of cheese (Brasil, 2001).

2.8. Sensory acceptability test

The sensory acceptability of cheese samples was evaluated by 102 untrained panelists, after 10 days of refrigerated storage (after the analyses of microbiological quality, which

guarantee their safety). The sensory attributes (appearance, aroma, texture, and flavor) and overall acceptability were evaluated using a structured verbal hedonic scale of nine points (1 – disliked extremely; 5 – neither liked nor disliked; 9 – liked extremely) (Meilgaard et al., 1999).

The panelists (70 women and 32 men) were selected from students, staff and professors of the institute which ranged in age from 18 to 65 years. The acceptability test was performed in individual booths, under white light and temperature of 22 °C. The samples (30 g of sample at 10 °C) were presented into plastic containers coded with 3 digits and served in a monadic and randomized way. Panelists used water to clean their palates between samples. Sensory evaluation had been previously approved by the Ethics Committee in Research of UNESP, Sao Jose do Rio Preto - SP, Brazil (Approval number: 1.893.604). Cheese samples attributes were considered acceptable when at least 50% of the consumers gave them a score greater than or equal to 6 (liked slightly) (Conti-Silva, Silva, & Arêas, 2011).

A previous questionnaire were applied asking panelists about the frequency of consumption of fresh cheese and reduced-fat fresh cheese (e.g. never, almost never, sometimes, almost always, and always). The panelists that never consumed fresh cheese and/or reduced-fat fresh cheese (i.e. 25 of them) were discarded, totaling 77 valid panelists.

2.9. Statistical analyses

There was performed analysis of variance (ANOVA) to evaluate the significant differences among samples for physicochemical, textural and sensory analyzes. For acidity and water holding capacity, significant differences regarding the time of storage, were also carried out. Tukey's multiple comparison test was used to compare the mean values. A significance of

5% was used to establish statistical difference. The statistical analyses were conducted using Statistica 7.0 program (StatSoft, Inc., 2004, Tulsa, OK, USA).

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition and physicochemical analyzes of milk and cheese

Chemical composition and acidity of the low-heat milk used in the production of cheese were in accordance with the Brazilian law, and the milk also did not contain antibiotics or alkaline phosphatase (data not shown).

In general, starch addition affected the chemical composition of the cheese samples ($p \leq 0.05$) (Table 1). Both reduced-fat cheese samples added of starch (A and H) had higher moisture contents than the sample without starch (C). This is certainly due to the starch's natural property of binding extra-water (Sipahioglu et al, 1999) and is in accordance to Diamantino et al. (2014), which observed an increase in moisture when an octenyl succinilated waxy maize starch was added in a reduced-fat Minas fresh cheese. Sipahiouglu et al. (1999) also observed an increase in moisture with the addition of a modified tapioca starch in a reduced-fat Feta cheese.

In addition, H cheese samples were significantly higher in moisture than A cheese samples ($p \leq 0.05$) (Table 1). Although both acetyl and hydroxypropyl substituents on starch chains normally enhances water absorption, hydroxypropyl substituents are more stable than acetyl substituents (BeMiller & Whistler, 2009). This feature, combined with the characteristic higher water binding capacity of waxy starch, when compared to regular starch, may be responsible for the highest moisture observed in H cheese.

Table 1. Chemical composition and yield of reduced-fat cheese samples.

Parameter	C	A	H
Moisture (%)	59.67 ^c ± 0.79	63.43 ^b ± 2.97	71.54 ^a ± 1.98
Fat (%)	14.72 ^a ± 0.26	12.44 ^b ± 0.77	9.06 ^c ± 0.46
FDM (%)	36.52 ^a ± 1.10	33.84 ^b ± 1.19	31.88 ^c ± 1.54
Protein (%)	22.21 ^a ± 3.74	18.63 ^b ± 2.50	14.23 ^c ± 0.60
Ash (%)	3.22 ^a ± 0.08	3.26 ^a ± 0.34	2.86 ^b ± 0.23
Salt (%)	0.85 ^b ± 0.07	1.05 ^a ± 0.15	1.19 ^a ± 0.27
Yield (%)	10.49 ^c ± 1.70	13.01 ^b ± 1.49	17.87 ^a ± 1.25

^{a,b,c} Mean values (± standard deviation) in the same row indicated by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$). FDM: Fat in dry matter; C: Reduced-fat cheese; A: Reduced-fat cheese with AAMS (1%); H: Reduced-fat cheese with HPMS (1%). (n = 9).

Eventhough the milk used in the production of all cheese samples was standardized (1.5 % fat), fat contents of cheese samples varied (Table 1); these parameters reduced as moisture content in cheese increased and this is certainly due to the change in the balance of components that resulted from the amount of added water (Mistry, 2001). The divergences in protein content are also due to the adjustment in the balance of components; as moisture increased, protein decreased. Similarly, but in a lower proportion, ashes content reduced when a large amount of water was added in H sample. Futhermore, C cheese presented the lowest salt content ($p \leq 0.05$). As salt is soluble in water, this result may be explained by its lowest moisture content (Table 1) losing, in consequence, more salt in its higher amount of exsuded whey, when compared to A and H cheese samples.

The yield of the reduced-fat cheese samples added of starch (A and H) was higher than the yield of the cheese without starch (C) ($p \leq 0.05$). This was expected since moisture increased in cheese samples due to starch's natural property of binding water (Brown, McMannus, &

McMahon, 2012). Additionally, H cheese samples presented the highest yield ($p \leq 0.05$) among them (Table 1). This is probably attributed to the natural property of waxy starch to bind extra water creating high viscous gels. Furthermore, the hydroxypropilation increases water absorption in gels and consequently can improve gel viscosity (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2008; Sarka & Dvoracek, 2017). Diamantino et al. (2014) also observed an increase in yield of cheese production, when starch was added. The authors also observed a similar yield for a reduced-fat Minas fresh cheese (11.62 g/100 g). In addition, it is interesting to highlight that the yield found in the present study using AAMS (13.01 g/100 g) was higher than the yield observed by Diamantino et al (2014) using octenyl succinylated waxy starch (12.03 g/100 g) and closer to the full-fat cheese yield observed by the same authors (14.70 g/100g).

The acidity of cheese samples increased at the end of the refrigerated storage time ($p \leq 0.05$) (Fig. 1). An increase in acidity during storage time was also observed in other studies with Minas fresh cheese (Buriti et al., 2005; Diamantino et al., 2014; Sant'Anna et al., 2013), and it may be attribute to the fermentation of residual lactose in cheese by the starter culture that result in acid lactic production (Sant'Anna et al., 2013). The highest acidity at the end of storage time was observed when HPMS was added (Fig. 1). This result is probably due to the highest moisture content observed in H cheese samples, caused by the inherent high peak viscosity and high swelling power of waxy based starches, observed in the previous chapter, which may have promoted an increase in microorganism population, thereby increasing the production of lactic acid. Diamantino et al. (2014) also observed higher acidity at the end of storage time when a modified waxy starch was added to a reduced-fat Minas fresh cheese, compared to its counterpart without starch.

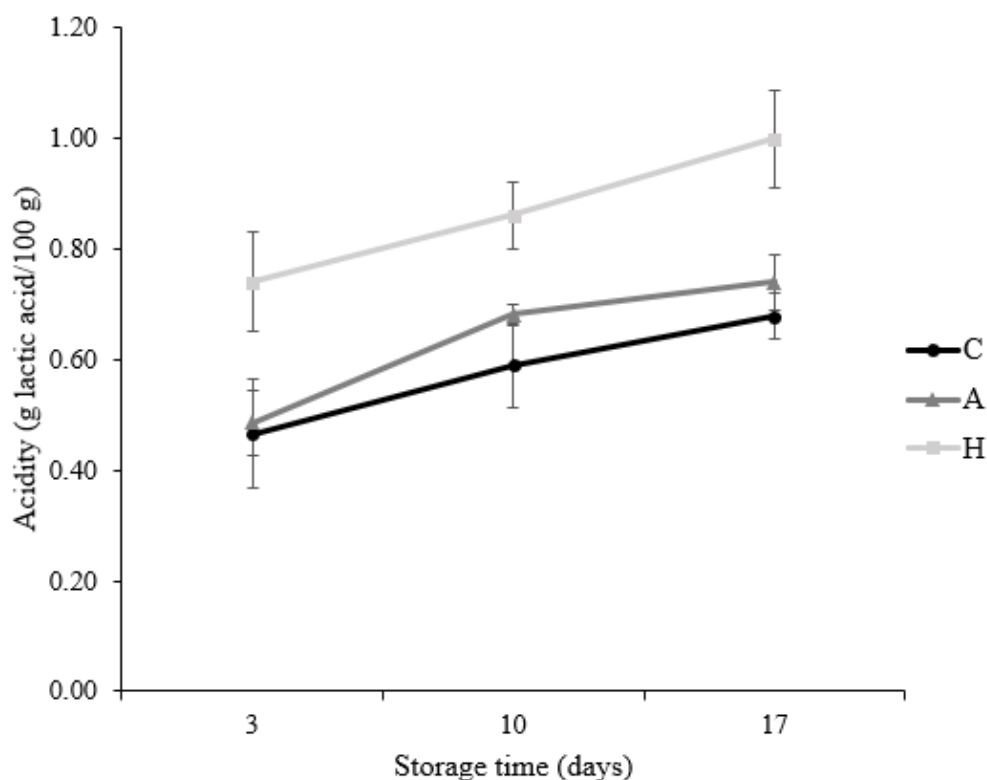


Figure 1. Titratable acidity of the different cheese treatments during the storage period (4°C). C: Reduced-fat cheese (control); A: Reduced-fat cheese with AAMS (1%); H: Reduced-fat cheese with HPMS (1%). (n = 9).

Furthermore, the syneresis increased at the end of refrigerated storage time, for all treatments (Fig. 2); similar results were observed by Buriti et al. (2005) and Fritzen-Freire et al. (2010). The C cheese samples presented the highest syneresis rate ($p \leq 0.05$) at the end of storage. Syneresis is often higher in reduced-fat cheeses because less fat increases the interaction between proteins, which promotes whey exudation (Dejmek & Walstra, 2004). On the other hand, the cheese samples with added starch (A and H) showed similar and lower syneresis profile during storage time, certainly caused by the water holding capacity of starch. In addition, it is important to point out the relevance of starch's modification in controlling syneresis, since both starches presented good results of water retention during storage. In the previous chapter,

that were observed that the starch modifications improved overall characteristics of AAMS and HPMS gels, when compared to their correspondent native starch gels. AAMS gels presented higher peak viscosities, and consequently, more water absorption, as well as less retrogradation than regular starch gels, caused by the stabilization process that prevents the association of amylose chains during refrigerated storage.

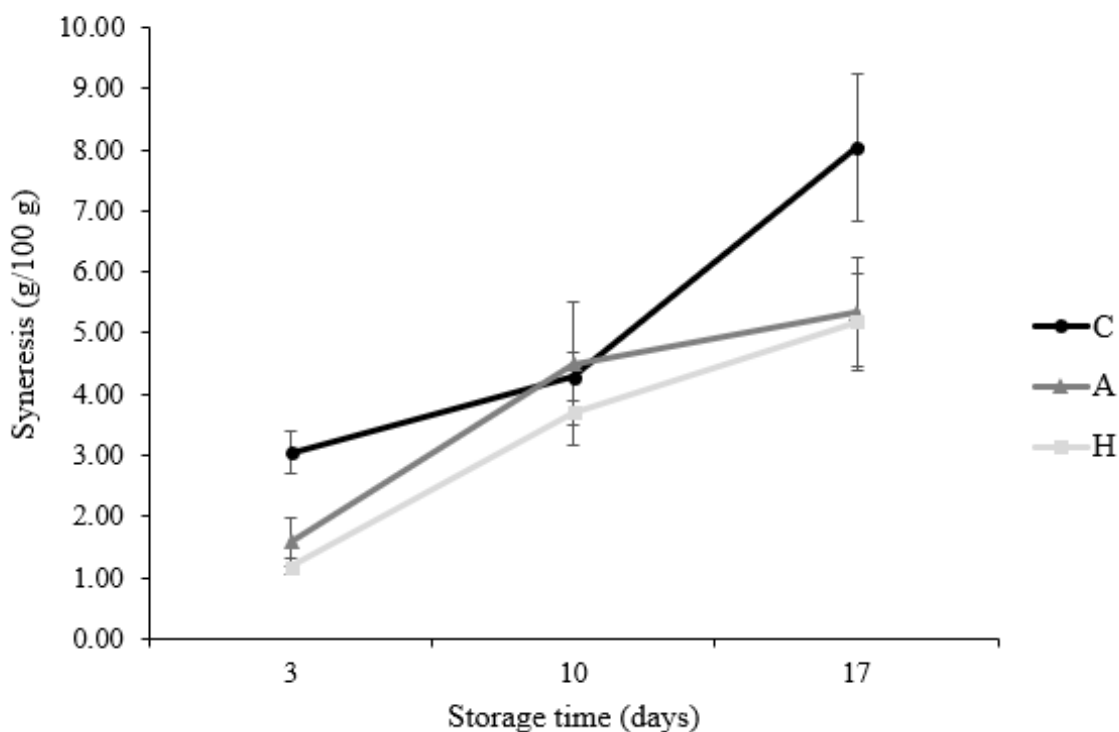


Figure 2. Syneresis profile of the different cheese treatments during the storage period (4 °C). C: Reduced-fat cheese (control); A: Reduced-fat cheese with AAMS (1%); H: Reduced-fat cheese with HPMS (1%). (n = 9).

On the other hand, HPMS showed high peak viscosities, as waxy starches normally have, but more resistant to the processing conditions than native waxy starch gels. This behavior is caused by crosslinking process which avoids breakdown and subsequent decreasing in viscosity, and a possible release of water. In addition, the starch stabilization process may also have improved water retention of H cheese in the present work. Waxy starch gels can also undergo

syneresis, by self association of amylopectin chains, though in low intensity than occur with amylose. However, the increase in moisture was so intense in H than in A cheese, that a higher syneresis was expected for H cheese, mainly because it presented the highest acidity. This high immobilization of water in H cheese possibly by two reasons: the highest capacity of hydroxipropyl substituents to stabilize the molecule, when compared to acetyl substituents, and the inherent ability of waxy starch to undergo less retrogradation than regular starch.

3.2 Texture profile analysis (TPA)

The addition of both types of starch significantly influenced the textural parameters of the reduced-fat cheese ($p \leq 0.05$). In general, almost all the texture parameters decreased when starch was added (Table 2), which is corroborated with Sahan et al. (2008) and Sipahioglu et al. (1999) that observed significant decrease in hardness and other textural parameters of a reduced-fat cheese, when different fat mimetics were used. Increased hardness and rubberiness of low-fat cheeses are attributed to an undisrupted, continuous protein matrix caused by an increase in cheese's protein proportion, after removal of fat (Mistry, 2001). When fat mimetics are used, they may replace fat role by stabilizing water in the product in a gel-like matrix (O'Connor & O'Brian, 2011). Therefore, when gelatinized AAMS and HPMS were used, cheese's structure was then softened by the interference of starch's gel-like structure between casein-casein interactions.

Table 2. Texture profile of reduced-fat cheese samples at 10 days of storage.

Parameter	C	A	H
Hardness (N)	29.32 ^a ± 4.97	15.67 ^b ± 4.28	2.58 ^c ± 1.50
Cohesiveness	0.72 ^a ± 0.06	0.65 ^b ± 0.10	0.52 ^c ± 0.07
Springiness	0.75 ^a ± 0.05	0.76 ^a ± 0.06	0.65 ^b ± 0.11
Chewiness (N)	16.03 ^a ± 3.74	7.79 ^b ± 2.50	0.91 ^c ± 0.60

^{a, b, c} Mean values (± standard deviation) in the same row that are indicated by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$). C: Reduced-fat cheese (control); A: Reduced-fat cheese with AAMS (1%); H: Reduced-fat cheese with HPMS (1%). (n = 45).

In addition, the decrease in hardness was even more intense for H cheese than for A cheese (Table 2), possibly due to the differences between HPMS and AAMS. Gels from regular starch frequently have higher hardness values than gels from waxy starch due to the increased rigidity and decreased swelling power caused by the presence of amylose (Mounsey & O’Riordan, 2008). This phenomenon corroborates with the results observed in the previous chapter, since gels produced with casein/AAMS presented higher pasting temperatures, lower peak viscosities and lower swelling power than the gels produced with casein/HPMS. High pasting temperatures indicate high starch gelatinization resistance caused by high structural stability, which, in consequence, reduces swelling ability of a starch, increasing the firmness of its gel.

Mounsey and O’Riordan (2008) evaluated the hardness of processed cheese added of different types of rice starch and observed a similar behavior of greater hardness in cheese samples containing cross-linked and acetylated regular starch types compared with waxy starch types. Similarly, in the present work, cheese samples containing modified regular starch (A) also presented higher hardness values (Table 2) than cheese samples containing modified waxy starch (H). A similar behavior was observed for chewiness, as it is defined as the energy required

to masticate a solid food and is directly dependent on hardness and hence, if hardness increases, chewiness also increases (Artiga-Artigas, 2017).

The H cheese samples also presented the lowest cohesiveness values (Table 2). Cohesiveness is considered the limit point to which a material can deform itself before breaking (Artiga-Artigas, 2017); thus, due to the lowest protein content resulted from its highest moisture, H cheese resulted in a less dense matrix and less cohesive structure. Naturally, as springiness is how well a product physically springs back after it has been deformed, the more a product is destroyed, the less springiness it will exhibit, which explain the lowest H springiness values.

Nevertheless, though H cheese samples presented the highest reduction in textural parameters, this reduction was so intense that creates a weak structure and an extremely soft texture, which is not characteristic from typical Brazilian fresh cheese. On the other hand, A cheese samples presented similar values of hardness (15.62 ± 2.16 N), cohesiveness (0.67 ± 0.06) and chewiness (8.96 ± 1.31) for a full-fat Minas fresh cheese reported by Piazzon-Gomes et al. (2010). This result indicates that, at least for the textural parameters, the aim to improve reduced-fat fresh cheese characteristics, which was the most similar to its full-fat counterpart, was achieved using AAMS.

3.3. Microstructure

Cheese's matrix micrographs of A and H samples showed swollen starch granules (stained in green) embedded in a protein matrix (stained in red), behaving like an inert filler material (Fig. 3.A and H) as reported by Zuo et al (2008) in skim milk gels containing 2% of rice starch. The authors suggested that the main effect of the starch granules is to absorb water

during pasting and, as a result, to increase the volume fraction of the casein matrix.

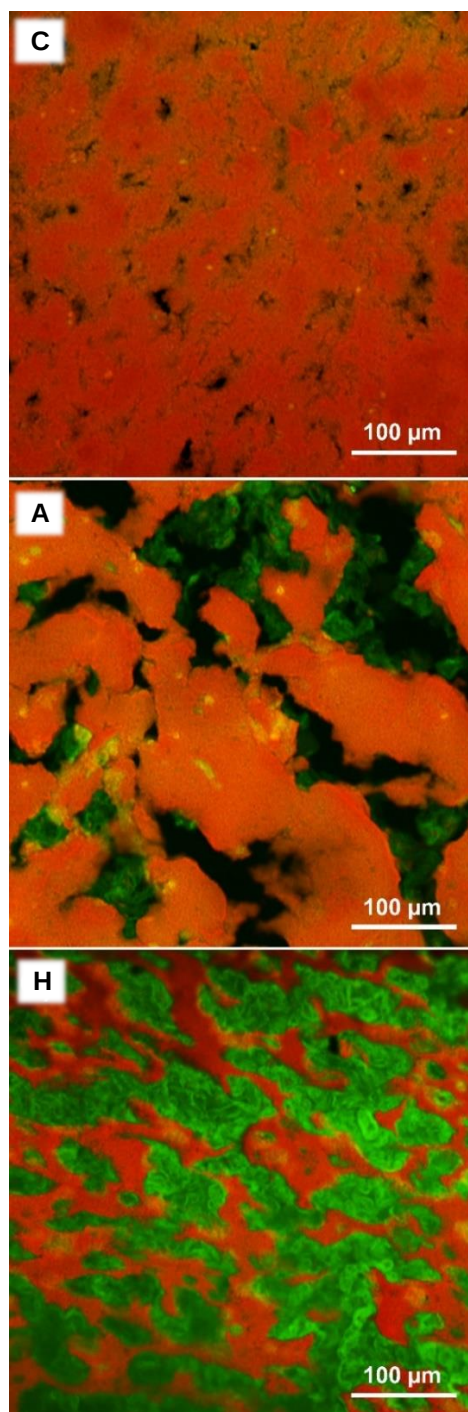


Figure 3. Laser scanning confocal micrographs of cheese's matrix. C: Reduced-fat cheese without starch - Control; A: Reduced-fat cheese with 1% AAMS; H: Reduced-fat cheese with 1% HPMS. Magnification: 10 x. Starch: stained in green; Casein: stained in red. AAMS: normal acetylated/adipate maize starch; HPMS: waxy hydroxypropylated/phosphate maize starch.

In contrast, C cheese matrix was only stained in red in consequence of the absence of starch. This sample showed a very dense and compact matrix (Fig. 3.C) that corroborates with their highest hardness results. This occurs because fat acts as fracture points in the matrix, interrupting protein-protein interactions and creating a less dense matrix, characteristic of the full-fat cheese. Therefore, the greater protein-protein interactions of the reduced-fat cheese results in increased firmness and ruberiness; thus, a more opened structure is desirable to improve textural characteristics of reduced-fat cheeses (Mistry, 2001; O'Connor & O'Brian, 2011; Sipahioglu et al., 1999).

In this context, a more interrupted structure was observed for A and H cheese samples due to the presence of swollen starch embedded in the protein matrix. The A sample showed a considerable interruption of the casein matrix (Fig. 3.A); however, H cheese presented swollen starch granules that were greater than A cheese and more well distributed in the matrix, causing higher interruption in the protein network (Fig. 3.H). This high interference in the continuity of H cheese's casein matrix explains the lowest hardness, cohesiveness, and chewiness observed in H cheese, when compared to A and C samples, respectively (Table 2).

There was also observed in chapter II of this research, a similar behavior in micrographs of reduced-fat cheese curds added of AAMS and HPMS. There were reported that the larger swollen particles observed in HPMS gels were caused by the highest swelling power of this starch, when compared to AAMS. In the present chapter, using similar conditions (i.e. dispersions of 1% of both starches in mixture with casein that were heated at 65°C), the HPMS/casein dispersions had higher swelling power (5.44 ± 0.35) than AAMS/casein dispersions (4.10 ± 0.15), which also contribute to explain the micrographs results. In addition, these observations (Fig. 3) also corroborated with the results of increase in water holding

capacity (Fig. 2), moisture, and yield of cheese's production (Table 1) when AAMS and HPMS starches were added, respectively (following the sequence of increase: H > A > C).

3.4. Sensory Acceptability

Cheese samples were in accordance with microbiological requirements for Brazilian fresh cheese (data not shown) and were safe for sensory analysis (Brasil, 2006).

In general, the addition of starch influenced the sensory characteristics of reduced-fat cheese samples (Table 3). It was expected that reduced-fat cheeses added of starch would have better evaluations of their attributes than the without-fat one, since fat plays a fundamental role in improving palatability, texture, appearance, creaminess, softness and succulence of food (O'Connor & O'Brien, 2011). However, both C and A cheeses achieved high and significantly equal ($p > 0.05$) acceptability levels for almost all attributes, ranging from 6.83 to 8.12 (Table 3).

Table 3. Sensory acceptability of reduced-fat cheeses at 10 days of storage.

Parameter	C	A	H
Appearance	8.12 ^a ± 0.79	7.52 ^a ± 1.15	6.00 ^b ± 1.88
Aroma	7.38 ^a ± 1.27	7.26 ^a ± 1.27	6.35 ^b ± 1.36
Texture	7.36 ^a ± 1.43	7.14 ^a ± 1.44	4.87 ^b ± 2.10
Flavor	7.53 ^a ± 1.28	6.83 ^b ± 1.63	5.65 ^c ± 2.04
Overall acceptability	7.60 ^a ± 1.03	7.12 ^a ± 1.30	5.51 ^b ± 1.75

^{a, b, c} Mean values (± standard deviation) in the same row that are indicated by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$). n = 77. C: Reduced-fat cheese; A: Reduced-fat cheese with AAMS (1%); H: Reduced-fat cheese with HPMS (1%).

This result may be due to different possible reasons that may be inferred by the consumers observations. While some consumers disliked the firm and rubbery texture of C cheese, other consumers liked its texture, that was even compared to a Mozzarella cheese or Minas Padrão cheese (i.e. a type of cheese that undergo maturation and has a harder texture than the Brazilian Minas fresh cheese), which clearly was not the objective of the study, since we desired to develop a slightly soft texture, which is characteristic of traditional Brazilian fresh cheese. On the other hand, while many consumers liked the soft texture of A cheese, compared to C cheese samples, others disliked its texture arguing that it was crumbly or that they felt a slightly grainy/floury texture.

Only for the flavor attribute, A cheese samples presented a lower acceptability than C cheese (Table 3) This may have occurred because starch-based mimetics tend to slightly reduce flavor intensity of the product (O'Connor & O'Brien, 2011). Nevertheless, A cheese presented a high acceptance of all sensory attributes, ranging from 6.83 (like slightly) to 7.52 (like moderately) (Table 3), which are in accordance to data available in the literature for full-fat fresh cheeses, which is a notable feature for this sample. Oliveira et al. (2017) evaluated the overall acceptability of various commercial full-fat Minas fresh cheeses using a nine-point hedonic scale and found values that ranged from 6.00 ± 1.70 to 7.30 ± 1.60 . Dantas et al. (2016) also evaluated the acceptability of full-fat Minas fresh cheeses using a nine-point hedonic scale and observed similar results that ranged from: 6.00 ± 1.20 to 8.01 ± 1.10 (for appearance), 6.41 ± 1.70 to 7.32 ± 1.50 (for aroma), 5.66 ± 1.20 to 7.59 ± 1.10 (for taste), 5.16 ± 1.20 to 7.93 ± 1.10 (for texture), and 5.71 ± 1.40 to 7.83 ± 1.50 (for overall acceptability).

In contrast, H cheese received the lowest scores when compared to the other cheese samples (ranging from 4.87 to 6.35), probably due to its highest water holding capacity, which

made this sample excessively soft and moisty. Some consumers also mentioned that this sample was “very soft”, “stranger in consistency”, “crumbly”, “brittle”, and “slightly pasty”. In addition, consumers also indicate an intense acidic aroma and taste, probably due to the increased acidity of this sample (Figure 1) caused by an increased moisture content (Table 1), which may also have contributed to its lowest overall acceptability (Table 3). Therefore, considering the incredible water retention and the remarkable increase in yield promoted by HPMS gels, additional studies adding this type of starch in cheeses with an inherent soft texture, like spreadable cheeses, allied to more studies of control of flavor development, may contribute to the development of high-quality reduced-fat spreadable cheeses.

4. Conclusions

Starch addition affected cheese's texture. Hardness and chewiness (N) significantly decreased, being lower for H than for A cheese, when compared to C. Microstructures of the cheeses added of both starches showed swollen starch granules embedded in the casein matrix, acting as inert fillers. In addition, H cheese presented a more interrupted structure than A cheese. Also, H cheese presented the highest yield, acidity, and moisture content, with low syneresis, which highlights the highest water binding capacity of HPMS. However, consumers moderately liked the texture and overall characteristics of A cheeses and slightly disliked the extremely soft H texture and its overall sensory characteristics. Therefore, AAMS could be considered a potential fat replacer for application in fresh cheese, as it significantly decreased cheese's hardness and had a good acceptability of its overall sensory characteristics.

Acknowledgements

This study was financially supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - Project 307155/2015-3) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES). The authors are grateful to Cargill for supplying the starches, and to Mr. Luiz Roberto Falleiros Júnior for microscopy technical assistance.

References

APHA - American Public Health Association (1992). Compendium of methods for the examination of foods. 3. ed. Washington: Edwards Brothers, Ann Arbor, 1219p.

Artiga-Artigas, M., Acevedo-Fani, A., & Martín-Belloso, O. (2017). Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control*, 76, 1-12.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (1997). Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists international (16th ed.). Arlington: AOAC.

BeMiller, J. N., & Whistler, R. (2009). *Starch: Chemistry and Technology*, 3 ed. (pp. 149-227). Burlington: Academic Press.

Brasil (1996). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, DF, 07 mar. 1996. Available from <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>> Accessed in 23.09.17 (in Portuguese).

Brasil (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF, 02 de Jan. 2001. Available from <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Accessed in 23.09.17 (in Portuguese).

Brasil (2006). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Brasília, DF, 12 dez. 2006. Available from < http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/958_GED.pdf > Accessed in 23.09.17 (in Portuguese).

Brown, K. M., McMannus, W. R., & McMahon, D. J. (2012). Partitioning between curd and whey and effect on curd syneresis and gel microstructure. *Journal of Dairy Science*, 95 (12), 6871-6881.

Buriti, F. C. A., Rocha, J. S., & Saad, S. M. I. (2005). Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, 15(12), 1279-1288.

Conti-Silva, A. C., Silva, M. E. M. P., & Arêas, J. A. G. (2011). Sensory acceptability of raw and extruded bovine rumen protein in processed meat products. *Meat Science*, 88 (4), 652-656.

Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. (2008). *Fennema's Food Chemistry*. 4 ed. (pp. 130-135). Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.

Dantas, A. B., Jesus, V. F., Silva, R., Almada, C. N., Esmerino, E. A., Cappato, L. P., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Cavalcanti, R. N., Carvalho, C. C., Sant'Ana, A. S., Bolini, H. M. A., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G. (2016). Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. *Journal of Dairy Science*, 99 (1), 18-30.

Dejmek, P., & Walstra, P. (2004). The syneresis of rennet-coagulated curd. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics & microbiology-general aspects Vol. 1* (3rd ed.) (pp. 71-99). London: Academic Press.

Diamantino, V. R., Beraldo, F. A., Sunakozawa, T. N., & Penna, A. L. B. (2014). Effect of octenyl succinylated waxy starch as a fat mimetic on texture, microstructure and physicochemical properties of Minas fresh cheese. *LWT – Food Science and Technology*, 56 (2), 356-362.

Duggan, E., Noronha, N., O’Riordan, E. D., & O’Sullivan, M. (2008). Effect of resistant starch on the water binding properties of imitation cheese. *Journal of Food Engineering*, 84(1), 108–115.

Ferrão, L. L., Silva, E. B., Silva, H. L. A., Silva, R., Mollakhalili, N., Granato, D., Freitas, M. Q., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Padilha, M. C., Zacarchenco, P. B., Barbosa, M. I. M. J., Mortazavian, A. M., & Cruz, A. G. (2016). Strategies to develop healthier processed cheeses: Reduction of sodium and fat contents and use of prebiotics. *Food Research International*, 86, 93-102.

Fritzen-Freire, C. B., Müller, C. M. O., Laurindo, J. B., & Prudêncio, E. S. (2010). The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. *Journal of Food Engineering*, 96, 621-627.

Fu, W., & Nakamura, T. (2017). Effects of starches on the mechanical properties and microstructure of processed cheeses with different types of casein network structures. *Food Hydrocolloids*, available on: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.001>>, Article in press.

Karimi, R., Azizi, M. H., Ghasemlou, M., & Vaziri, M. (2015). Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. *Carbohydrate Polymers*, 119, 85-100.

Kavas, G., Oysun, G., Kinik, O., & Uysal, H. (2004). Effect of some fat replacers on chemical, physical and sensory attributes of low-fat white pickled cheese. *Food Chemistry*, 88(3), 381-388.

Kett, A. P., Chaurin, V., Fitzsimons, S. M., Morris, E. R., O'mahony, J. A., & Fenelon, M. A. (2013). Influence of milk proteins on the pasting behaviour and microstructural characteristics

of waxy maize starch. *Food Hydrocolloids*, 30 (2), 661-671.

Magenis, R. B., Prudêncio, E. S., Fritzen-Freire, C. B., Stephan, M. P., Egito, A. S., & Daguer, H. (2014). Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. *Food Control*, 45, 22-28.

Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (2007). *Sensory evaluation techniques* (4th ed.). Boca Raton: CRC Press

Mistry, V. V. (2001). Low fat cheese technology. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 413-422.

Mohamed, G.A. (2015). Low-fat cheese: a modern demand. *International Journal of Dairy Science* 10(6), 249-265.

Mounsey, J. S., & O’Riordan, E. D. (2008). Characteristics of imitation cheese containing native or modified rice starches. *Food Hydrocolloids*, 22(6), 1160-1169.

Noronha, N., Duggan, E., Ziegler, G. R., Stapleton, J. J., O’Riordan, E. D., & O’Sullivan, M. (2008). Comparison of microscopy techniques for the examination of the microstructure of starch-containing imitation cheeses. *Food Research International*, 41(5), 472-479.

Obesity Society (2015). Obesity in Latin America. (Available at:)

<http://www.obesity.org/resources/facts-about-obesity/obesity-latin-america> (Access: 20/11/2017).

O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2011). Butter and other milk fat products e fat replacers. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of dairy sciences* (2nd ed.) (pp. 528-532). San Diego: Academic Press.

Oliveira, E. W., Esmerino, E. A., Carr, B. T., Pinto, L. P. F., Silva, H. L. A., Pimentel, T. C., Bolini, H. M. A., Cruz, A. G., & Freitas, M. Q. (2017). Reformulating Minas Frescal cheese using consumers' perceptions: Insights from intensity scales and check-all-that-apply questionnaires. *Journal of Dairy Science*, 100 (8), 6111–6124.

Piazzon-Gomes, J., Prudencio, S. H., & Silva, R. S. S. F. (2010). Minas frescal cheese with soy product: physical, chemistry and sensorial characteristics. *Food Science and Technology*, Campinas, 30 (1), 77-85.

Rodríguez, J. (1998). Recent advances in the development of low-fat cheese. *Trends in Food Science and Technology*, 9(6), 249-254.

Sahan, N., Yasar, K., Hayaloglu, A. A., Karaca, O. B., & Kaya, A. (2008). Influence of fat replacers on chemical composition, proteolysis, texture profiles, meltability and sensory properties of low-fat Kashar. *Journal of Dairy Research*, 75 (1), 1-7.

Sant'Ana, A. M. S., Bezerril, F. F., Madruga, M. S., Batista, A. S. M., Magnani, M., Souza, E.

L., & Queiroga, R. C. R. E. (2013). Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7442–7453.

Sarka, E., & Dvoracek, V. (2017). New processing and applications of waxy starch (a review). *Journal of Food Engineering*, 206, 77-87.

Sipahioglu, O., Alvarez, V. B., & Solano-Lopez, C. (1999). Structure, physico-chemical and sensory properties of feta cheese made with tapioca starch and lecithin as fat mimetics. *International Dairy Journal*, 9(11), 783-789.

Tárrega, A., Vélez-Ruiz, J. F., & Costell, E. (2005). Influence of milk on the rheological behaviour of cross-linked waxy maize and tapioca starch dispersions. *Food Research International*, 38 (7), 759-768.

Van de Velde, F., Weinbreck, F., Edelman, M. W., Van der linden, E., & Tromp, R. H. (2003). Visualization of biopolymers mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labelling techniques. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 31 (1-4), 159-168.

Ye, A. & Hewitt, S. (2009) Phase structures impact the rheological properties of rennet-casein-based imitation cheese containing starch. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 867-873.

Ye, A., Hewitt, S., & Taylor, S. (2009). Characteristics of rennet–casein-based model processed

cheese containing maize starch: Rheological properties, meltabilities and microstructures. *Food Hydrocolloids*, 23 (4), 1220–1227.

Zisu, B., & Shah, N. P. (2005). Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstructure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 957-972

CAPÍTULO IV

Conclusão Geral

CONCLUSÃO GERAL

No geral, o estudo das propriedades dos amidos em presença de caseína mostrou que os amidos modificados: AAMS e HPMS apresentaram melhores resultados como potenciais repositores de gordura. Com o aumento da concentração de amido nas misturas com caseína, os amidos modificados apresentaram altas viscosidades de pasta e alto poder de inchamento, indicando maior potencial de incorporação de água nos queijos. Além disso, apresentaram menores temperaturas de pico e baixos valores de variação de entalpia, necessitando de baixas temperaturas de gelatinização, importante na produção de queijos, uma vez que altas temperaturas de aquecimento do leite podem dificultar a etapa de coagulação. Os amidos modificados apresentaram ainda boa resistência às condições de processo e menor tendência à retrogradação, o que é importante no controle da sinérese, que, em excesso, é considerada um defeito em queijos frescos. Além disso, os amidos modificados apresentaram alta retenção na matriz de caseína, com baixíssima perda de amido no soro, além de se apresentarem incorporados à matriz de caseína, comportando como um material de enchimento. Em função destas características, os amidos modificados AAMS e HPMS foram selecionados para a produção e análise das características de queijos frescal com teor reduzido de gordura.

Os queijos com amido HPMS (H) apresentaram maior teor de umidade, maior rendimento de produção e maior acidez ao final da estocagem, além de apresentarem baixa sinérese, quando comparado aos queijos com amido AAMS (A) e controle, sem amido (C), respectivamente, indicando a alta capacidade de retenção de água do amido HPMS. A adição de amido afetou os parâmetros de textura dos queijos. A dureza e a mastigabilidade foram mais influenciadas e diminuíram significativamente ($p \leq 0,05$), sendo esta redução maior para os

queijos H do que para A, quando comparado ao queijo C. Além disso, as microestruturas dos queijos mostraram os grânulos de amido inchados, aprisionados na matriz de caseína, em ambos os queijos adicionados de amido; o queijo H apresentou maior interrupção de sua estrutura que o queijo A. No entanto, os consumidores gostaram moderadamente da textura ($7,22 \pm 1,38$) do queijo com AAMS, assim como das características sensoriais do queijo como um todo, enquanto que, desgostaram levemente da textura do queijo com HPMS ($4,69 \pm 2,08$) e das outras características sensoriais, em função, principalmente, de seu acentuado gosto ácido e de sua textura extremamente macia, semelhante a observada em creme de queijo.

Portanto, o amido AAMS pode ser considerado um potencial repositor de gordura para aplicação em queijos frescos em geral, uma vez que diminuiu significativamente a dureza do queijo frescal e teve uma boa aceitação sensorial.

Além disso, em função das características do amido HPMS observadas neste trabalho, estudos adicionais com a aplicação desse amido em queijos espalháveis (como cream cheese, creme de ricota ou creme de queijo frescal), assim como a caracterização físico-química, de textura, microbiológica e sensorial desses novos produtos, pode auxiliar na produção de queijos espalháveis *light*, de boa qualidade.

Assim, o conhecimento obtido no presente estudo pode contribuir para o desenvolvimento de diferentes tipos de queijos frescos com teor reduzido de gordura, com boa qualidade tecnológica e sensorial, a serem lançados no mercado.

ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/2012/Resolução 510/2016)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa “Estudo da interação entre diferentes amidos e a caseína e sua aplicação em queijo fresco *light* como repositor de gordura” sob responsabilidade da pesquisadora Vivian Ribeiro Diamantino. O estudo será realizado com amostras de queijo Minas frescal para avaliação de suas características sensoriais (aparência, aroma, textura, sabor e avaliação global). Os riscos à saúde são mínimos uma vez que, os queijos serão produzidos de acordo com os programas de Boas Práticas de Fabricação e, além disso, serão previamente submetidos a análises microbiológicas garantindo a sanidade das amostras. Também serão excluídos da pesquisa os indivíduos que possuam algum tipo de alergia à proteína do leite e os indivíduos com intolerância à lactose e que não possam consumir queijos. Você poderá consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas, sem a sua identificação. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. No caso de eventual problema de saúde (efeito adverso) decorrente de sua participação nos testes sensoriais, você será encaminhado à Seção Técnica de Saúde, situada à Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – São José do Rio Preto/SP – Telefones (17) 3221.2415 – 3221.2416 – 3221.2485. Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para o estudo e desenvolvimento de alternativas para a melhoria das características sensoriais de queijos com teores reduzidos de gordura.

Diante das explicações, se você não possui alergia à proteína do leite e/ou intolerância à lactose e concorda em participar deste projeto, forneça os dados solicitados e coloque sua assinatura a seguir.

Nome: _____ R.G. _____
Endereço: _____ Fone: _____
e-mail: _____ São José do Rio Preto, _____ de _____ de 2017

Assinatura do Participante

Assinatura da Pesquisadora responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao participante e outra ao pesquisador.

Nome Pesquisador(a): Vivian Ribeiro Diamantino	Cargo/Função: Doutoranda
Instituição: IBILCE - UNESP – campus de São José do Rio Preto	
Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265; Bairro: Jardim Nazareth; CEP: 15054-000 São José do Rio Preto - SP, Telefone: (17) 3221.2200	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP São José do Rio Preto – fone 17-3221.2456/2545 e 3221.2384	

UNESP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS LETRAS E
CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da interação entre diferentes amidos e a caseína e sua aplicação em queijo fresco light como repositor de gordura

Pesquisador: Vivian Ribeiro Diamantino

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 63138616.5.0000.5466

Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.893.604

Apresentação do Projeto:

Especialistas em todo o mundo têm recomendado a redução da ingestão de gorduras, objetivando a obtenção de benefícios relacionados à saúde e à estética. O uso de repositores de gordura é umas das estratégias que vem sendo utilizadas para melhorar a qualidade de queijos com reduzido teor de gordura. O amido pode atuar como repositor de gordura melhorando a textura dos queijos em função de sua alta capacidade de retenção de água. Entretanto, embora existam hipóteses da ocorrência de interação do amido com a caseína, tais interações não foram ainda extensivamente estudadas. O objetivo deste trabalho será estudar a interação entre a caseína e diferentes tipos de amidos de milho: nativos (comum, ceroso e com alto teor de amilose) e modificados (acetilado/adipato e hidroxipropilado/fosfatado) e avaliar os efeitos dos amidos como repositores de gordura nas características físicoquímicas, de textura e sensoriais de queijo fresco light. Para isso, foram produzidas dispersões de caseína e amido em diferentes proporções (2,5:0,5, 2,5:1,0 e 2,5:1,5 caseína:amido) simulando as concentrações normalmente utilizadas para os repositores de gordura (0,5, 1,0 e 1,5%) e considerando a proporção de caseína no leite (2,5%), para a realização das análises de propriedades de pasta e térmicas e poder de inchamento. Também será estudada a interação do amido com a matriz de caseína, através de análises de quantificação de amido no

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2428

Fax: (17)3221-2500

E-mail: liliane@ibilce.unesp.br

UNESP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS LETRAS E
CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS



Continuação do Parecer: 1.893.604

soro e microscopia dos coágulos, assim como a aplicação de amido em queijo fresco light, através da produção de queijo fresco com teor reduzido de gordura, adicionado de amido como repositor de gordura e avaliação das características físico-químicas, de textura e sensoriais dos queijos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho será estudar a interação entre os amidos de milho nativos (comum, ceroso e com alto teor de amilose) e modificados (acetilado/adipato e hidroxipropilado/fosfatado) e a caseína, em dispersões com diferentes concentrações, e avaliar os efeitos do amido como repositor de gordura nas características físico-químicas, de textura e sensoriais de queijo fresco com teor reduzido de gordura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos à saúde dos provadores.

Quanto aos benefícios, esse estudo poderá resultar em contribuições para a área de laticínios, pelo potencial de melhorar a qualidade sensorial dos produtos lácteos com teores reduzidos de gordura, a serem desenvolvidos no mercado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os riscos são mínimos, uma vez que os queijos serão produzidos obedecendo aos programas de Boas Práticas de Fabricação. Além disso, serão realizadas as análises microbiológicas para avaliação da segurança e qualidade microbiológica dos queijos antes destes serem submetidos à análise sensorial. Se houver alguma irregularidade, os queijos serão descartados e a análise será cancelada. Além disso, serão excluídos da pesquisa os indivíduos que possuam algum tipo de alergia à proteína do leite e os indivíduos com intolerância à lactose e que não possam consumir queijos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE está apresentado de acordo com a Resolução 466/2012 e Resolução 510/2016 do CONEP.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa, em reunião ordinária de 16 de janeiro de 2017, deliberou, por unanimidade, pela aprovação do presente Projeto de Pesquisa. Os relatórios parciais deverão ser

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2428

Fax: (17)3221-2500

E-mail: liliane@ibilce.unesp.br

**UNESP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS LETRAS E
CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS**



Continuação do Parecer: 1.893.604

encaminhados semestralmente, contando a partir desta data.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_838659.pdf	17/12/2016 11:46:22		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	17/12/2016 11:39:03	Vivian Ribeiro Diamantino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP.pdf	17/12/2016 11:38:44	Vivian Ribeiro Diamantino	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	17/12/2016 11:38:20	Vivian Ribeiro Diamantino	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DO RIO PRETO, 19 de Janeiro de 2017

Assinado por:

**Monica Abrantes Galindo de Oliveira
(Coordenador)**

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2428

Fax: (17)3221-2500

E-mail: liliane@ibilce.unesp.br