

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE QUIMOSINA NA
COMPOSIÇÃO, RENDIMENTO, PROTEÓLISE E
PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO QUEIJO MUSSARELA
FEITO POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Antonio Nonato de Oliveira**, aprovada pela Comissão Julgadora em 09 de outubro de 2001.

Campinas, 09 de outubro de 2001

Walkiria H. Viotto

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
Presidente da Banca

Antonio Nonato de Oliveira
Médico Veterinário

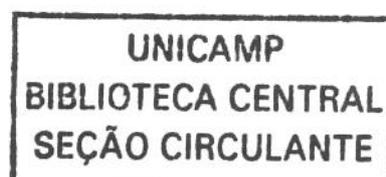
Dra. Walkíria Hanada Viotto
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

CAMPINAS - SP

2001

I



UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: 0
T/UNICAMP
OL4i
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 47211
 PROC. 16-837/02
 C D
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 15-01-2002
 N.º CPD

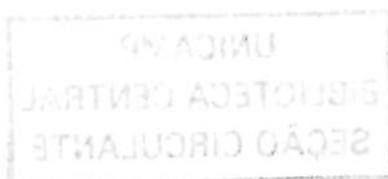
CM00162394-B

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

OL4i Oliveira, Antonio Nonato de
 Influência da concentração de quimosina na composição,
 rendimento, proteólise e propriedades funcionais do queijo
 mussarela feito por acidificação direta / Antonio Nonato de
 Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Walkíria Hanada Viotto
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Mozzarella (Queijo). 2.Rendimento. I.Viotto, Walkíria
 Hanada. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
 Engenharia de Alimentos. III.Título.



BANCA EXAMINADORA

Walkiria H. Viotto

Prof. Dra. Walkiria Hanada Viotto
Orientadora

Salvador Massaguer Roig

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig

Ismael Antonio Bonassi

Prof. Dr. Ismael Antonio Bonassi

Vera Lúcia Signoreli Baldini

Dra. Vera Lúcia Signoreli Baldini

Ariene Gimenes F. Van Dender

Dra. Ariene Gimenes F. Van Dender

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Dr. José Leonardo Etores do Valle

Campinas, ____ de _____ de 2001.

Dedico este trabalho a minha esposa Arlene e aos meus filhos Juliane e Guilherme, pelo apoio e compreensão durante a realização deste.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Walkíria, pela valiosa orientação e apoio em todas etapas deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições e sugestões apresentadas para a redação final da tese.

À Pro-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Goiás intermediária da CAPES, pela bolsa concedida.

À UNICAMP e à FEA, pela oportunidade

Aos meus irmãos Wanderlei e Guida, pelo apoio irrestrito nesta caminhada.

À todos os colegas que conviveram comigo nesse período e contribuíram de alguma forma para esta conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO GERAL	xii
GENERAL ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1. QUEIJO MUSSARELA: TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO, PROTEÓLISE E PROPRIEDADES FUNCIONAIS - UMA REVISÃO.	2
INTRODUÇÃO	3
<i>Composição e Legislação</i>	3
TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO	5
<i>Tradicional</i>	5
<i>Acidificação direta</i>	7
RENDIMENTO	8
<i>Fatores que afetam o rendimento dos queijos</i>	9
<i>Composição do leite</i>	10
<i>Composição do queijo</i>	10
<i>Perdas no corte</i>	10
<i>Estocagem do leite a frio</i>	11
<i>Crescimento de psicotróficos</i>	11
<i>Contagem de células somáticas (CCS)</i>	11
<i>Atividade da plasmina</i>	12
<i>Tipo e concentração do coagulante</i>	12
<i>Pasteurização do leite</i>	13
<i>Rendimento de queijo Mussarela fabricado por acidificação direta</i>	13
PROTEÓLISE	14
<i>Proteólise em queijo Mussarela fabricado por acidificação direta</i>	16
FUNCIONALIDADE DE QUEIJO MUSSARELA	17
<i>Textura do queijo Mussarela</i>	17
<i>Funcionalidade do queijo derretido</i>	20
<i>Derretimento</i>	20
<i>Óleo Livre</i>	23
<i>Escurecimento Não Enzimático (Browning)</i>	25

<i>Elongação (stretchability)</i>	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE QUIMOSINA NA COMPOSIÇÃO E RENDIMENTO DO QUEIJO MUSSARELA FEITO POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA COM ÁCIDO ACÉTICO	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
<i>2.1 Produção do queijo</i>	39
<i>2.2 Amostragem do queijo</i>	40
<i>2.3 Composição química de leite, soro, água de filagem e queijo</i>	40
<i>2.4 Recuperação de gordura, nitrogênio e cálcio</i>	41
<i>2.5 Rendimento</i>	42
<i>2.6 Planejamento experimental e análise estatística</i>	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
<i>3.1 Composição do leite</i>	43
<i>3.2 Fabricação do queijo</i>	44
<i>3.3 Composição do soro e água de filagem</i>	45
<i>3.4 Composição do queijo</i>	46
<i>3.5 Recuperação de gordura, nitrogênio e cálcio</i>	47
<i>3.6 Rendimento</i>	49
4 CONCLUSÕES	50
5 REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO 3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE QUIMOSINA NA COMPOSIÇÃO E PROTEÓLISE DO QUEIJO MUSSARELA FABRICADO POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA COM ÁCIDO ACÉTICO	53
RESUMO	54
ABSTRACT	54
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	56
<i>2.1 Fabricação do queijo</i>	56

2.2 <i>Preparo de amostras</i>	57
2.3 <i>Análises de composição</i>	58
2.4 <i>pH e acidez titulável</i>	58
2.5 <i>Nitrogênio solúvel a pH 4,6 e 12% TCA</i>	58
2.6 <i>Eletroforese</i>	59
2.7 <i>Planejamento experimental e análise estatística dos resultados</i>	59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1 <i>Composição do queijo</i>	60
3.2 <i>Evolução do pH e acidez</i>	61
3.3 <i>Índices de proteólise (NS a pH 4,6 e em 12% TCA)</i>	65
3.4 <i>Eletroforese</i>	68
4 CONCLUSÕES	70
5 REFERÊNCIAS	70

CAPÍTULO 4. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE QUIMOSINA NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO QUEIJO MUSSARELA FEITO POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA COM ÁCIDO ACÉTICO	72
RESUMO	73
ABSTRACT	73
1 INTRODUÇÃO	74
2 MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1 <i>Fabricação do queijo</i>	75
2.2 <i>Preparo de amostras</i>	76
2.3 <i>Propriedades funcionais</i>	76
2.4 <i>Planejamento experimental e análise estatística dos resultados</i>	77
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1 <i>Perfil de textura do queijo não derretido</i>	78
3.2 <i>Propriedades funcionais do queijo derretido (derretimento e óleo livre)</i>	81
3.3 <i>Proteólise e funcionalidade</i>	84
3.4 <i>Significado prático</i>	84
4 CONCLUSÕES	84
5 REFERÊNCIAS	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

	pág
TABELA 1. Composição padrão em queijo Mussarela nos EUA.	4

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Composição média (n=3) do leite utilizado na produção de queijo Mussarela por acidificação direta com três diferentes concentrações de quimosina ¹ obtida por fermentação.	43
TABELA 2. Tempo médio (n=3) de fabricação do queijo Mussarela feito por acidificação direta com três diferentes concentrações de quimosina ¹ obtida por fermentação.	45
TABELA 3. Composição média (n=3) do soro e água de filagem obtido do queijo Mussarela por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina ¹ obtida por fermentação.	46
TABELA 4. Composição média (n=3) do queijo Mussarela produzido por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina ¹ obtida por fermentação.	47
TABELA 5. Recuperação de gordura, nitrogênio e cálcio normalizada (n=3) em soro, água de filagem e queijo Mussarela feito por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina ¹ obtida por fermentação.	48
TABELA 6. Rendimentos real, ajustado, teórico e eficiência (n=3) em queijo Mussarela feito por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina ¹ obtida por fermentação.	50

CAPÍTULO 3

TABELA 1. Modelo estatístico usado para análise dos dados.	60
TABELA 2. Composição média (n=3) do queijo Mussarela produzido por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina ¹ obtida por fermentação.	61

TABELA 3. Quadrado médio e probabilidades para acidez titulável, pH e índices de proteólise, Nitrogênio Solúvel (pH 4,6 e 12% TCA) em queijo Mussarela fabricado por acidificação direta, armazenado a 4°C durante 33 dias.	63
CAPÍTULO 4.	
TABELA 1. Modelo estatístico usado para análise dos dados.	77
TABELA 2. Quadrado médio e probabilidades para perfil de textura TPA (dureza, elasticidade e coesividade), derretimento e óleo livre como % de gordura total em queijo Mussarela feito por acidificação direta armazenado a 4°C durante 33 dias.	79

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1. Modelo proposto para mostrar o efeito do NaCl na formação de óleo livre em queijo Mussarela, através da troca de sódio por cálcio ligado a caseína. pág
25

CAPÍTULO 3

- FIGURA 1. Evolução do pH (A) e acidez titulável (B) em queijo Mussarela feito por acidificação direta com 0,02; 0,05 e 0,10 mg/kg de leite de quimosina obtida por fermentação durante armazenamento refrigerado a 4°C. 64
- FIGURA 2. Evolução da relação do NS em pH 4,6 / NT (A) e NS em 12% TCA / NT (B) do queijo Mussarela feito por acidificação direta com 0,02; 0,05, e 0,10 mg de quimosina/kg de leite, obtida por fermentação durante 33 dias de estocagem refrigerada a 4°C. 67
- FIGURA 3. Eletroforetograma de queijo Mussarela feito por acidificação direta com ácido acético. Banda 1 = Caseinato de sódio (padrão). Bandas 2, 3 e 4 = 0,02 mg de quimosina/kg de leite (5; 19 e 33 dias). Bandas 5; 6 e 7 = 0,05 mg de quimosina/kg de leite (5; 19 e 33 dias). Bandas 8; 9 e 10 = 0,10 mg de quimosina/kg de leite (5; 19 e 33 dias). 69

CAPÍTULO 4

- FIGURA 1. Influência da concentração de quimosina no Perfil de Textura; dureza (A), elasticidade (B) e coesividade (C) do queijo Mussarela feito por acidificação direta com 0,02; 0,05 e 0,10 mg de quimosina/kg de leite, durante 33 dias de estocagem refrigerada a 4°C. 80
- FIGURA 2. Influência da concentração de quimosina no derretimento (A) e óleo livre (B) do queijo Mussarela feito por acidificação direta com 0,02; 0,05 e 0,10 mg de quimosina / kg de leite durante 33 dias de estocagem refrigerada a 4°C. 83

RESUMO GERAL

O objetivo desse trabalho foi determinar o efeito de diferentes concentrações de quimosina na composição, rendimento, proteólise e propriedades funcionais do queijo Mussarela fabricado por acidificação direta, com ácido acético. Cem litros de leite foram usados em cada tanque de queijo feito com 0,02; 0,05 e 0,10mg de quimosina obtida por fermentação/kg de leite. Cada tratamento foi realizado em triplicata, perfazendo nove processamentos, que foram previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução. Modificações na fabricação de Mussarela por acidificação direta foram desenvolvidas para se obter um queijo de composição homogênea e constante, incluindo a padronização do teor de caseína:gordura, a coagulação e agitação da massa a 41°C, a inclusão de tempo de repouso por 5 minutos logo após o corte da massa e a salga na massa em duas etapas. Leite, soro, água de filagem e queijo foram pesados e sua composição determinada. Os queijos foram analisados após 5, 12, 19, 26 e 33 dias de armazenagem refrigerada a 4°C para pH, acidez, teor de nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 e a 12% ácido tricloroacético (TCA), perfil de textura TPA (dureza, elasticidade e coesividade), óleo livre e derretimento. O aumento da concentração de quimosina não influenciou a composição dos queijos. Queijos fabricados com 0,02mg de quimosina/ kg de leite apresentaram maiores perdas de gordura e nitrogênio no soro e na água de filagem. As recuperações de gordura, nitrogênio e cálcio foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) para os queijos fabricados com menor concentração de quimosina. Embora, o aumento da concentração de quimosina não influenciasse o rendimento significativamente o rendimento e a eficiência dos queijos, houve uma discreta tendência, de maior eficiência para os queijos feitos com a maior concentração de quimosina. Os valores de pH, acidez e teor de NS a 12% TCA mantiveram-se estáveis durante a estocagem refrigerada, e não foram influenciados pela concentração de coagulante. O aumento do teor de NS em pH 4,6 foi significativamente menor para os queijos feitos com menor concentração de quimosina, provavelmente, em função da menor atividade residual do coagulante retido no queijo. A análise do eletroforetograma revelou que a quantidade de α_{s-1} -caseína diminuiu com o tempo de estocagem refrigerada para todas as concentrações de quimosina, e a extensão de proteólise foi significativamente superior ($p < 0,05$) nos queijos feitos com a maior concentração de quimosina. O teor de β -caseína, permaneceu constante durante todo o tempo. O aumento da

concentração de quimosina resultou em queijos com menor dureza TPA, maior capacidade de derretimento e maior separação de óleo livre, provavelmente em função da proteólise mais intensa, sendo esses valores estatisticamente diferentes entre si para as três concentrações de coagulante. Portanto, a concentração de coagulante parece ser uma variável útil na redução de custos com os ingredientes de fabricação e no controle das propriedades funcionais do queijo Mussarela de acidificação direta com ácido acético.

GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of different concentrations of chymosin on the composition, yield, proteolysis and functional properties of Mozzarella cheese produced by direct acidification with acetic acid. One hundred litres of milk were used for each vat of cheese, which was made with the addition of 0.02, 0.05 and 0.10 mg of chymosin (obtained by fermentation) per kg milk. Each treatment was carried out in triplicate, resulting in nine trials, which were previously randomised to determine the order of execution. Modifications in the manufacture of Mozzarella by acidification were developed aiming at obtaining cheeses with more homogenous and constant composition, including a standardization of the levels of casein : fat, coagulation and stirring of the batch at 41°C, the inclusion of a 5 minute resting period immediately after cutting the curd and a two-stage salting process. Milk, whey, stretching water and cheese were weighed, and their compositions determined. The cheeses were analysed after 5, 12, 19, 26 and 33 days of refrigerated storage at 4°C for pH, acidity, level of nitrogen soluble (NS) at pH 4.6 and in 12% trichloroacetic acid (TCA), texture profile (TPA) (hardness, springiness and cohesiveness), free oil and melting characteristics. An increase in the concentration of chymosin did not influence the composition of the cheeses. Cheeses processed with 0.02 mg chymosin/kg milk presented greater losses of fat and nitrogen in the whey and stretching water. Recovery of the fat, nitrogen and calcium was significantly lower ($p < 0.05$) for the cheeses prepared with the lowest concentration of chymosin. Although an increase in the concentration of chymosin did not significantly affect the yield and efficiency of the cheeses, there was a discreet tendency to greater efficiency in cheeses made with the higher concentration of chymosin. The values for pH, acidity and level of NS in 12% TCA remained stable during refrigerated storage and were not influenced by the concentration of coagulant. The increase in the level of NS at pH 4.6 was significantly lower in cheeses made with a lower concentration of chymosin, probably as a function of a lower residual activity of the coagulant retained by the cheese. An analysis of the electrophoregramme showed that the amount of α_s - $_1$ -casein decreased with time of refrigerated storage for all the concentrations of chymosin, and the extent of proteolysis was significantly greater ($p < 0.05$) in cheeses made with the highest concentration of chymosin. The level of β -casein remained constant throughout the whole period. An increase in the concentration of chymosin resulted in hardness (TPA) cheeses with a greater melting capacity and greater separation of oil, probably as a function of more intense proteolysis, these values being statistically different for the three concentrations of coagulant. Thus, the concentration of coagulant appears to be a useful variable in the reduction of ingredient costs and in the control of the functional properties of Mozzarella cheeses prepared by direct acidification with acetic acid.

INTRODUÇÃO GERAL

O queijo Mussarela é o mais produzido e consumido no mundo. No Brasil, segundo estimativas não oficiais a sua produção está em torno de 150 mil toneladas/ano, representando aproximadamente 43% do total da produção brasileira de queijos. A Mussarela pertence ao grupo dos queijos de massa filada, que se distingue pelo tratamento mecânico e plasticizante da massa em água quente, o que confere ao queijo sua estrutura fibrosa.

No Brasil, grande parte desse queijo é produzida com fermento mesófilo, o que o torna mais adequado para o consumo direto, onde a principal característica demandada é um bom fatiamento. Já a Mussarela produzida para uso em pizza utiliza fermento termofílico, que é capaz de resistir ao tratamento térmico durante a filagem e conferir ao queijo as características desejadas de textura, derretimento e outras propriedades funcionais.

A técnica de acidificação direta, embora já utilizada com sucesso na produção comercial de queijos em outros países, é pouco utilizada no Brasil. A adoção dessa técnica possibilita a obtenção de maiores rendimentos de fabricação, permite considerável redução dos custos de fabricação em função da economia de tempo, da não utilização de fermento láctico e da possibilidade do uso de menores quantidades de coagulante.

No processo de acidificação direta, a coagulação do leite ocorre a um pH menor, resultando em maior quantidade de coagulante retido, maior velocidade das reações de hidrólise e maior remoção de cálcio das caseínas, o que pode afetar as características de textura e propriedades funcionais. A coagulação do leite a pH mais baixo, mais próximo do pH ótimo de atuação da quimosina, pode possibilitar a redução da concentração de coagulante empregada. A desmineralização da micela de caseína provoca a diminuição das ligações de proteína unidas por pontes de cálcio, resultando em aumento da hidratação da matriz protéica.

O aumento da competição entre as indústrias para produção de Mussarela de baixo custo, de rendimento elevado, redução do tempo de maturação, diminuição de custos com ingredientes adicionados, tem aumentado o interesse pela técnica de acidificação direta.

Variações na concentração de coagulante podem afetar a composição, rendimento, proteólise e as propriedades funcionais do queijo. Assim, o objetivo do trabalho foi estudar a influência de diferentes concentrações de quimosina (0,02, 0,05 e 0,10 mg/kg de leite) na composição, rendimento, proteólise e propriedades funcionais do queijo Mussarela fabricado por acidificação direta, com ácido acético e estocado a 4°C durante 33 dias.

**CAPÍTULO 1. QUEIJO MUSSARELA: TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO,
PROTEÓLISE E PROPRIEDADES FUNCIONAIS - UMA
REVISÃO.**

INTRODUÇÃO

O aumento sem precedentes da produção e venda de Mussarela nas duas últimas décadas tem feito com que a Mussarela seja atualmente o queijo mais consumido mundialmente (Pilcher & Kindstedt, 1990). Esse crescimento, atribuído à mudança de hábito alimentar da população, tem sido acompanhado pela expansão do número de pizzarias, lanchonetes e aumento de venda de produtos prontos congelados, onde o queijo Mussarela é extensamente utilizado como ingrediente culinário.

No Brasil, a fabricação e o consumo de Mussarela vem crescendo mais do que qualquer outro tipo de queijo, e conforme Datamark Consultores (1998), a produção anual de Mussarela pode ser estimadas em 147 mil toneladas, representando aproximadamente 43% do total da produção brasileira de queijos.

A Mussarela pertence ao grupo dos queijos de massa filada, no qual também estão incluídos o Provolone e o “Caccio Cavalo”. Os queijos deste grupo se distinguem pela etapa característica de filagem, onde a massa é submetida a um trabalho mecânico em água quente. Nessa etapa, a massa que tinha uma estrutura amorfa é transformada em uma estrutura organizada, elástica e compacta.

A massa da Mussarela é esbranquiçada, firme, compacta e tem sabor ligeiramente ácido. Quando fabricada para ser utilizada em pizzas e sanduíches, o formato normalmente é retangular, variando somente o peso. Quando o produto é destinado ao consumo direto, os formatos variam, podendo ser de bolinha, nozinho ou palito (Furtado & Lourenço Netto, 1994). A legislação brasileira define o queijo Mussarela como o produto obtido pela filagem da massa acidificada, coagulada por meio de coalho e/ ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de cultura láctica específica (Brasil, 1997).

Composição e Legislação

No Brasil, este queijo é largamente produzido e a tecnologia empregada é muito diversificada, com os queijos apresentando variações em sua composição. A composição média para a Mussarela no Brasil varia com relação à umidade (43-46%), à gordura (22-

24%), ao sal (1,6-1,8%) e ao pH (5,1-5,3). Esta grande variação da composição pode ser explicada pela variação na composição do leite, pela diversidade na preferência dos mercados locais e, pelas diferentes formas de utilização do queijo (Furtado & Lourenço Netto, 1994), não existindo diferenciação de padrão físico-químico para as diferentes Mussarelas comercializadas, seja ela usada para o consumo direto ou como ingrediente culinário. A Tabela 1 apresenta a composição dos vários tipos de Mussarela definidos pela legislação americana.

TABELA 1. Composição padrão do queijo Mussarela nos EUA (Kindstedt, 1987)

Tipo	Umidade (%)	GBS ¹ (%)
Mussarela integral	52 < U ≤ 60	≥ 45
Mussarela integral de baixa umidade	45 < U ≤ 52	≥ 45
Mussarela de baixa umidade parcialmente desnatada	45 < U ≤ 52	30 ≤ GBS < 45
Mussarela parcialmente desnatada	52 < U ≤ 60	30 ≤ GBS < 45

¹ Gordura em base seca

A composição físico-química deste tipo de queijo é extremamente variável, de acordo com a sua origem e tipo. Em países como a Itália e EUA, existem recomendações legais e cada tipo possui uma determinada composição, tendo que manter, dentro de limites, índices como extrato seco, gordura no extrato seco e umidade (Cortesi & Maranelli, 1982); no Brasil, infelizmente, tais recomendações são inexistentes, resultando num queijo pouco padronizado. Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (Brasil, 1997), o queijo Mussarela é um queijo de média, alta ou muito alta umidade. Até há pouco tempo, a Mussarela era considerada por muitos produtores como um queijo que poderia ser elaborado com leite de qualidade inferior, cru ou pasteurizado, representando desta forma, uma alternativa para o leite ácido recebido nos laticínios. É importante ressaltar que essa prática, ainda vigente em alguns estabelecimentos, é proibida pela legislação e resulta num queijo de baixa qualidade e que oferece riscos à saúde pública.

Essa visão distorcida a respeito da produção de um queijo tão complexo quanto a Mussarela está mudando rapidamente, provavelmente devido ao rápido crescimento das cadeias de “fast food”, que possuem requerimentos muito específicos e restritos para a Mussarela utilizada como ingrediente básico no preparo de seus produtos (pizza, alimentos congelados, etc.). Outra causa para a mudança de mentalidade dos fabricantes foi a integração do Brasil ao MERCOSUL, o que fez com que as normas brasileiras para a fabricação de queijo e seus padrões microbiológicos fossem revisados e adequados às exigências de um mercado muito mais amplo e competitivo do que aquele contido dentro das fronteiras nacionais (Furtado & Lourenço-Neto, 1994).

TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO

A Mussarela tradicional, de origem italiana, era produzida com leite de búfala cru, contendo alto teor de gordura, resultando num queijo saboroso, suculento, sendo preferencialmente consumido fresco. Atualmente, o queijo Mussarela é predominantemente fabricado com leite bovino, com baixo teor de gordura e de forma bastante mecanizada. Essa mudança deu origem a um produto, com sabor pouco pronunciado e propriedades funcionais compatíveis com o modo como esse queijo é consumido, preferencialmente derretido (Apostolopoulos, 1994).

Tradicional

Grande parte da Mussarela produzida no Brasil utiliza fermento mesófilo, ao invés do termofílico. A Mussarela utilizada em pizza e como ingrediente culinário requer uma boa capacidade de derretimento, obtida pela presença de coagulante residual e fermento láctico ativo, que resista a tratamento térmico por ocasião da filagem, razão pela qual se faz uso de culturas termofílicas para produção de Mussarela destinada a pizza, denominada “Pizza Cheese”. O queijo produzido com fermento mesófilo é mais adequado ao consumo direto, tendo como característica funcional mais importante, a fatiabilidade. Dentro da realidade brasileira a Mussarela é comercializada basicamente fatiada; portanto, é importante que este tipo de queijo não possua adesividade excessiva, evitando assim a

reaglomeração das fatias. Apesar desta diferenciação tecnológica, no Brasil, o queijo Mussarela fabricado com fermento mesófilo é utilizado indistintamente tanto para o consumo direto como ingrediente de uso culinário (Furtado, 1999).

Em todas as variedades de queijos, particularmente nos de massa filada, a fermentação é uma etapa importante do processo de fabricação (Addeo & Coppola, 1983). O ácido láctico, produzido a partir da fermentação da lactose, causa a redução do pH, o que facilita a sinérese da coalhada e, ao mesmo tempo, inibe outras fermentações indesejáveis no queijo.

A fermentação da massa ocorre no período de algumas horas, sendo que a sua duração depende basicamente da temperatura utilizada, que normalmente oscila entre 25 a 41°C. Pela ação da microbiota presente, a lactose é transformada em ácido láctico, propiciando as condições para filagem, ao mesmo tempo em que permite o desenvolvimento das características organolépticas desejadas no queijo. Portanto, são necessários o conhecimento e controle adequado desta etapa para o domínio da tecnologia de fabricação deste queijo. É de primordial importância a existência de cálcio iônico por ocasião da coagulação e uma correta produção de ácido durante a fermentação (Addeo & Coppola, 1983).

A acidificação do leite ocasiona mudanças profundas no equilíbrio dos sais. A produção ou a adição de ácidos ao leite causa uma diminuição no pH, o que resulta na migração do cálcio e fósforo da micela de caseína para a fase aquosa (Tunick, 1987). Além disso, a produção ou a adição de ácido ao leite causa uma remoção progressiva de cálcio e fósforo das micelas do complexo fosfoparacaseinato.

Os fenômenos químicos, que ocorrem por ocasião da fermentação e filagem da massa, iniciam-se praticamente com a coagulação do leite, a qual é consequência da ação do coagulante sobre a caseína, principal proteína do leite. No estado nativo, a caseína apresenta-se formada por fosfocaseinato de cálcio e sais de sódio, magnésio, potássio e citrato. Pela ação do coagulante sobre a caseína, forma-se um gel brando, macio, esbranquiçado e com capacidade de reter umidade, sendo a caseína transformada em outra forma protéica altamente sensível à coagulação na presença do cálcio. Num meio rico em

cálcio como é o leite, esta nova forma protéica obtida coagula-se à temperatura ambiente como paracaseinato bicálcico, sendo a gordura aprisionada mecanicamente ao mesmo tempo em que ocorre a sinérese, fenômeno este muito importante e que afeta a umidade e qualidade do produto final (Walstra *et al.*, 1985; Pearse & Mackinlay, 1989). O paracaseinato bicálcico não possui a propriedade de filar, de formar fios, quando submetido à ação de tração e da água quente. É necessária uma outra transformação na massa para que a mesma possa ser filada e apresente propriedades de alongação. Isso é conseguido pela ação do ácido láctico, que transforma o paracaseinato bicálcico em monocálcico (Chapman & Sharpe, 1981), o qual é solúvel em água e em solução de cloreto de sódio, e que quando aquecido acima de 54°C adquire propriedades de alongação (Kosikowski & Mistry, 1997).

Uma coalhada não adequadamente acidificada, fora do pH de filagem, é impossível de ser filada e apresenta-se pouco elástica, rompendo-se pela ação de tração quando submetida a filagem. O controle preciso da fermentação é importante para se evitar perdas de gordura, nitrogênio e, dependendo do pH, tem grandes reflexos no rendimento e qualidade do queijo (Keller *et al.* 1974).

Acidificação direta

Embora já pesquisada há anos e utilizada industrialmente em inúmeros países, a técnica de acidificação direta ainda é pouco conhecida no Brasil, refletindo-se na reduzida quantidade de trabalhos de divulgação sobre o tema, razão pela qual a utilização industrial ainda é pouco expressiva. Em outros países, a acidificação direta vem sendo utilizada na elaboração de diversos tipos de queijo, entre os quais Ricota, Queso Blanco Latino Americano e a Mussarela, substituindo total ou parcialmente a acidificação devida a fermentos lácticos durante o processamento dos queijos (Valle, 1991).

Vários autores estudaram o efeito de diversos ácidos orgânicos (clorídrico, cítrico, acético, láctico e fosfórico) na produção do queijo Mussarela por acidificação direta (Breene *et al.*, 1964; Larson *et al.*, 1967; Shehata *et al.*, 1966; Quarne *et al.*, 1968; Keller *et al.*, 1974; Patel *et al.*, 1986) e concluíram que a adição direta de ácido ao leite, antes da coagulação, aumenta a velocidade da reação enzimática, possibilitando a redução do tempo de fabricação. O processo permite a filagem da massa logo após a sua obtenção, resultando

em economia, tanto pela redução de gastos com ingredientes (coagulante e fermento láctico) como pelo aumento da capacidade instalada das fábricas de queijo (Olson, 1971).

A adição de ácido ao leite deve ser feita de forma rápida e homogênea, a fim de evitar gradientes de concentrações que podem ocasionar a sua floculação (Del Prato, 1993), comprometendo desta forma, a qualidade do produto final e acarretando perdas de rendimento na fabricação.

A formação da coalhada no leite já acidificado altera o processo de coagulação, levando a alterações nas características do coágulo obtido, no nível de cálcio associado com a caseína e na retenção de minerais na massa, modificando as características de composição do queijo (Fox, 1985).

Segundo Weber (1987), na coagulação do leite por acidificação direta, a rede micelar é pouco estruturada e o coágulo é formado de micelas pequenas de caseína com baixo teor de cálcio e fósforo, o que resulta em baixa capacidade de dessoragem. Devido ao reduzido teor de cálcio, as ligações são fracas e o coágulo formado é gelatinoso, com tendência a fragmentar-se mais e contrair-se menos, levando à formação de uma rede protéica mais grosseira e mais porosa. A dessoragem deste coágulo ocorre por simples fluxo de líquido através da massa porosa; porém, a retenção de umidade continua alta não somente pela ausência de forças contrativas mas também porque a caseína, com pouco fosfato de cálcio micelar associado, forma uma massa plástica que mantém o soro retido no seu interior.

RENDIMENTO

O rendimento do queijo é o parâmetro que determina a viabilidade econômica de sua fabricação. Normalmente, é expresso como sendo a quantidade de queijo (kg) obtido a partir de 100 kg de leite. As fórmulas de rendimento têm sido desenvolvidas com base no conteúdo de proteína total ou caseína e no teor de gordura do leite, e as mais utilizadas são geralmente as derivadas por equações de regressão empíricas (Emmons, 1990).

A simples comparação dos rendimentos dos queijos não tem grande significado, devido aos diferentes teores de umidade e sal. Por esse motivo, é desejável calcular-se o

rendimento dos queijos ajustado para o mesmo teor de umidade e sal (RAJ), como descrito pela *Equação 1* (Lau *et al.*, 1990).

$$RAJ = \frac{(\text{Rendimento}) [100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ de sal})]}{100 - (\% \text{ umidade desejada} + \% \text{ sal desejada})} \quad \text{Equação (1)}$$

A fórmula mais usada para calcular o rendimento teórico (RT) de queijos é a proposta por Van Slyke & Price (1952), baseada em queijo Cheddar. Uma variante dessa fórmula foi proposta por Barbano (1984) para avaliar o rendimento de Mussarela (*Equação 2*). As modificações incluíram a mudança na constante de retenção de gordura de 0,93 na fórmula de Van Slyke para 0,85 na fórmula de Barbano e, assume que 10% da caseína não é retida no queijo. Outra modificação proposta foi a mudança do fator de retenção para o sal adicionado, componentes não caseícos e sólidos não gordurosos retidos na fase aquosa do queijo, que na fórmula original era de 1,09 e na fórmula modificada para Mussarela passou para 1,13, como mostra a *Equação 2*.

$$RT = \frac{[(0,85\% \text{ gordura leite}) + (\% \text{ caseína leite} - 0,1)] 1,13}{1 - (\% \text{ umidade desejada queijo} / 100)} \quad \text{Equação (2)}$$

O cálculo da eficiência do rendimento dos queijos pode ser obtido pela divisão do rendimento ajustado (RAJ) pelo rendimento teórico (RT), multiplicado por 100.

Para Mussarela fabricada por acidificação direta, Metzger *et al.*, (2000) propuseram a inclusão na fórmula do fator de retenção de fosfato de cálcio que variou em função do pH.

Fatores que afetam o rendimento dos queijos

O rendimento de fabricação pode ser controlado, desde que alguns parâmetros básicos sejam conhecidos. Uma vez que estes parâmetros estejam sob controle adequado, permitindo a maximização do rendimento de fabricação, resta expressar de maneira correta os resultados. Na indústria queijeira, a expressão do rendimento quase sempre é feita de maneira empírica e inexata, expressa como a quantidade de kg de queijo obtido a partir de um dado volume de leite e, portanto, possui pouco significado para efeito de comparação de rendimento entre os diversos lotes produzidos. Os principais fatores que influenciam o rendimento de fabricação do queijo são aqueles relacionados ao teor de caseína e gordura

no leite e os relativos às perdas desses componentes durante as etapas do processamento (Emmons, 1990).

Composição do leite

O teor de proteína e o de gordura tem um papel fundamental na definição do rendimento. Em relação às proteínas, considera-se sobretudo a caseína, coagulada pela ação do coalho e responsável pela formação de uma rede protéica (paracaseinato de cálcio) que aprisiona, em diferentes proporções, os demais elementos do leite como gordura, lactose, sais minerais, etc. Aumentando-se o teor de caseína do leite, o rendimento de fabricação é aumentado pelo próprio peso da proteína que é retida a mais e também pelo fato de que a caseína aumenta consideravelmente a retenção de água no queijo. Por outro lado, um aumento do teor de gordura provoca o mesmo efeito positivo no rendimento, só que neste caso a maior retenção de água no queijo é devida à menor sinérese durante a elaboração no tanque. É muito importante que a padronização do leite para a fabricação seja feita com base na relação caseína:gordura que, se mantida fixa, permite obter queijos com a mesma composição físico-química. Cabe ressaltar que a composição do leite e, conseqüentemente o rendimento, sofrem influência de diversos fatores como raça do animal, alimentação, estágio de lactação, estação do ano, estado de saúde do animal, etc (Banks *et al.*, 1981).

Composição do queijo

Naturalmente, quanto maior o teor de umidade de um queijo, maior será o rendimento. Entretanto, a elevação do teor de umidade é limitada por alterações paralelas que podem ocorrer no queijo, como a aceleração do processo de maturação (proteólise mais intensa), que pode provocar alterações de consistência que dificultam o fatiamento e a trituração, entre outros problemas (Emmons, 1990).

Perdas no corte

Sem dúvida, é impossível cortar-se uma coalhada sem que haja, no soro, perdas parciais de componentes do leite. Entretanto, estas perdas podem ser minimizadas através da coagulação bem controlada do leite e de um corte cuidadoso da coalhada. A rapidez do corte e o tamanho dos grãos, bem como a intensidade da agitação feita imediatamente após

o corte, têm forte influência nas perdas de gordura e proteínas no soro. Por outro lado, o processo de coagulação é afetado por outros fatores, como a temperatura de pasteurização do leite, seu teor de cálcio e proteínas, acidez e pH, temperatura de coagulação, etc (Olson, 1971).

Estocagem do leite a frio

A estocagem do leite cru, a baixas temperaturas, provoca mudanças físico-químicas no leite, como a dissociação parcial da β -caseína que passa para a fase solúvel, aumentando as perdas de nitrogênio, gordura e finos da coalhada, e conseqüentemente, reduzindo o rendimento. Weatherup & Mullan (1993) mostraram que o aumento do tempo de armazenamento do leite à baixa temperatura (3 a 7°C) resultou na diminuição do rendimento dos queijos.

Crescimento de psicrotróficos

Psicrotróficos são microrganismos que podem desenvolver-se rapidamente no leite, mesmo em baixas temperaturas de estocagem como 7°C ou menos. Essas bactérias produzem lipases e proteases termorresistentes, que sobrevivem à pasteurização do leite. Estas proteases podem degradar lentamente a caseína, aumentando a perda de nitrogênio. Contagens de psicrotróficos superiores a 1×10^6 UFC/mL podem comprometer o rendimento e o sabor do queijo (Wasltra *et al.*, 1999).

Células somáticas

A mastite é a infecção da glândula mamária de matrizes leiteiras, que danifica o tecido celular e atrai para o local, células brancas do sangue, que são parcialmente transferidas para o leite, aumentando assim sua contagem de células somáticas (CCS). Em leites com contagens superiores a 2×10^6 /mL, essas células brancas produzem enzimas proteolíticas, em quantidade e nível de atividade suficientes para degradar a caseína, a ponto de diminuir o rendimento. Além disso, as células somáticas contêm fortes componentes antimicrobianos que podem ser liberados no leite e vir a inibir a atividade das culturas lácticas. Barbano (1993) confirmou que o aumento do teor de células somáticas levou ao aumento da quantidade e atividade das enzimas proteolíticas presentes no leite,

resultando na hidrólise de parte das caseínas e conseqüente dissolução no soro, com diminuição significativa no rendimento de queijo Cheddar.

Atividade da plasmina

A plasmina é a protease natural do leite. A maior parte desta enzima se encontra no leite sob a forma de seu precursor, o plasminogênio, que não tem atividade proteolítica. Células somáticas, especialmente em altas contagens, produzem um ativador do plasminogênio que pode convertê-lo para plasmina ativa, ainda na glândula mamária. Como a temperatura ideal para atuação da plasmina é próxima à temperatura corporal da vaca, a maior parte do dano provocado por sua atividade proteolítica na caseína ocorre ainda no úbere. A mastite acaba sendo, portanto, outra influência negativa no rendimento (Weatherup & Mullan, 1993).

Tipo e concentração do coagulante

Os coagulantes são proteases que atacam a fração κ -caseína, provocando a coagulação do leite. Algumas destas proteases são mais proteolíticas ou menos específicas em sua atuação do que as outras. Enzimas mais proteolíticas, como a pepsina suína ou as proteases ácidas de origem fúngica, além de hidrolisar a ligação 105-106 da κ -caseína, continuam a degradar rapidamente o restante da cadeia de aminoácidos durante a coagulação do leite provocando maior perda de nitrogênio e gordura durante o corte da coalhada. A quimosina é a enzima que alia a melhor atuação coagulante com a mais alta especificidade, permitindo o melhor aproveitamento de elementos do leite na coalhada e, portanto, melhor rendimento. A quimosina está presente no estômago de vitelo ou pode ser obtida por fermentação. A concentração do coagulante usado na fabricação do queijo pode afetar a natureza da estrutura do coágulo e influenciar a recuperação de gordura e nitrogênio, resultando em variações no rendimento (Walstra *et al.*, 1999).

Barbano & Rasmussen (1992) estudaram a influência do tipo de coagulante no rendimento do queijo Mussarela. Queijos fabricados com quimosina obtida por fermentação apresentaram rendimento superior aos queijos obtidos com coalhos de origem microbiana (*Mucor miehei*, *Mucor pusillus*).

Micketts & Olson (1974), trabalhando com Mussarela por acidificação direta, encontraram que o rendimento foi inversamente proporcional à concentração de coalho bovino e atribuíram o resultado à maior recuperação de gordura no queijo.

Pasteurização do leite

Quando o leite é pasteurizado, uma pequena porcentagem das proteínas do soro é desnaturadas ($\pm 3\%$). A β -lactoglobulina desnaturada tende a se agregar a κ -caseína, e passa a fazer parte do coágulo ao invés de perder-se no soro, como acontece usualmente com as proteínas do soro. Este fenômeno provoca um ligeiro aumento no rendimento, devido ao aumento do teor protéico e também pela conhecida capacidade de hidratação das proteínas do soro (Walstra *et al.*, 1999). Apesar da desnaturação ser maior com o aumento da intensidade do tratamento térmico, não é recomendável o uso de temperaturas superiores a $75^{\circ}\text{C}/15$ seg na fabricação de queijos, devido à insolubilização do cálcio.

Rendimento de queijo Mussarela por acidificação direta

Na acidificação direta, devido ao menor pH em que ocorre a coagulação do leite, a ação desmineralizante da micela de caseína pelo ácido resulta na diminuição das ligações entre as proteínas unidas por pontes de cálcio, favorecendo o intumescimento da matriz protéica, o que pode aumentar o rendimento dos queijos (Fernandez & Kosikowski, 1986). Portanto, as modificações nas interações proteína-proteína e o aumento da capacidade de absorção de água pela matriz protéica da Mussarela fabricada por acidificação direta podem ser atribuídas a maior ação quelante do ácido orgânico adicionado (Van Hooydonk *et al.*, 1986).

Ennis & Mulvihill (1999) postularam que a maior hidratação das proteínas na acidificação direta, pode ser influenciada pela velocidade de corte da massa. O aumento na velocidade de corte provoca uma maior desagregação das partículas de caseína coagulada, resultando em aumento da possibilidade de ocorrência das interações água-proteína. O aumento da exposição do número de regiões hidrofílicas é seguido por uma maior imobilização de água, o que contribui para o aumento da hidratação das caseínas.

Metzger *et al.* (2000) mostraram que a Mussarela feita com leite pré-acidificado com ácido acético, a pH 5,8, apresentou maior recuperação de gordura do que o queijo feito com leite sem pré-acidificação (controle). Não houve diferença na recuperação de nitrogênio para os queijos fabricados pelos dois processos. A recuperação de cálcio foi estatisticamente menor no queijo de acidificação direta, quando comparado ao controle.

PROTEÓLISE

A utilização da proteólise como índice de maturação é comumente adotada para diversos tipos de queijos, e envolve a separação, quantificação e caracterização dos compostos nitrogenados formados durante a maturação (Farkye & Fox, 1990).

Os termos extensão e profundidade de proteólise foram propostos por Bondzynski (citado por Wolfschoon-Pombo, 1983). A extensão da proteólise, ou índice de maturação, caracteriza-se pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis (NS), acumuladas durante o processo de degradação da proteína e é expressa como porcentagem do nitrogênio total (NT):

$$\text{Extensão} = \frac{\text{NS} \times 100}{\text{NT}}$$

A determinação analítica da extensão da proteólise é baseada na precipitação isoelétrica (pH 4,6) da caseína em uma amostra diluída de queijo, seguida pela quantificação do nitrogênio solúvel através do método de Kjeldahl. Segundo Le Bars *et al.* (citado por Desmazeaud & Gripon, 1977), 28% da fração solúvel em pH 4,6 é composta por peptídeos com peso molecular inferior a 3000 Daltons (Da); 50% por peptídeos com peso molecular entre 3000 e 5000 Da e 20% por peptídeos com peso molecular superior a 5000 Da.

A profundidade da proteólise abrange as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular (como aminoácidos, oligopeptídeos, aminas etc.), acumuladas durante o processo de degradação da proteína. A profundidade pode ser quantificada pelo teor de nitrogênio

não protéico (NNP), solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a concentração de 12% e expressa como porcentagem do nitrogênio total (NT).

$$\text{Profundidade} = \frac{\text{NNP} \times 100}{\text{NT}}$$

A ação enzimática do coalho estende-se por todo o período de maturação do queijo, produzindo peptídeos de alto peso molecular e eventualmente baixo peso molecular, porém sem chegar à produção de aminoácidos (Wolfschoon-Pombo, 1983). O coalho é responsável pela produção de grande parte do nitrogênio solúvel em pH 4,6 e somente por uma pequena parcela do nitrogênio solúvel em TCA 12% (Fox, 1988). O trabalho de Desmazeaud & Gripon (1977) conclui que a extensão da proteólise deve-se principalmente à ação proteolítica do coalho sobre as caseínas do queijo.

Apenas parte do coalho utilizado na coagulação do leite permanece no queijo, sendo a quantidade retida influenciada pelo tipo de coagulante, pH, temperatura de cozimento da massa e por outros parâmetros de processamento do queijo (Visser, 1993). A baixa taxa de degradação da caseína observada na Mussarela provavelmente, deve-se à alta temperatura do tratamento térmico dado à massa do queijo durante a filagem (Creamer, 1976).

O coalho apresenta um importante papel na degradação inicial da α_{s1} -caseína; esta hidrólise é influenciada pelo pH e pela concentração de NaCl do queijo. A quimosina hidrolisa prontamente a α_{s1} -caseína mas é pouco efetiva na proteólise de outras frações protéicas (Farkey & Fox, 1990). Neste processo estão envolvidos dois fatores: (1) a especificidade da enzima e (2) a acessibilidade das ligações peptídicas às enzimas. A quimosina cliva predominantemente as ligações nas quais estão presentes os aminoácidos leucina e fenilalanina. A β -caseína é muito resistente à proteólise em queijos maturados por bactérias. Embora a concentração de β -caseína na Mussarela ou nos queijos maturados por bactérias diminua ao longo do período de maturação, os β -peptídeos normalmente produzidos pelo coalho não aparecem, sugerindo que a plasmina e/ou proteases bacterianas sejam as causadoras desta degradação. Na maioria dos queijos, parte da β -caseína permanece intacta até o final da maturação (Fox, 1988).

A plasmina é a principal proteína endógena do leite. Esta enzima é uma protease alcalina termorresistente e causa significativa hidrólise da β -caseína produzindo γ -caseínas e proteoses peptonas (Grappin *et al.*, 1985).

Normalmente, grande parte da quimosina é inativada em queijos que utilizam altas temperaturas durante o processamento. A plasmina entretanto é relativamente resistente ao calor e a quebra da caseína nestes queijos parece estar associada principalmente com a atividade da plasmina (Lawrence *et al.*, 1987).

Na Mussarela devido ao curto tempo de maturação, o principal agente de cura é o coalho responsável pela proteólise primária do queijo (Creamer, 1976).

As várias frações constituintes da caseína e muitos de seus produtos obtidos durante a proteólise podem também ser observados através da eletroforese, a técnica mais utilizada para acompanhar o processo de maturação dos queijos (Fox, 1989).

A proteólise ocorre em função de quatro ou cinco agentes de cura, dependendo da variedade de queijo: (1) coagulante residual; (2) enzimas naturais do leite (plasmina); (3) fermento láctico e suas enzimas; (4) fermento secundário, por exemplo, bactérias propiônicas, leveduras, mofos e suas enzimas e (5) bactérias contaminantes, ou seja, os microrganismos que sobrevivem à pasteurização do leite ou contaminaram o leite após a pasteurização (Fox, 1988).

Proteólise em queijo Mussarela fabricado por acidificação direta

A etapa de coagulação na acidificação direta ocorre rapidamente, resultando em um coágulo pouco estruturado, devido principalmente ao maior grau de hidratação das proteínas (Paulson *et al.*, 1998).

Larsson & Andrén (1998) demonstraram que em pH próximo a 5,6, houve uma maior adsorção de coagulante às caseínas, principalmente a α_{s1} e a β -caseína, resultando em maior quantidade de coagulante retido no queijo.

A quantidade de coagulante retido no queijo varia em função das condições de processamento, sendo influenciada pela temperatura de coagulação (Dulley, 1974), temperatura de aquecimento da massa (Stadhouders & Hup, 1975), quantidade de coagulante adicionado ao leite (Visser, 1977), pH de dessoragem (Creamer, *et al.*, 1985),

etc. A parcela residual do coagulante que permanece proteoliticamente ativa é responsável pela proteólise primária do queijo. Yun *et al.* (1993) mostraram que apesar do tratamento térmico sofrido pela massa (55-60°C) durante a filagem, havia extensa proteólise durante a estocagem refrigerada do queijo e esta era atribuída ao coagulante residual.

Quarne *et al.* (1968) encontraram níveis mais elevados de proteólise em queijos Cheddar feitos por acidificação direta quando comparados com os queijos fabricados pelo processo tradicional. A proteólise mais intensa foi atribuída ao maior teor de umidade apresentado pelo queijo fabricado por acidificação direta.

FUNCIONALIDADE DE QUEIJO MUSSARELA

A produção mundial do queijo Mussarela tem experimentado crescimento extraordinário nas últimas décadas, devido principalmente ao seu grande uso como ingrediente em pizzas e alimentos congelados. Esse queijo deve possuir características funcionais como estiramento, capacidade de derretimento e pequena formação de óleo livre para ser utilizado como ingrediente culinário. As propriedades funcionais da Mussarela são desenvolvidas em duas fases distintas mas interdependentes. A primeira fase ocorre durante a fabricação, quando a estrutura básica do coágulo é estabelecida. A segunda ocorre durante a estocagem, quando a funcionalidade do coágulo é alterada (Rowney *et al.*, 1999). O queijo fresco é tipicamente firme e tem pobre derretimento. Entretanto, com uma a três semanas após a fabricação, a Mussarela torna-se macia e adquire grande capacidade de derretimento acompanhado de liberação de óleo livre; nesse estágio, o queijo apresenta-se com boas propriedades para uso em pizza.

Textura do queijo Mussarela

A matriz protéica de um queijo novo consiste principalmente em moléculas de α_{s1} -caseína ligadas por meio de interações hidrofóbicas a outras caseínas. Inicialmente, o coagulante hidrolisa a ligação Phe₂₄ e Val₂₅ da α_{s1} -caseína, levando à formação da α_{s1-I} -caseína com a quebra da matriz protéica. Esta quebra específica é responsável pela diminuição da firmeza que ocorre no estágio inicial da maturação (Creamer & Olson 1982).

Os trabalhos envolvendo o desdobramento das frações protéicas durante a maturação de queijo têm mostrado que a textura deste produto é dependente da relação

caseína intacta/umidade e do pH (Creamer & Olson 1982; Fox 1987; Lawrence *et al.*, 1987). De Jong (1976) observou que havia uma relação direta entre a firmeza e a quantidade de α_{s1} -caseína intacta. Esta hidrólise primária da caseína (α_{s1} -caseína \rightarrow α_{s1-I} -caseína) é responsável pelo desenvolvimento de maciez no queijo durante os primeiros estágios de maturação (Creamer & Olson, 1982).

Durante o armazenamento refrigerado da Mussarela, ocorrem alterações na textura e microestrutura do queijo como consequência da proteólise da α_{s1} -caseína. Tunick *et al.* (1995) observaram através de fotografias em microscópio eletrônico de varredura que os glóbulos de gordura coalesceram ao longo do período de armazenamento, e as estruturas de micelas e submicelas de caseína formaram um aglomerado único de caseína.

As características de textura dos queijos mudam significativamente durante a maturação devido a vários fatores tais como: crescimento microbiano, perda de umidade, atividade enzimática (degradação de proteína) e a difusão do sal (Cervantes *et al.*, 1983). Geralmente, se não houver perda de umidade durante a maturação o queijo sofre um amolecimento devido à hidrólise protéica (De Jong, 1976).

Métodos físicos (objetivos) para avaliar o corpo e a textura de queijos em substituição à análise sensorial (subjetiva) são bastante desejáveis. Entretanto, Green *et al.* (1985) advertem que as medidas instrumentais de textura de queijos só podem ser realizadas quando estas envolverem a fraturabilidade do produto e simularem um processo semelhante ao que ocorre durante o consumo do produto ou a sua trituração.

As maiores inovações na análise do perfil de textura surgiram com o desenvolvimento do texturômetro da General Food – o Instrom, que simulava a mastigação comprimindo duas vezes a amostra com um cilindro (Friedman *et al.*, 1963). A força necessária para comprimir a amostra era registrada em gráficos e a partir da análise das curvas obtidas, extraíam-se sete parâmetros de textura, sendo cinco deles medidos diretamente a partir das curvas e dois outros calculados a partir dos demais parâmetros. Szczesniak (1975) definiu os parâmetros de textura em:

Fraturabilidade: é a força encontrada na primeira quebra no primeiro pico;

Dureza: é o pico de força na primeira compressão;

Coesividade: é a razão entre a área da segunda compressão e a da primeira compressão;

Elasticidade: é a velocidade com que o material deformado volta à sua condição original após ser retirada a força deformante;

Adesividade: é a área da força negativa, representada pelo trabalho necessário para descolar o dispositivo de compressão da amostra;

Mastigabilidade: é o produto da dureza x coesividade x elasticidade;

Gomosidade: é o produto da dureza x coesividade.

Esses parâmetros de textura instrumentais foram correlacionados com os parâmetros sensoriais de textura obtendo-se ótimos resultados (Szczesniak *et al.*, 1963).

Bourne (1968) adaptou o Instron para fazer a análise do perfil de textura, seguindo a interpretação de Friedman *et al.*(1963), só que ao invés de medir a área total abaixo das curvas para calcular a coesividade, ele mediu a área referente somente à compressão, excluindo desta forma a porção de descompressão. Apesar de consumir muito tempo, esse teste se mostrou muito útil em pesquisas de desenvolvimento de produtos e no controle de qualidade de alimentos. Para agilizar o processo de aquisição dos dados, o Instron foi adaptado a um programa de computador que também calculava os parâmetros do perfil de textura (Bourne, 1978).

O significado desses parâmetros é:

Dureza TPA (TPA hardness): é a força necessária para atingir uma dada deformação.

Coesividade TPA (TPA cohesiveness): é a força necessária para que o dispositivo usado na compressão se descole da amostra.

Elasticidade TPA (TPA springiness): é a velocidade com que um material deformado volta à sua condição original após ser retirada a força deformante.

Adesividade TPA (TPA adhesiveness): é a quantidade de força para simular o trabalho necessário para sobrepor as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície em contato com este.

Mastigabilidade TPA (TPA chewiness): é a energia requerida para mastigar um sólido até o ponto de ser engolido.

Gomosidade TPA (TPA gumminess): é a energia requerida para se desintegrar um alimento semi-sólido a ponto de ser engolido.

É importante salientar que esses termos apresentam significados diferentes dos geralmente mencionados em reologia. Por exemplo, dureza TPA não tem o mesmo significado que dureza.

Atualmente, outro tipo de aparelho, o texturômetro, tem sido usado com mais frequência que o Instron na análise de textura de alimentos. A vantagem do texturômetro em relação ao Instron é que, por utilizar cargas menores, fornece resultados mais acurados e precisos (Bourne 1978).

Funcionalidade do queijo derretido

As várias propriedades funcionais atribuídas ao queijo Mussarela derretido são facilmente percebidas pelo consumidor. Derretimento, formação de óleo livre, elasticidade e escurecimento não enzimático são geralmente as mais importantes.

A análise do queijo aquecido é comumente usada para medir as suas propriedades funcionais para uso como ingrediente em pizza e alimentos congelados (McMahon *et al.*, 1993).

Derretimento

A Mussarela quando aquecida deve derreter uniformemente e não evidenciar partículas individuais. Rudan & Barbano (1998) sugeriram que durante o aquecimento, o queijo derrete quando sua estrutura não suporta mais seu próprio peso. Nesse caso, ele começa a deformar (derreter) e fluir pela ação da gravidade. Kindstedt (1991) definiu o derretimento como sendo a capacidade que as partículas de queijo tem de coalescerem formando uma massa de queijo uniforme.

O derretimento está diretamente ligado à mudança de fase que ocorre com o queijo quando este é submetido ao aquecimento. Como resultado da aplicação de calor, a gordura que está em estado sólido passa a líquido e as macromoléculas de proteína sofrem uma reorientação física. Ao mesmo tempo, a água do queijo começa a evaporar e algumas bolhas se entremeiam na matriz protéica. Portanto, todos os tratamentos que afetem tanto a estrutura protéica quanto à distribuição da gordura estarão aptos a influenciar o derretimento (Apostolopoulos *et al.*, 1994).

Vários fatores podem influenciar a capacidade de derretimento do queijo Mussarela como o teor de cálcio e pH da coalhada, umidade, teor de gordura do queijo, conteúdo de sal, quantidade de água livre, proteólise, etc.

Segundo Lawrence *et al.* (1987), o derretimento do queijo Mussarela é fortemente influenciado pelo pH da coalhada e o teor de fosfato de cálcio coloidal retido na coalhada. Kosikowski (1951) foi o primeiro a postular que a desmineralização da coalhada, causada pela acidificação durante a fabricação, é responsável pela propriedade de filagem. Kindstedt (1987) concluiu que a taxa de acidificação e o pH de dessoragem do soro, determinavam os níveis de cálcio e fósforo da coalhada.

No queijo Mussarela de acidificação direta um outro fator é o tipo de ácido empregado. Ácidos que são fortes quelantes do cálcio, como por exemplo o ácido cítrico, causam maior desmineralização do que ácidos menos quelantes, como o ácido acético (Keller *et al.*, 1974; Shehata *et al.*, 1966). O pH da coalhada tem importância menor do que o conteúdo de cálcio na determinação do momento de filagem, como é provado pelo maior pH de filagem usado na Mussarela de acidificação direta (5,6), comparado com o pH de filagem da Mussarela tradicional (5,2). O pH de coagulação do leite é um forte determinante da capacidade de derretimento em queijo Mussarela de acidificação direta devido ao seu efeito sobre o conteúdo de cálcio da coalhada. Keller *et al.* (1974) demonstraram que os níveis de cálcio e fósforo diminuíram com a diminuição do pH de coagulação, resultando em aumento do derretimento. A ligação de cálcio com a caseína reduz a capacidade de retenção de água e, portanto, diminui a capacidade de derretimento do queijo (Ruegg *et al.* 1980). O derretimento pode ser considerado como consequência dos efeitos combinados de teor de gordura e balanço entre interações proteína-proteína e proteína-água da matriz do queijo (McMahon & Oberg, 1998).

Na Mussarela por acidificação direta, a desmineralização da caseína traz como consequência uma maior hidratação da proteína. Esse aumento da hidratação das proteínas permite que elas fluam mais facilmente quando aquecidas, melhorando o derretimento do queijo. Tunick *et al.* (1991) mostraram que o aumento no teor de umidade da Mussarela de 47 para 52% resultou em melhoria significativa do derretimento do queijo.

Outro fator que influencia o derretimento da Mussarela é a quebra da matriz protéica que ocorre durante o armazenamento refrigerado do queijo. Yun *et al.* (1993)

encontraram um maior derretimento em queijos que apresentaram maior extensão de proteólise.

O aumento da capacidade de derretimento, com o tempo de armazenamento refrigerado, também pode ser explicado em função das mudanças no estado da água e proteína. O queijo fresco, possui baixa capacidade de derretimento. A Mussarela não maturada libera água na superfície da peça após o corte, e apresenta pouco derretimento durante os primeiros dias após a fabricação. Entretanto, com o avançar da maturação, a umidade da superfície é absorvida pelo corpo do queijo e este desenvolve bom derretimento. Inicialmente a quantidade de água ligada é relativamente pequena, como indiretamente medida pela quantidade de soro expelido, que pode atingir até 40% do conteúdo total da fase aquosa do queijo no primeiro dia após a fabricação. Após 16 dias de estocagem, essa quantidade de soro expelido é reduzida para 4% da fase aquosa do queijo (Guo & Kindstedt 1995). Os autores sugerem que, durante a maturação, a matriz protéica se intumescce e forma um gel hidratado, ocorrendo um aumento da quantidade de água ligada. Esses autores postulam que a dissociação da caseína intacta e dos minerais na fase aquosa também ocorre e pode desempenhar um papel importante no enfraquecimento da matriz protéica, resultando em aumento da capacidade de derretimento dos queijos.

A água pode existir no queijo em estado livre como pacotes de umidade, parcialmente ligada por capilaridade ou como uma cobertura mono-camada das porções hidrofílicas das moléculas no queijo. A ordem desses três estados mencionados representa um aumento na tendência para a água permanecer ligada dentro da matriz protéica do queijo (Rowney *et al.*, 1999).

O conteúdo de gordura da Mussarela é determinado pela relação caseína:gordura do leite empregado na fabricação. Geralmente, o teor de gordura em base seca varia entre 36 a 45% (Kindstedt, 1987). Quando o teor de gordura do queijo aumenta acima de 45%, o queijo torna-se excessivamente macio e o derretimento aumenta (Tunick *et al.*, 1991).

O derretimento do queijo Mussarela pode ser afetado pelo teor de sal do queijo. Kindstedt *et al.* (1992) postularam que o sódio pode, por troca iônica com o cálcio na matriz de caseína, elevar a capacidade da caseína em emulsificar a gordura, conferindo ao queijo um menor derretimento. Mais recentemente, o papel do sal na funcionalidade da Mussarela foi atribuído ao seu efeito na capacidade de ligação de água (Kindstedt & Guo,

1997). O cloreto de sódio, em fase aquosa, é capaz de causar a hidratação da matriz protéica, aumentando sua capacidade de ligação de água e solubilização da matriz protéica (Guo *et al.*, 1997). Os queijos não salgados apresentaram maior capacidade de liberação de soro e menor capacidade de derretimento. Durante a maturação, os níveis de soro expelido diminuíram mais rapidamente no queijo salgado quando comparado com o queijo não salgado (Guo *et al.*, 1997).

Comparando diferentes métodos para avaliação da capacidade de derretimento em diversos queijos, entre eles a Mussarela, Park *et al.* (1984) concluíram que os testes de Arnott (Arnott *et al.*, 1957) e o teste de Schreiber modificado por Kosikowski & Mistry (1997) produziram os resultados mais consistentes e reproduzíveis.

Óleo Livre

A separação de gordura, também conhecida como formação de óleo livre, ocorre quando a matriz de caseína se colapsa durante o aquecimento, permitindo que os glóbulos de gordura coalesçam dirigindo-se à superfície. A porcentagem de óleo livre pode ser expressa em função da porcentagem de gordura ou em relação à gordura em base seca (Tunick, 1994).

O excesso de separação de óleo livre pode ser considerado como um defeito grave na aparência do queijo derretido. Este defeito tem adquirido uma maior importância na medida em que cresce a preocupação da população com uma dieta saudável, com baixa ingestão de alimentos com elevados níveis de colesterol e gordura (Kindstedt & Rippe, 1990).

A quantidade de óleo livre formada depende da interação entre gordura e caseína. A homogeneização do leite pode virtualmente diminuir a formação de óleo livre na Mussarela, apesar desta não ter nenhum efeito sobre a caseína. Tunick (1994) encontrou menores valores de óleo livre quando trabalhou com leite homogeneizado. Quando o leite não foi homogeneizado, a formação de óleo livre foi dependente da proteólise e da porcentagem de gordura em base seca.

Com a proteólise ocorre a desagregação da matriz protéica, que funciona como uma barreira física que evita a coalescência dos glóbulos de gordura que estão próximos. Paquet & Kalab (1988) forneceram evidências de que os glóbulos de gordura próximos se

aglomeram depois do colapso da matriz de caseína durante o aquecimento da massa e filagem da Mussarela. Conseqüentemente, o enfraquecimento da matriz protéica que ocorre durante a maturação do produto está provavelmente associado à pequena capacidade desta matriz em conter fisicamente a gordura durante o aquecimento. Oberg *et al.* (1993) também associaram a separação de gordura com a proteólise, concluindo que a hidrólise da caseína resultou na quebra da estabilidade da emulsão proteína-gordura. Tunick *et al.* (1995) observaram que o aumento na separação de óleo ocorrido ao longo da estocagem da Mussarela estava relacionado com a proteólise ocorrida principalmente na α_s -1-caseína. Fotografias de microscopia eletrônica de varredura mostram que os glóbulos de gordura coalesceram e as micelas de caseína sofreram uma aglomeração durante o período de estocagem refrigerada.

O efeito do aumento da concentração do sal na diminuição do óleo livre tem sido atribuído à relação inversa entre a concentração de sal e a umidade. Com o aumento do teor de sal, ocorre aumento da perda de umidade no soro (Kindstedt, 1987). O autor concluiu que o sódio, em troca iônica com o cálcio da matriz protéica, provocou uma maior emulsificação da gordura com conseqüente diminuição do óleo livre, conforme mostra a Figura 1.

Quando o cálcio é removido da micela, as caseínas ficam mais capacitadas a emulsificar a gordura. No queijo Mussarela por acidificação direta, a maior desmineralização da caseína resulta em maior liberação de óleo livre e maior capacidade de derretimento (McMahon *et al.*, 1993).

Os testes tradicionais para medir a formação de óleo livre eram realizados com discos de queijos, submetidos a derretimento numa determinada temperatura por um dado tempo. O óleo que se separava durante o derretimento era absorvido por um papel de filtro, formando um anel cuja área era medida. Esse teste era muito demorado e não possuía boa representatividade em se tratando de peças de queijo grandes e muitas vezes apresentava alto coeficiente de variação. Objetivando ter-se resultados mais representativos, Kindstedt & Rippe (1990) propuseram uma modificação no teste de Babcock e formularam um novo método de determinação de óleo livre. Uma versão modificada do teste de Gerber para medir a quantidade de óleo liberado do queijo foi desenvolvida por Kindstedt & Fox (1991).

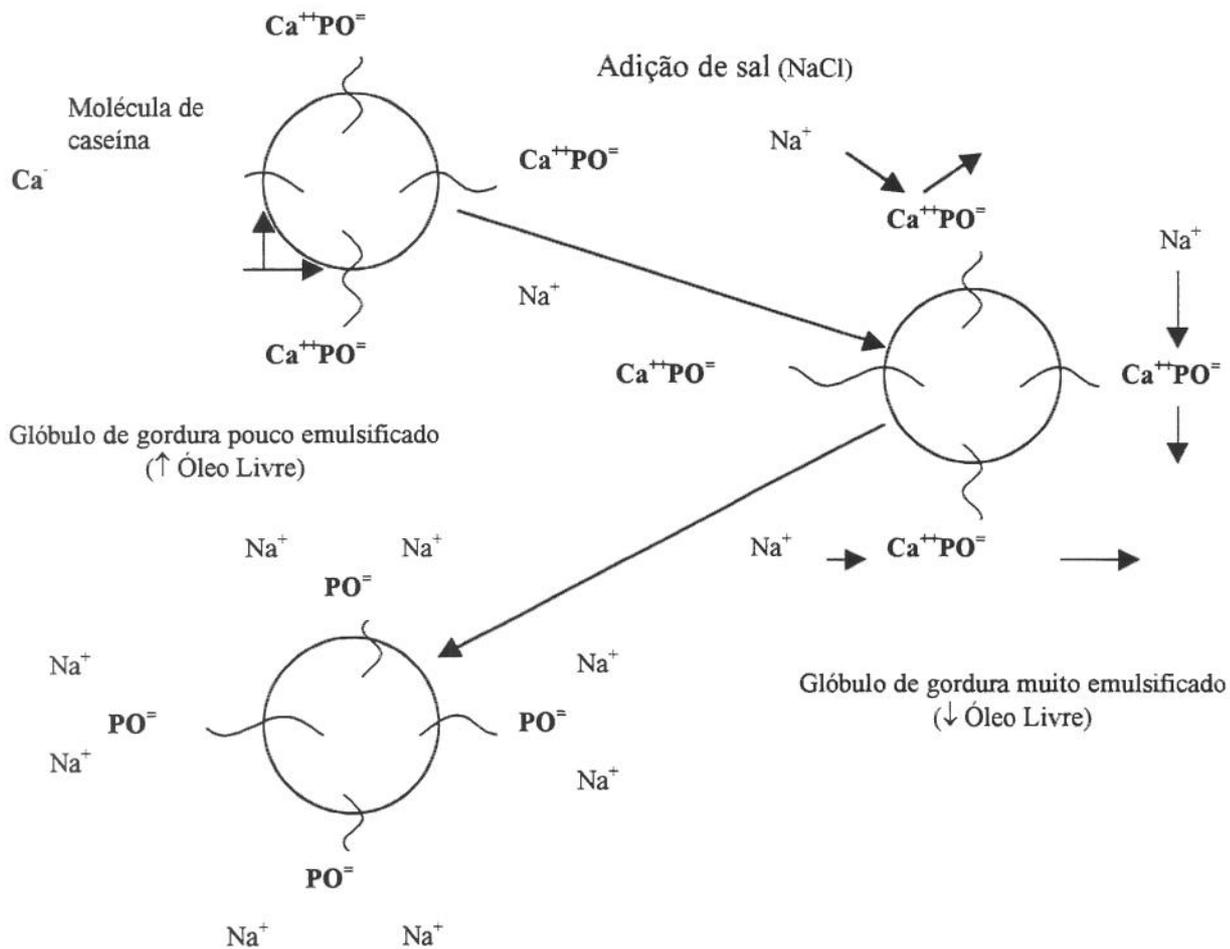


FIGURA 1. Modelo proposto para mostrar o mecanismo de ação do NaCl na formação de óleo livre em queijo Mussarela, através da troca de sódio por cálcio ligado à caseína (Kindstedt, 1987).

Escurecimento Não Enzimático (Browning)

A formação localizada de manchas escuras ou amarronzadas sobre o queijo derretido na pizza, é devido à reação de escurecimento não enzimático. O escurecimento está associado com o aquecimento do queijo e resulta primariamente da reação de Maillard, entre os resíduos de lactose ou galactose com os carbonos terminais dos aminoácidos formando glucosaminas, que através de reações do tipo de rearranjo de Amadori resultam em aldossaminas ou cetossaminas. Esses compostos, por ação do calor durante o aquecimento da pizza, formam melanoidinas, que são compostos nitrogenados de coloração marrom (Johnson & Olson, 1985).

A formação de manchas escuras é um fenômeno relativamente complexo, pois envolve vários fatores. Por outro lado, pode-se afirmar que todas as medidas de controle apontam para uma mesma direção, ou seja, a eliminação do teor de açúcar residual e a diminuição da intensidade da proteólise, visando à diminuição da disponibilidade de grupos aminas. Vários fatores podem influenciar a intensidade do escurecimento não enzimático no queijo Mussarela como tipo de fermento láctico, tipo de coagulante, temperatura de filagem, período de maturação (estabilização), teor de sal e outros (Furtado, 1996).

Na fabricação de Mussarela para pizza, os fermentos termófilos normalmente utilizados são galactose(-) e portanto, favorecem o acúmulo dos açúcares que propiciam o desenvolvimento da reação de Maillard. O nível residual de galactose é fator fundamental para o aparecimento do escurecimento não enzimático. Para minimizar a ocorrência do problema o uso de culturas Galactose positiva (Gal+), como o *Lactobacillus helveticus*, deve ser preferido. Entretanto, esse microrganismo é muito proteolítico e sua atuação pode comprometer a elasticidade da massa. Furtado (1996) sugere o uso de cultivos Gal (-), principalmente o *Streptococcus salivarius spp thermophilus*, pelas vantagens da rápida acidificação e baixa proteólise, ficando a eliminação do teor residual de açúcar por conta de outras alternativas durante as etapas de fabricação do queijo.

A utilização de coagulantes com menor atividade proteolítica pode resultar em uma menor quantidade de grupamentos aminas disponíveis como substrato, podendo minimizar a ocorrência do problema (Furtado, 1996).

A temperatura de filagem da massa pode influenciar indiretamente o aparecimento do escurecimento não enzimático, já que altas temperaturas de filagem destroem ou, no mínimo, promovem injúria celular aos microrganismos do fermento láctico, tornando-os incapazes de fermentar os açúcares, ou então realizarem a fermentação em menor velocidade. Como resultado, o acúmulo dos açúcares lactose e galactose favorecem o aparecimento do escurecimento não enzimático (Kindstedt, 1991).

Com o avançar do tempo de maturação, mais intensa é a proteólise e, conseqüentemente, maior é a degradação da caseína, resultando em acúmulo de peptídeos e aminoácidos e aumentando a possibilidade de aparecimento do escurecimento não enzimático (Furtado, 1996). A quantidade de sal também influencia indiretamente o

aparecimento do problema, na medida em que inibe a ação do fermento, favorecendo a presença de resíduos de galactose e lactose (Kindstedt, 1991).

A determinação da cor do queijo pode ser feita subjetivamente, através da comparação da sua cor com mapas de cores, ou objetivamente pelo uso de colorímetro (McMahon *et al.*, 1993; Matzdorf *et al.*, 1994).

A Mussarela fabricada por acidificação direta é menos propensa ao escurecimento porque pouca proteólise secundária ocorre na ausência de fermento láctico (Oberg *et al.*, 1991).

Elongação (stretchability)

Entende-se como sendo a capacidade do queijo derretido de esticar-se, distanciando-se da pizza quando puxada com um garfo, sendo que nesta avaliação envolvem-se ainda fatores como a resistência, ausência de rompimento do fio e a aderência à própria pizza. Queijo com boa elongação é aquele que ao se esticar, não se arrebenta e, mantém ainda uma certa aderência à superfície da pizza (Kindstedt & Guo, 1997).

Vários fatores podem influenciar a elongação da Mussarela. Um dos principais é a quantidade de caseína intacta; quanto maior for esse teor, maior será a elongação da Mussarela. Portanto, uma Mussarela com alto grau de proteólise rompe-se facilmente ao ser esticada. Queijos com alto teor de sal apresentam uma proteólise mais lenta, o que significa mais caseína intacta e, portanto, maior elongação. O teor de cálcio do queijo também influencia a elongação, que diminui com a diminuição do teor de cálcio na Mussarela (Furtado, 1996). Oberg *et al.* (1991) concluíram que a perda de elongação do queijo durante a estocagem deve ser resultado da atividade proteolítica do coagulante ou da plasmina.

A capacidade de elongação (stretchability) da Mussarela pode ser medida de duas maneiras; subjetivamente, através do teste do garfo ou, objetivamente, com o uso de viscosímetro helicoidal (Kindstedt & Kiely, 1992).

A técnica de acidificação direta em queijos tem sido usada comercialmente e com sucesso, principalmente na Itália, Estados Unidos e Índia, sendo objeto de várias patentes. São escassas as informações científicas a respeito dos efeitos da acidificação direta do leite, sobre as variáveis de processo do queijo Mussarela. A acidificação do leite com ácido, com

a conseqüente desmineralização da caseína pode permitir o uso de menores quantidades de coagulante. Entender a influência da concentração de coagulante na composição, rendimento, proteólise e propriedade funcionais da Mussarela de acidificação direta podem ajudar a uma maior compreensão dos fenômenos envolvidos e resultar em maior controle da produção de um queijo de alta qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDEO, F.; COPPOLA, S. Aspetti tecnologici e microbiologici della trasformazione del latte di bufala in Mozzarella e Ricotta. **Latte**, Millan, v.8, n.10, p.706-723, 1983.
- APOSTOLOPOULOS, C. Simple empirical and fundamental methods to determine objectively the stretchability of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.61, n.3, p.405-413, 1994.
- APOSTOLOPOULOS, C., BINES, V. E., MARSHALL, R. J. Effect of post-cheddaring manufacturing parameters on the meltability and free oil of Mozzarella cheese. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v.47, n.3, p.84-87, 1994.
- ARNOTT, D. R.; MORRIS, H. A.; COMBS, W. B. Effect of certain chemical factors on the melting quality of process cheese, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.40, n.8, p.957-962, 1957.
- BANKS, J. M.; BANKS, W.; MUIR, D. D.; WILSON, A. G. Cheese yield: composition does matter. **Dairy Industries International**, London, v.46, n.5, p.15-22, 1981.
- BARBANO, D. M.; RASMUSSEN, R. R. Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.1, p.1-12, 1992.
- BARBANO, D. M. Mozzarella cheese composition, yield and how composition control influences profitability. In: ANNUAL MARSHALL INVITATIONAL ITALIAN CHEESE, 21, 1984, Madison. **Proceedings**, p.1-13.
- BARBANO, D. M. Overview – Influence of mastitis on cheese yield. In: CHEESE YIELD AND FACTORS AFFECTING ITS CONTROL, 1993, Ireland. **Proceedings**, Idf., 324p.
- BOURNE, M. C. Texture profile of ripening pears. **Journal of Food Science**, Chicago, v.33, n.2, p.223-226, 1968.

- BOURNE, M. C. Texture profile analysis. **Food Technology**, Chicago, v.32, n.7, p.62-72, 1978.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 364 de 4 de Setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Mussarela. **Diário Oficial**, Brasília, 8 de set. de 1997.
- BREENE, W.M.; PRICE, W. V.; ERNSTROM, C. A. Manufacture of pizza cheese without starter. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.47, n.8, p.840-848, 1964.
- CERVANTES, M. A.; LUND, D. B.; OLSON, N. F. Effects of salt concentration and freezing on Mozzarella cheese texture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.66, n.2, p.204-213, 1983.
- CHAPMAN, H. R.; SHARPE, M. E. Dairy microbiology. 3rd ed. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1981. 409p.
- CORTESI, M. L.; MARANELLI, A. Fiordilatte e Mozzarella: considerazioni di ordine igienico e normativo. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, Ano 21, n.7 (196), p.528-531, 1982.
- CREAMER, L. K. Casein proteolysis in Mozzarella type cheese. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, Hamilton, v.11, n.2, p.130-131, 1976.
- CREAMER, L. K.; LAWRENCE, R. C.; GILLES, J. Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, Hamilton, v.20, n.5, p.185-203, 1985.
- CREAMER, L. K.; OLSON, N. F. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, p.631-646, 1982.
- DATAMARK CONSULTORES. **Brazil Pack'98**. Indústria Queijeira. Um segmento de extraordinário potencial para o setor de Embalagens. 13ed. São Paulo: Datamark, 1998. p.148-159.
- DE JONG, L. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 1. Proteolysis and consistency of Moordhollandse Meshanger cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v.30, p.242-253, 1976.
- DEL-PRATO, S. Italian Mozzarella. **Dairy Industries International**, London, v.58, n.4, p.26-29, 1993.
- DESMAZEAUD, M. J.; GRIPON, J. C. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. **Milchwissenschaft**, Munchen, v.32, n.12, p.731-734, 1977.

- DULLEY, J. R. The contribution of rennet and starter enzymes to proteolysis in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.29, p.65, 1974.
- EMMONS, D. B. Milk clotting enzymes. 2. Estimating cheese yield losses from proteolysis during cheese making. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.8, p.2016-2021, 1990
- ENNIS, M. P.; MULVIHILL, D. M. Compositional characteristics of rennet caseins and hydration characteristics of the caseins in a model system as indicators of performance in Mozzarella cheese analogue manufacture. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.13, n.4, p.325-337, 1999.
- FARKEY, N. Y.; FOX. P. F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.1, n.2, p.37-40, 1990.
- FERNANDEZ, A.; KOSIKOWSKI, F. V. Physical properties of direct acidified Mozzarella cheese from ultrafiltered whole milk retentates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.69, n.3, p.643-648, 1986.
- FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, n.6, p.1379-1400, 1989.
- FOX, P.F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v.10, n.6, p.522-535, 1988.
- FOX, P. F. The milk protein system. In: **Developments in dairy chemistry**. v.2. New York: Applied Science Publishers, 1985. 369p.
- FOX, P. F. Significance of salt in cheese ripening. **Dairy Industries International**, London, v.52, n.9, p.19-21, 1987.
- FRIEDMAN, H.H.; WHITNEY, J.E.; SZCZESNIAK, A.S. The texturometer – A new instrument for objective measurement. **Journal of Food Science**, Chicago, v.28, n.4, p.390-396, 1963.
- FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. 1.ed. São Paulo: Globo, 1999. 112p.
- FURTADO, M. M.; LOURENÇO-NETO, J. P. M. L. **Tecnologia de Queijos**. 1.ed. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.
- FURTADO, M. M. A practical approach to some cheese technology parameters and their effect on fermentation, cheese texture and flavor. In: CONGRESSO INTERNACIONAL

DE TECNOLOGIA EM PRODUCCION DE QUESOS, Buenos Aires. Argentina, 1996, 149p.

GRAPPIN, R.; RANK, T. C.; OLSON, N. F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, n.3, p.531-540, 1985.

GREEN, M. L.; MARSHALL, R. J.; BROOKER, B. E. Instrumental and sensory texture assessment and fracture mechanism of Cheddar and Cheshire cheese. **Journal Texture Studies**, Westport, v.16, n.4, p.351-364, 1985.

GUO, R.M.; GILMORE, J.A.; KINDSTEDT, P.S. Effect of sodium chloride on the serum phase of Mozzarella Cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, n.12, p.3092-3098, 1997.

GUO, R. M.; KINDSTEDT, P. S. Age-related changes in the phase of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.78, n.10, p.2099-2107, 1995.

JOHNSON, M. E.; OLSON, N. F. Nonenzymatic browning of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, n.12, p.3143-3147, 1985.

KELLER, B.; OLSON, N. F.; RICHARDSON, T. Mineral retention and rheological properties of Mozzarella cheese made by direct acidification. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.57, n.2, p.174-180, 1974.

KINDSTEDT, P.S. Functional properties of Mozzarella cheese on pizza: a review. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v.26, n.3, p.27-31, 1991.

KINDSTEDT, P. S. Mozzarella and pizza cheese. In: **Cheese, chemistry, physics and microbiology**. 2. ed. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1987. 516p.

KINDSTEDT, P. S.; FOX, P. F. Modified Gerber test for free oil in melted Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.56, n.4, p.1115-1116, 1991.

KINDSTEDT, P. S.; GUO, M. R. Recent developments in the science and technology of pizza cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.52, n.1, p.41-43, 1997.

KINDSTEDT, P. S.; KIELY, L. J.; GILMORE, J. A. Variation in composition and functional properties within brine-salted Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.11, p.2913-2921, 1992.

KINDSTEDT, P. S.; KIELY, L. J. Revised protocol for the analysis of melting properties of Mozzarella cheese by helical viscometry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.3, p.676-682, 1992.

- KINDSTEDT, P. S.; RIPPE, J. K. Rapid quantitative test for free oil (oiling off) in melted Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.4, p.867-873, 1990.
- KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3.ed. Westport: AVI, 1997. 728p.
- KOSIKOWSKI, F. V. The manufacture of Mozzarella cheese from pasteurized milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.34, n.7, p.641-648, 1951.
- LARSSON, K. I.; ANDRÉN, A. Affinity between chymosin and individual caseins at varying pH-values. **International Dairy Journal**, Barking, v.7, n.4, p.615-618, 1998.
- LARSON, W. A.; OLSON, N. F.; ERNSTROM, C. A.; BREENE, W. M. Curd-forming techniques for making pizza cheese by direct acidification procedures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.50, n.10, p.1711-1712, 1967.
- LAU, K. Y.; BARBANO, D. M.; RASMUSSEN, R. R. Influence of pasteurization on fat and nitrogen recoveries and Cheddar cheese yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.3, p.561-570, 1990.
- LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.70, n.8, p.1748-1760, 1987.
- MATZDORF, B.; CUPPETT, S. L.; KEELER, L.; HUTKINS, R. W. Browning of Mozzarella cheese during high temperature baking. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.10, p.2850-2853, 1994.
- McMAHON, D. J.; OBERG, C. J.; MC-MANUS, W. Functionality of mozzarella cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.48, n.2, p.99-104, 1993.
- McMAHON, D. J.; OBERG, C.J. Influence of fat, moisture and salt on functional properties of Mozzarella cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.53, n.4, p.98-101, 1998.
- METZGER, L. E.; BARBANO, D. M.; RUDAN, M. A.; KINDSTEDT, P. S. Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella Cheese. I. Composition and yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n.4, p.648-658, 2000.
- MICKETTS, R.; OLSON, N. F. Manufacture of Mozzarella cheese by direct acidification with reduced amounts of rennet and pepsin. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.57, n.3, p.273-279, 1974.



- OBERG, C. J.; McMANUS, W. R.; McMAHON, D. J. Microstructure of Mozzarella cheese during manufacture. **Food Structure**, Chicago, v.12, n.2, p.251-258, 1993.
- OBERG, C. J.; WANG, A.; MOYES, L. V.; BROWN, R. J.; RICHARDSON, G.H. Effects of proteolytic activity of termolactic cultures on physical properties of mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, n.2, p.389-397, 1991.
- OLSON, N. F. Continuous direct acidification system for producing Mozzarella cheese **Food Technology**, Chicago, v.41, n.10, p.28-31, 1971.
- PAQUET, A.; KALAB, M. Amino acid composition and structure of cheese baked as pizza ingredient in conventional and microwave ovens. **Food Microstructure**, Illinois, v.7, n.1, p.93-103, 1988.
- PARK, J.; ROSENAU, J. R.; PELEG, M. Comparison of four procedures of cheese meltability evaluation. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, n.4, p.1158-1170, 1984.
- PATEL, G. C.; UYAS, S. H.; UPADHYAY, K. G. Evaluation of Mozzarella cheese made from buffalo milk using direct acidification technique. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v.39, n.4, p.394-403, 1986.
- PAULSON, M. B.; McMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Influence of sodium chloride on appearance, functionality, and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.8, p.2053-2064, 1998.
- PEARSE, N. J.; MACKINLAY, A. G. Biochemical aspects of syneresis: A review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, n.6, p.1401-1407, 1989.
- PILCHER, S. W.; KINDSTEDT, P. S. Survey of mozzarella cheese quality at restaurant end use. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.6, p.1644-1647, 1990.
- QUARNE, E. L.; LARSON, W. A.; OLSON, N. F. Effect of acidulants and milk-clotting enzymes on yield, sensory quality, and proteolysis of pizza cheese made by direct acidification. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.51, n.2, p.848-852, 1968.
- ROWNEY, M.; ROUPAS, P.; HICKEY, M. W.; EVERETT, D.W. Factors affecting the functionality of Mozzarella cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.54, n.2, p.94-102, 1999.
- RUDAN, M. A.; BARBANO, D. M. A model of Mozzarella cheese melting and browning during pizza baking. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.8, p.2312-2319, 1998.

- RUEGG, M.; MOOR, U.; BLANC, B. Changes of the fine structure of ripening Gruyere cheese. **Milchwissenschaft**, Munchen, v.35, n.6, p.329-335, 1980.
- SHEHATA, A. E.; IUER, M.; OLSON, N. F.; RICHARDSON, T. Effect of type of acid used in direct acidification procedures on moisture, firmness, and calcium levels of cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.50, n.6, p.824-827, 1966.
- STADHOUDERS, J.; HUP, G. Factors affecting bitter flavour in Gouda cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v.29, n.4, p.335-353, 1975.
- SZCZESNIAK, A. S. General food texture profile revisited-tem years perspective. **Journal of Texture Studies**, Westport, v.6, n.1, p.5-17, 1975.
- SZCZESNIAK, A. S.; BRANDT, M. A.; FRIEDMAN, H. H. Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and sensory methods of texture evaluation. **Journal of Food Science**, Champaign, v.28, n.4, p.397-403, 1963.
- TUNICK, M. H. Calcium in dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.70, n.11, p.2429-2438, 1987.
- TUNICK, M. H. Effects of homogenization and proteolysis on free oil in Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.9, p.2487-2493, 1994.
- TUNICK, M. H.; MACKEY, K. L.; SMITH, P. W.; HOLSINGER, V. H. Effects of composition and storage on the texture of Mozzarella cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v.45, n.2, p.117-125, 1991.
- TUNICK, M. H.; MALIN, E. L.; SMITH, P. W.; HOLSINGER, V. H. Effects of skim milk homogenization on proteolysis and rheology of Mozzarella cheese. **International of Dairy Journal**, Barking, v.5, n.3, p.483-491, 1995.
- VALLE, J.L.E. Influência de parâmetros físico-químicos na fermentação e filagem do queijo Mozarela. São Paulo, 1991. 88p. **Tese** (Doutor em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- VAN HOOYDONK, A. C. M.; BOERRIGTER, I. J.; GAGEDOORN, H. G. PH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 1. Effect of acidification on physico-chemical properties. **Netherlands of Milk Dairy Journal**, Amsterdam, v.40, p.281-296, 1986.
- VAN SLYKE, L. L.; PRICE, W. W. **Cheese**. 1.ed. New York: Judd, 1952. 381p.

VISSER, F. M. W. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 3. Protein breakdown: analysis of the soluble nitrogen and amino acid nitrogen. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v.31, p.210-227, 1977.

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

WALSTRA, P.; GUERTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy Technology**. 3.ed. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1999. 458p.

WALSTRA, P.; VAN DIJK, H. J.M.; GEURTS, T. S. The syneresis of curd. 1. General considerations and literature review. **Netherlands of Milk Dairy Journal**, Amsterdam, v.39, n.4 p.209-342, 1985.

WEATHERUP, W.; MULLAN, W. M. A. Effects of low temperature storage of milk on the quality and yield of cheese. In: CHEESE YIELD AND FACTORS AFFECTING ITS CONTROL. 1993. Ireland. **Proceedings, IDF.**, 324p.

WEBER, F. **Cheesemaking science and technology**. 3. ed. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1987. 376p.

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

YUN, J. J.; KIELY, L. J.; BARBANO, D. M.; KINDSTEDT, P. S. Mozzarella cheese: Impact of cooking temperature on chemical composition, proteolysis, and functional properties. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.12, p.3664-3673, 1993.

**CAPÍTULO 2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE QUIMOSINA NO
RENDIMENTO DO QUEIJO MUSSARELA FEITO POR
ACIDIFICAÇÃO DIRETA COM ÁCIDO ACÉTICO**

TRABALHO A SER ENVIADO AO PERIODICO JOURNAL OF DAIRY SCIENCE

Influência da Concentração de Quimosina no Rendimento do Queijo Mussarela Feito por Acidificação Direta com ácido acético

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi determinar o efeito de diferentes concentrações de quimosina na recuperação de gordura e nitrogênio e no rendimento do queijo Mussarela, fabricado por acidificação direta com ácido acético. Cem litros de leite foram usados em cada tanque de queijo feito com 0,02; 0,05 e 0,10mg de quimosina/kg de leite. O coagulante usado foi a quimosina obtida por fermentação. Cada tratamento foi realizado em triplicata, resultando em 9 ensaios, que foram previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução. Modificações no método de fabricação da Mussarela por acidificação direta foram desenvolvidas para se obter um queijo de composição homogênea e constante. As modificações incluíram a padronização do teor de caseína : gordura, a coagulação e agitação da massa a 41°C, inclusão de tempo de repouso por 5 minutos logo após o corte da massa e a salga na massa em duas etapas. A composição do leite, soro, água de filagem e queijo foram determinadas. O aumento da quantidade de quimosina não influenciou a composição dos queijos. Queijos fabricados com 0,02 mg de quimosina/kg de leite apresentaram maiores perdas de gordura e nitrogênio no soro e água de filagem. As recuperações de gordura, nitrogênio e cálcio foram significativamente inferiores para os queijos fabricados com menor concentração de quimosina. Apesar do aumento da concentração de quimosina não influenciar significativamente o rendimento e a eficiência dos processos de fabricação, houve tendência de maior eficiência para queijos feitos com 0,10 mg de quimosina/kg de leite.

(Palavras-chave: Mussarela, acidificação direta, quimosina e rendimento)

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of different concentrations of chymosin on the recovery of fat and nitrogen and on the yield of Mozzarella cheese made by direct acidification with acetic acid. One hundred litres of milk were used in each vat and the cheeses were made with chymosin derived by fermentation at a rate of 0.02, 0.05 and 0.10 mg/kg of milk. Each treatment was carried out in triplicate resulting in 9 trials, which were previously randomised to determine the order of execution. Modifications in the way of preparing Mozzarella cheese by direct acidification were developed, to obtain cheese with a homogenous and constant composition. The modifications included the standardization of the ratio casein : fat, the milk coagulation and curd stirring at 41°C, the inclusion of a 5 minutes resting period immediately after cutting the curd and a two stage salting process. The composition of the milk, whey, stretching water and cheese were determined. An increase in the amount of chymosin did not influence the composition of the cheeses. Cheeses prepared with 0.02 mg chymosin/kg milk presented greater losses of fat and nitrogen in the whey and stretching water. Recovery of fat, nitrogen and calcium was significantly lower for cheeses prepared with the lowest concentration of chymosin. Despite the fact that the chymosin concentration did not significantly influence the yield and efficiency of the manufacturing process, there was a tendency for greater efficiency in the cheeses made with 0.10 mg chymosin/kg milk.

(**Key words:** Mozzarella cheese, yield, chymosin, direct acidification)

INTRODUÇÃO

A produção mundial de Mussarela vem crescendo durante as duas últimas décadas, em razão, principalmente, do desenvolvimento das redes de alimentação do tipo “fast-food” e do aumento da popularidade de pizzarias, responsáveis pela maior parte do mercado consumidor deste tipo de queijo (14).

O parâmetro mais importante que influencia decisivamente a viabilidade econômica da fabricação de queijos é o rendimento, normalmente expresso como kg queijo/100litros de leite (7).

No processo de acidificação direta, a coagulação do leite ocorre a um pH menor, resultando em maior quantidade de coagulante retido, maior velocidade das reações de hidrólise e maior remoção do fosfato de cálcio micelar que passa a integrar o cálcio solúvel. A desmineralização da micela de caseína provoca a diminuição das ligações de proteína unidas por pontes de cálcio, o que permite maior grau de hidratação das proteínas, que se traduz em aumento de rendimento dos queijos obtidos por acidificação direta (8). Portanto, o efeito da acidificação direta sobre o rendimento do queijo Mussarela, pode ser atribuído às modificações nas interações proteína-proteína, resultado do aumento da capacidade de absorção de água pela matriz protéica (25).

A concentração de quimosina usada na fabricação de queijo por acidificação direta pode modificar a natureza da microestrutura do coágulo, o que pode influenciar a retenção de gordura e nitrogênio no queijo, implicando em variações no rendimento do produto. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de diferentes concentrações de quimosina no rendimento do queijo Mussarela fabricado por adição de ácido acético.

MATERIAL E MÉTODOS

Fabricação do queijo

Para cada concentração de quimosina (0,02; 0,05 e 0,10mg/kg de leite) foram realizados ensaios em triplicata, perfazendo nove ensaios, sendo estes previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução. A metodologia empregada para a produção do queijo Mussarela por acidificação direta foi a proposta por Kosikowski & Mistry, (15) e modificada por Viotto & Oliveira (26). As modificações incluíram a padronização do teor de caseína : gordura, a coagulação e agitação da massa a 41°C, a inclusão de tempo de repouso por 5 minutos logo após o corte da massa e, a salga na massa em duas etapas. Leite cru desnatado e creme foram misturados em proporções tais que possibilitassem a obtenção de uma relação caseína : gordura de 1:1. Uma vez padronizado o leite, foi feita a pasteurização a 63°C por 30 minutos em tanque de camisa dupla (Modelo Inadal 563A, Tetra Park Inc., São Paulo, Brasil), seguido de resfriamento a 4°C e estocagem por uma noite. No dia seguinte, o leite, a 4°C, foi acidificado a pH 5,6 com solução de ácido acético

glacial a 50% (Chemco, Ind. e Com. Ltda, Campinas, SP. Brasil). Após o ajuste do pH, o leite foi aquecido a 41°C e transferido para um tanque de fabricação (Marca ICMA, Ind. e Com. Ltda, Campinas, SP. Brasil). A temperatura de 41°C foi mantida por circulação de água quente na camisa do tanque. 200 ppm de cloreto de cálcio foram adicionados ao leite. O coagulante usado foi a quimosina obtida por fermentação (Chymax, Chr. Hansen Inc., Valinhos, SP, Brasil) na quantidade de 0,02; 0,05 e 0,10 mg/kg de leite. Após o corte e agitação durante 3 minutos, deixou-se a coalhada em repouso por 5 minutos, seguindo-se então a dessora. A massa foi então cortada e agitada por 10 minutos, mantendo-se a temperatura a 41°C. Após essa etapa, foi efetuada a salga na massa (3% sal do peso da massa, p/p) em duas aplicações, agitando-se a massa para incorporação do sal durante um minuto, com 3 minutos de intervalo entre as duas aplicações. Durante a salga, a temperatura da massa foi mantida a 41°C. A filagem foi então realizada manualmente, sendo a temperatura da água de filagem 80°C e a temperatura interna média da massa, 57°C. Os queijos foram então resfriados em água gelada por 1 hora e deixados a secar por uma noite em câmara fria. No dia seguinte, os queijos foram embalados a vácuo em plástico termoencolhível e pesados. Os queijos foram numerados e depois sorteados para as análises de composição. Todo o soro e água de filagem foram homogeneizados, amostrados e pesados para efeito dos cálculos de rendimento.

Amostragem do Queijo

As amostras para as análises de composição foram preparadas da seguinte forma: de cada peça de queijo, tomada aleatoriamente, retirou-se uma fatia de mais ou menos 1cm das laterais, parte superior e inferior, que foram desprezadas. A outra parte foi cortada em cubos pequenos e triturada em multiprocessador até a obtenção de partículas de tamanho entre 2-3mm. O material assim obtido foi homogeneizado manualmente e acondicionado em frascos plásticos, sem espaço livre. As amostras foram mantidas sob refrigeração de 4-8°C até o momento das análises de composição do queijo.

Composição Química de Leite, Soro, Água de Filagem e Queijo

As mudanças de acidez titulável do leite e do soro (18), e o pH do leite, soro e queijo foram monitoradas durante o processamento (27). Os teores de gordura do leite

padronizado, soro e água de filagem foram determinados pelo método de extração etérea de Mojonnier [(1); método número 989.20]. O teste de Gerber foi usado para medir o teor de gordura no creme (11) e queijo (12). Para a padronização do teor de caseína : gordura do leite, a % de caseína foi determinada pelo método do formol, conforme Lourenço-Neto & Wolfschoon-Pombo (17), sendo realizada novamente por Kjeldahl (2). Os teores de nitrogênio total (10), nitrogênio não caséico (3) e nitrogênio não protéico [(1) método número 991.20], foram determinados pelo método de Kjeldahl. O teor de umidade do queijo foi determinado gravimetricamente em estufa de circulação forçada, a 100°C por 24h, segundo AOAC [(1); método número 925.23]. A determinação da % de cinzas foi realizada conforme AOAC [(1); método número 935.42]. O teor de sal no queijo foi determinado pelo método de Volhard (11). As porcentagens de cálcio no leite, no soro, na água de filagem e no queijo foram determinadas pelo método de digestão úmida seguida de titulação com EDTA, na presença de murexida (23). Todas as análises exceto as de umidade, cinzas e gordura do queijo, (quadruplicata), e as de nitrogênio total do queijo (triplicata), foram realizadas em duplicata.

Recuperação de Gordura, Proteína e Cálcio

Para avaliação do rendimento de queijo Mussarela feito pela técnica tradicional, a medida de recuperação de gordura e nitrogênio no soro, água de filagem e queijo é suficiente. Entretanto, em se tratando de Mussarela fabricado por acidificação direta, é fundamental saber a distribuição de cálcio nos produtos. A porcentagem de recuperação de gordura em cada produto foi calculada como o peso de cada produto multiplicado pela sua porcentagem de gordura e então dividido pelo peso total da gordura presente no leite original e multiplicado por 100. A recuperação total de gordura é a soma do peso de gordura em todos os produtos dividido pelo peso de gordura no leite usado na fabricação do queijo. A porcentagem de recuperação total de gordura não se iguala exatamente a 100%, devido a erros experimentais cumulativos, tanto na análise química de gordura quanto nas medições do peso. Entretanto, a contabilidade total de gordura deve ser próxima de 100%. Para se neutralizar as pequenas diferenças de tanque para tanque na recuperação da gordura medida, calculou-se a recuperação de gordura padronizada para 100% no soro, na água de filagem e no queijo. A recuperação de proteína total e as porcentagens padronizadas de

proteína recuperada no soro, na água de filagem e no queijo foram determinadas da mesma forma que para a recuperação de gordura. Para a recuperação de cálcio, foi também considerado o cálcio adicionado durante a fabricação sob a forma de cloreto de cálcio e, as determinações foram realizadas da mesma forma que para recuperação de gordura.

Rendimento

O rendimento dos queijos para cada tanque foi calculado dividindo-se o peso de queijo, após o resfriamento, pelo peso total de leite menos o peso das amostras retiradas até a adição do coalho. A simples comparação dos rendimentos dos queijos não tem grande significado, em virtude de que, os diferentes teores de umidade e sal tornam a comparação sem sentido. Por esse motivo, foi calculado o rendimento ajustado para umidade e sal (RAJ) para todos os queijos, como descrito por Lau *et al.* (16), considerando-se o conteúdo desejado de sal de 1,5% e umidade de 50%, como mostra a Equação (1).

$$\text{RAJ} = \frac{(\text{Rendimento}) [100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ de sal})]}{100 - (\% \text{ umidade desejada} + \% \text{ sal desejada})} \quad \text{Equação (1)}$$

O rendimento teórico (RT) dos queijos foi calculado usando a fórmula de Van Slyke modificada por Barbano (4), conforme a Equação (2), usada para Mussarela tradicional.

$$\text{RT} = \frac{[(0,85\% \text{ gordura leite}) + (\% \text{ caseína leite} - 0,1)] 1,13}{1 - (\% \text{ umidade desejada queijo} / 100)} \quad \text{Equação (2)}$$

O fator 0,85 na fórmula assume que 85% da gordura no leite será retida no queijo. A equação (2) também assume que 10% da caseína não serão recuperadas no queijo. O fator 1,13 leva em conta um fator constante para a retenção do sal adicionado e os componentes não caséicos e sólidos não gordurosos retidos na fase aquosa do queijo. A umidade desejada do queijo foi considerada como 50%. O cálculo da eficiência do rendimento do queijo foi feito pela divisão de RAJ por RT, multiplicado por 100.

Planejamento Experimental e Análise Estatística

Para avaliar o efeito da concentração de coagulante (A) no rendimento, foi aplicado um plano completamente aleatorizado. Os níveis de coagulante utilizados foram 0,02; 0,05 e 0,10mg/kg de leite, com três repetições para cada tratamento. Os resultados obtidos foram analisados através de Análise de Variância, utilizando-se o teste de Duncan para verificar diferenças entre as médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição do Leite

A Tabela 1 mostra a composição do leite utilizado. Não houve diferença significativa na composição química do leite utilizado na elaboração dos queijos Mussarela por acidificação direta. Portanto, eventuais diferenças no rendimento dos queijos deverão ser atribuídas às diferentes concentrações do coagulante empregado.

Tabela 1. Composição média (n=3) do leite utilizado na produção de queijo Mussarela por acidificação direta com três diferentes concentrações de quimosina¹ obtida por fermentação.

Componentes	Concentração de quimosina (mg/kg de leite)		
	0,02	0,05	0,10
Sólidos Totais, %	11,344	11,101	11,026
Gordura, %	2,316	2,362	2,86
Proteína Total, % (N x 6,38)	3,161	3,158	3,149
Caseína, %	2,411	2,398	2,398
C/G ² , %	1,04	1,01	1,00
C/P ³ , %	0,76	0,76	0,76
NNP ⁴ , %	0,027	0,027	0,026
Cálcio, %	0,141	0,139	0,142
pH	6,78	6,72	6,73

^{a,b,c} Numa mesma linha, médias com letras em comum não diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

¹ Chymax®, Chr. Hansen®. ² Caseína/Gordura. ³ Caseína/Proteína. ⁴ Nitrogênio não protéico.

Fabricação do Queijo

Os valores médios do pH da dessoragem e de salga foram, respectivamente, $5,66 \pm 0,03$ e $5,64 \pm 0,03$, não havendo diferenças estatísticas para as diversas concentrações de quimosina. As temperaturas médias de coagulação do leite e filagem da massa foram, respectivamente, $41^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ e $57,3^{\circ}\text{C} \pm 0,2$, não ocorrendo diferenças significativas entre as médias para as várias concentrações de quimosina empregadas.

O intervalo de tempo decorrido entre as etapas do processamento e o tempo total de fabricação do queijo Mussarela, feito pela técnica de acidificação direta, é apresentado na Tabela 2. O intervalo de tempo entre a adição do coagulante até início do corte diminuiu significativamente ($p=0,0368$) com o aumento da concentração de quimosina. Isso pode ser explicado pelo fato de que a maior concentração de quimosina acelerou a etapa enzimática de coagulação do leite.

Segundo Dalgleish & Law (6), a liberação do fosfato de cálcio coloidal produz um aumento da concentração de Ca^{++} , o que seria uma das causas para as mudanças observadas nas propriedades de coagulação. Isto sugere que a adição de cloreto de cálcio ao leite acidificado, como realizado em nosso procedimento, não seria justificável. Entretanto, Gastaldi *et al.* (9) mostraram que para o mesmo pH, a quantidade de cálcio que permaneceu ligado à caseína foi maior no leite enriquecido com cálcio. Segundo Pires *et al.* (21), o cálcio ligado que pode ser solubilizado pela acidificação não é suficiente para produzir mudanças significativas na concentração de Ca^{++} . Na presença de quantidades suficientes de íons hidrogênio e coagulante, a hidrólise da κ -caseína e a velocidade de agregação foram aumentadas pela adição de cálcio. A suplementação de cálcio leva a uma manutenção da estrutura micelar e à obtenção de uma coalhada que dessora com maior facilidade. Isso está de acordo com os nossos experimentos, como mostram os dados da Tabela 2 e as nossas observações em relação à facilidade de dessoragem e estrutura da coalhada formada.

O tempo decorrido da dessoragem até o início da filagem e o tempo total foram maiores quando a concentração de quimosina foi menor. A menor concentração de quimosina resultou em um gel menos firme, uma coalhada mais frágil, uma sinérese mais lenta, dificultando o manuseio da massa e, conseqüentemente, aumentando o tempo de fabricação.

Tabela 2. Tempo médio (n=3) de fabricação do queijo Mussarela feito por acidificação direta com três diferentes concentrações de quimosina¹ obtida por fermentação.

Intervalo de tempo entre as etapas do processamento (minutos)	Concentração de quimosina ¹ (mg/kg)		
	0,02	0,05	0,10
Adição do coagulante – Ponto de Corte	15 ^a	10 ^b	6 ^c
Dessoragem - Início da filagem	42 ^a	36 ^b	35 ^b
Total (acidificação do leite até início da filagem)	73 ^a	64 ^b	62 ^b

^{a,b,c} Numa mesma linha, médias com letras em comum não diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

¹ Chymax®, Chr. Hansen®.

Composição do Soro e Água de Filagem

A Tabela 3 mostra a composição do soro e água de filagem da Mussarela feita por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina. A menor concentração do coagulante (0,02 mg quimosina/kg leite) resultou em maior teor de sólidos totais ($p=0,047$) e gordura ($p=0,033$) no soro. Não houve diferença significativa no teor de sólidos e gordura dos soros obtidos com o uso de 0,05 e 0,10 mg quimosina/kg de leite. Isso parece indicar que a concentração de 0,02 mg quimosina/kg leite foi insuficiente para promover uma hidrólise eficaz da κ -caseína e assim, promover as condições necessárias para a formação de uma rede protéica capaz de aprisionar eficazmente a gordura. Houve um aumento da perda de nitrogênio no soro ($p=0,0402$) com a diminuição da concentração de quimosina. Isso parece reforçar a hipótese de formação de uma rede protéica mais frouxa, uma estrutura mais grosseira e porosa com a diminuição da concentração de coagulante, facilitando a perda de finos de caseína no soro.

A menor quantidade de coagulante resultou em maior teor de sólidos totais ($p=0,0145$), gordura ($p=0,0178$) e nitrogênio ($p=0,0091$) na água de filagem, o que parece confirmar que a concentração de quimosina de 0,02 mg/kg de leite resultou em estrutura do queijo mais frágil e porosa quando comparada a concentrações de coagulante mais elevadas. Entretanto, deve ser ressaltado que, apesar das diferenças resultantes da variação

na concentração de coagulante, as perdas de gordura e nitrogênio são bastante similares às obtidas pelo processo tradicional de fabricação de Mussarela com cultura láctica, indicando que o procedimento utilizado na fabricação de Mussarela por acidificação direta foi bastante satisfatório. A diferença na concentração de quimosina não influenciou significativamente os teores de cálcio e sal na água de filagem.

Tabela 3. Composição média (n=3) do soro e água de filagem obtido do queijo Mussarela por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina¹ produzida por fermentação.

Componentes	Concentração de quimosina (mg/kg de leite)		
	0,02	0,05	0,10
Soro			
Sólidos Totais, %	7,679 ^a	6,959 ^b	6,829 ^b
Gordura, %	0,413 ^a	0,348 ^b	0,318 ^b
Proteína, % (N x 6,38)	0,805 ^a	0,745 ^b	0,669 ^c
Cálcio, %	0,079	0,077	0,076
pH	5,62	5,71	5,71
Água de Filagem			
Sólidos Totais, %	1,492 ^a	1,445 ^b	1,408 ^b
Gordura, %	0,298 ^a	0,253 ^b	0,246 ^b
Proteína, % (N x 6,38)	0,066 ^a	0,064 ^a	0,053 ^b
Cálcio, %	0,039	0,037	0,036
Sal, %	0,720	0,704	0,709

^{a,b,c} Numa mesma linha, médias com letras em comum não diferem significativamente, (p<0,05) entre si.

¹ Chymax®, Chr. Hansen®.

Composição do Queijo

A composição dos queijos feitos com diferentes concentrações de quimosina é apresentada na Tabela 4. A Mussarela obtida pode ser classificada, segundo a legislação americana como de baixa umidade (45%<U≤52%) e parcialmente desnatada (30%≤GBS<45%) (13). Segundo a legislação brasileira para o Mercosul, a Mussarela obtida nesse trabalho enquadra-se na categoria de queijo semigordo (25%≤GBS≤44,9%) e como um

queijo de alta umidade ($46\% \leq U \leq 54,9\%$) (5). A variação na concentração de quimosina não influenciou a composição dos queijos. Micketts & Olson (20) testaram várias concentrações de coalho bovino para produzir queijo Mussarela com ácido clorídrico e também não encontraram diferenças significativas nos conteúdos de umidade, gordura e sólidos não gordurosos dos queijos.

Tabela 4. Composição média (n=3) do queijo Mussarela produzido por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina¹ obtida por fermentação.

Componentes	Concentração de quimosina (mg/kg de leite)		
	0,02	0,05	0,10
pH	5,62	5,59	5,62
Umidade, %	49,83	50,66	50,03
Gordura, %	20,2	20,3	20,8
GBS ² , %	40,34	41,22	41,62
Proteína, % (N x 6,38)	23,26	22,36	24,29
Cálcio, %	0,685	0,708	0,703
Sal, %	1,594	1,503	1,499
Cinzas, %	2,960	3,004	2,987
Sal/Umidade, %	3,19	2,96	2,99
Cálcio/Proteína, %	2,94	3,16	2,89

^{a,b,c} Numa mesma linha, médias com letras em comum não diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

¹ Chymax®, Chr. Hansen®.

² Gordura em Base Seca.

Recuperação de Gordura, Nitrogênio e Cálcio

A Tabela 5 mostra as porcentagens de recuperação de gordura, nitrogênio e cálcio no soro, na água de filagem e no queijo para as diferentes concentrações de quimosina. Houve menor recuperação de gordura em queijos feitos com a menor concentração (0,02 mg/kg de leite) de quimosina ($p=0,048$), havendo maior recuperação de gordura no soro ($p=0,045$) e na água de filagem ($p=0,039$) para essa concentração de quimosina. Quando se compara a recuperação de gordura no soro e na água de filagem, foi perceptível que as

maiores perdas de gordura ocorreram no soro, como reflexo de um coágulo pouco estruturado.

Os valores de recuperação da gordura no queijo Mussarela feito por acidificação direta foram levemente inferiores aos citados na literatura (22), para o queijo Mussarela tradicional.

Tabela 5. Recuperação padronizada de gordura, nitrogênio e cálcio (n=3) em soro, água de filagem e queijo Mussarela feito por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina¹ obtida por fermentação.

	Concentração de quimosina (mg/kg de leite)		
	0,02	0,05	0,10
Recuperação de gordura			
Soro (%)	15,532 ^a	12,534 ^b	12,383 ^b
Água de filagem (%)	3,088 ^a	2,619 ^b	2,797 ^b
Queijo (%)	81,380 ^b	84,848 ^a	84,820 ^a
Recuperação de nitrogênio			
Soro (%)	24,242 ^a	21,881 ^b	20,740 ^b
Água de filagem (%)	0,554 ^a	0,537 ^{ab}	0,482 ^b
Queijo (%)	75,233 ^b	77,532 ^{ab}	79,124 ^a
Recuperação de Cálcio			
Soro (%)	48,343 ^a	47,504 ^a	45,035 ^b
Água de filagem (%)	6,690	6,564	6,302
Queijo (%)	44,967 ^b	45,932 ^b	48,663 ^a

^{a,b,c} Numa mesma linha, médias com letras em comum não diferem significativamente (p<0,05) entre si.

¹ Chymax®, Chr. Hansen®.

A recuperação de nitrogênio foi maior no soro (p=0,042) e na água de filagem (p=0,038) quando a menor concentração de quimosina foi usada, e maior no queijo (p=0,047), com a maior concentração de quimosina. A adição de ácido em substituição ao fermento láctico e, conseqüentemente, a maior velocidade de acidificação do leite traz como conseqüência a formação de um gel mais grosseiro e poroso. Além disso, a pré-acidificação do leite até o pH 5,6 antes da coagulação provoca a desmineralização da

micela de caseína, resultando em ligações mais fracas que podem afetar a estrutura do gel formado (24). A adição de ácido ao leite à baixa temperatura antes da coagulação resulta também em solubilização da caseína (6), o que pode explicar a maior recuperação de nitrogênio no soro quando comparado ao queijo Mussarela feito pelo processo tradicional. Metzger *et al.* (19) encontraram valores ligeiramente menores de nitrogênio no soro de queijo Mussarela feito com fermento.

As maiores recuperações de cálcio no soro para as concentrações de 0,02 e 0,05 mg quimosina/kg de leite podem ser atribuídas ao maior tempo de contato da coalhada com o ácido para esses tratamentos, conforme mostra a Tabela 2, resultando assim em uma maior remoção do fosfato de cálcio micelar ou coloidal. Metzger *et al.* (19) encontraram valores de recuperação de cálcio no soro ligeiramente superiores a esses quando trabalharam com Mussarela por acidificação direta a pH 5,8 com ácido acético. A diferença na concentração de coagulante não influenciou a recuperação de cálcio na água de filagem ($p>0,05$).

Como pode ser observado na Tabela 5, o uso de 0,05 e 0,10mg de quimosina/kg de leite resultaram em queijos com recuperações de gordura e nitrogênio maiores do que as verificadas para queijos fabricados com 0,02 mg/kg. Aparentemente, mesmo reduzindo a concentração de quimosina para 0,05 mg/kg de leite, o coágulo resultante foi capaz de manter a gordura aprisionada. Isso indica ser possível economizar pelo menos 50% de quimosina em relação à concentração normalmente utilizada de 0,10mg/kg de leite, sem que haja maiores perdas de gordura e nitrogênio no soro e água de filagem.

Rendimento

Os rendimentos e a eficiência da produção de queijo Mussarela elaborado pela técnica de acidificação direta com diferentes concentrações de coagulante são mostrados na Tabela 6. Diferenças nas concentrações de coagulante não influenciaram significativamente o rendimento de fabricação ($p=0,085$) e a eficiência do processo ($p=0,065$), o que torna vantajoso economicamente o uso de pequena quantidade de coagulante em razão da redução de custos com o ingrediente, sem afetar o rendimento de fabricação. Houve uma leve tendência de aumento no rendimento e na eficiência do processo com o aumento da concentração de coagulante, apesar dessas diferenças não serem estatisticamente significativas. Entretanto, essa tendência é consistente com a maior recuperação de gordura,

nitrogênio e cálcio dos queijos fabricados com a concentração mais elevada de quimosina. Outros experimentos com maior número de repetições para cada tratamento seriam necessários para verificar a tendência observada, já que pequenas mudanças no rendimento são difíceis de serem detectadas estatisticamente com pequeno número de experimentos.

Tabela 6. Rendimento real, rendimento ajustado, rendimento teórico e eficiência (n=3) em queijo Mussarela feito por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina¹ obtida por fermentação.

Rendimento	Concentração de quimosina (mg/kg de leite)		
	0,02	0,05	0,10
Real	9,283	9,464	9,650
Ajustado	9,297	9,334	9,644
Teórico	9,673	9,715	9,772
Eficiência	96,11	96,12	98,70

^{a,b,c} Numa mesma linha, médias com letras em comum não diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

¹ Chymax®, Chr. Hansen®.

CONCLUSÕES

É possível reduzir a quantidade de coagulante para até 0,02 mg/kg de leite na fabricação de queijo Mussarela por acidificação direta, sem mudança significativa no rendimento e eficiência do processo. Entretanto, as recuperações de gordura, proteína e cálcio no queijo foram significativamente menores quando a quantidade de quimosina usada foi a de 0,02 mg/kg. Para todos os queijos, as recuperações de gordura, proteína e cálcio foram significativamente maiores no soro do que na água de filagem mostrando que, em queijos fabricados por acidificação direta, a etapa de coagulação é de vital importância quando se objetiva alcançar rendimentos satisfatórios.

REFERÊNCIAS

1. Association of Official Analytical Chemists, International. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. AOAC, Arlington, VA.

2. Barbano, D. M., Lynch, J. M., Fleming, J. R. 1991. Direct and indirect determination of true protein content of milk by Kjeldahl analysis: collaborative study. *J. AOAC* 74: p.281-288
3. Barbano, D.M., Yun, J.J., Kindstedt, P.S. 1994. Mozzarella cheese making by a stirred curd, no brine procedure. *J. Dairy Sci.* 77:2687-2694.
4. Barbano, D.M., Chu, K.Y., Yun, J.J., Kindstedt, P.S. 1993. Contributions of coagulant, starter and milk enzymes to proteolysis and browning in Mozzarella cheese. Pages 41-50 in *Proc. of the 30th Annual Marshall Italian Cheese Seminar*. Madison.
5. Brasil, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 1997. Portaria nº 364 de 4 de set. de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Mussarela. *Diário Oficial*, Brasília.
6. Dalgleish, D.G., Law, A.J.R. 1989. pH Induced dissociation of bovine micelles I. Analysis of liberated caseins. *J. Dairy Res.* 55:529-538.
7. Emmons, D. B. 1991. Definition and Expression of cheese yield. In: *Factors affecting the yield of cheese.* – IDF Special Issue. 9301, 12-20,
8. Fernandez, A; Kosikowski, F.V. 1986. Physical properties of direct acidified Mozzarella cheese from ultrafiltered whole milk retentates. *J. Dairy Sci.* 69:643-648.
9. Gastaldi, E., Pelegrini, A., Lagaude, A.J., Tarodo De La Fuente. B. 1994. Functions of added calcium in acid milk coagulation. *J. Food Sci.* 59:310-312.
10. International Dairy Federation. 1962. Determination of the total nitrogen content of milk by the Kjeldahl method. *IDF-FIL.* 20A:1-3.
11. International Dairy Federation. 1979. Determination of the total solids content of cheese and processed cheese. *IDF-FIL.* 88:1-3.
12. Instituto Adolfo Lutz. 1985. Normas Analíticas do IAL. D.B. Rebocho Ed. São Paulo-SP, 371p.
13. Kindstedt, P.S. 1987. Mozzarella and Pizza cheese. In: Fox, P.F. *Cheese Chemistry, Physics, and Microbiology*. New York: Elsevier Applied Science. 2:337-361.
14. Kindstedt, P.S. 1991. Functional properties of Mozzarella cheese on pizza: a review. *Cult. Dairy Prod. J.* 26:27-31.

15. Kosikowski, F.V., Mistry, V.V. 1997. Cheese and Fermented Milk Foods. 3^a ed. AVI Publishing Company, Westport.
16. Lau, K.Y., Barbano, D.M., Rasmussen, R.R. 1990. Influence of pasteurization on fat and nitrogen recoveries and Cheddar cheese yield. *J. Dairy Sci.* 73:561-570.
17. Lourenço, J.P.M., Wolfschoon-Pombo, A.F. 1982. Exatidão da determinação volumétrica de caseína no leite. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes.* 37:9-12.
18. Marshall, R.T. 1992. Chemical and physical methods. Pages 433-529 in *Standard Methods for the Examination of Dairy Products.* (16^a ed.). American Public Health Association, Washington, DC.
19. Metzger, L.E., Barbano, D.M., Rudan, M.A., Kindstedt, P.S. 2000. Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella Cheese. I. Composition and yield. *J. Dairy Sci.* 83:648-658.
20. Micketts, R., Olson, N.F. 1974. Manufacture of Mozzarella cheese by direct acidification with reduced amounts of rennet and pepsin. *J. Dairy Sci.* 57:273-279.
21. Pires, M.S., Orellana, G.A., Gatti, C.A. 1999. Rennet coagulation of casein micelles action of Ca²⁺ and pH. *Food Hydrocolloids*, 13:235-238.
22. Quarne, E.L.; Larson, W.A.; Olson, N.F. 1968. Effect of acidulants and milk-clotting enzymes on yield, sensory quality, and proteolysis of pizza cheese made by direct acidification. *J. Dairy Sci.* 51:848-852.
23. Taras, M. J. 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* American Public Health Association. Washington, DC.
24. Walstra, P. 1990. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73:1965-1979.
25. van Hooydonk, A.C.M., Boerrigter, I.J., Hagedoorn, H.G. 1986. pH induced physico-chemical changes of caseins micelles in milk and their effect on renneting. 2. Effect of pH on renneting of milk. *Neth. Milk Dairy J.* 40:297-313.
26. Viotto, W.H., Oliveira, A.N. 1998. Produção de mussarela por acidificação direta usando pequena quantidade de coagulante. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes.* 53:44-52.
27. Yun, J.J., Kiely, L.J., Barbano, D.M., Kindstedt, P.S. 1993. Mozzarella cheese: Impact of cooking temperature on chemical composition, proteolysis, and functional properties. *J. Dairy Sci.* 76:3664-3673.

**CAPÍTULO 3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE QUIMOSINA NA
COMPOSIÇÃO E PROTEÓLISE DO QUEIJO MUSSARELA
FABRICADO POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA COM ÁCIDO
ACÉTICO**

TRABALHO A SER ENVIADO À REVISTA MILCHWISSENSCHAFT

Influência da concentração de quimosina na composição e proteólise do queijo Mussarela fabricado por acidificação direta com ácido acético

RESUMO

Queijo Mussarela foi produzido por adição de ácido acético usando três concentrações de coagulante (0,02; 0,05 e 0,10 mg de quimosina obtida por fermentação/kg de leite). Cada tratamento foi realizado em triplicata. Um fluxograma modificado de fabricação do queijo por acidificação direta foi empregado para se obter um produto final de composição constante. As modificações incluíram a padronização do teor de caseína : gordura, a coagulação e agitação da massa a 41°C e a salga na massa. Os queijos foram analisados após 5, 12, 19, 26 e 33 dias de armazenagem refrigerada a 4°C. Como esperado, não foram detectadas diferenças significativas no pH ($p < 0,06$), acidez titulável ($p < 0,08$) e no teor de nitrogênio solúvel a 12% ácido tricloroacético (TCA) ($p < 0,08$) para as diferentes concentrações de coagulante. O teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 foi significativamente menor para os queijos feitos com menor quantidade de coagulante, provavelmente em função do menor teor de coagulante retido no queijo. Para todos os queijos, houve aumento da extensão e intensidade da proteólise com o aumento do tempo de armazenagem refrigerado. A eletroforese mostrou que a quantidade de α_{s1} -caseína diminuiu com o tempo de estocagem refrigerada para todos os tratamentos, mas a extensão de proteólise foi maior para os queijos feitos com maior concentração de coagulante. O teor de β -caseína permaneceu constante durante o tempo de estocagem refrigerada.

Queijo Mussarela acidificação direta (avaliação de proteólise)

ABSTRACT

Mozzarella cheese was produced by the addition of acetic acid using three different concentrations of coagulant, [0.02, 0.05 and 0.10 mg chymosin derived by fermentation, per kg of milk]. Each treatment was carried out in triplicate. A modified flow diagram was used for the preparation of the cheese by direct acidification, to obtain a final product with a constant composition. The modifications included the standardization of the casein : fat

ratio, coagulation and stirring of the batch at 41°C and salting of the batch. The cheeses were analysed after 5, 12, 19, 26 and 33 days of refrigerated storage at 4°C. As expected, no significant differences were detected in the pH ($p < 0.06$), titratable acidity ($p < 0.08$) and the content of nitrogen soluble in 12% trichloroacetic acid (TCA) ($p < 0.08$) for the different concentrations of coagulant. The increase in the level of nitrogen soluble at pH 4.6 was significantly lower in cheeses made with a lower concentration of chymosin, probably as a function of a lower residual activity of the coagulant retained by the cheese. Electrophoresis showed that the amount of α_{s1} -casein decreased with time of refrigerated storage for all treatments, but the extent of proteolysis was greater in cheeses made with the highest concentration of coagulant. The level of β -casein remained constant throughout the whole period of refrigerated storage.

Directly acidified Mozzarella cheese (evaluation of proteolysis)

1. Introdução

A acidificação direta vem sendo utilizada na fabricação de Mussarela, substituindo de forma total ou parcial a acidificação oriunda do fermento láctico. A pré-acidificação do leite aumenta a velocidade da reação enzimática de coagulação, possibilitando a redução da quantidade de coagulante empregado, pois com o pH mais próximo do ótimo, a ação da quimosina é acelerada, traduzindo-se em economia tanto pela redução de gastos com ingredientes (coagulante e fermento láctico) como pelo aumento da capacidade instalada das fábricas de queijos (1).

A etapa de coagulação na acidificação direta ocorre rapidamente, resultando em um coágulo mais frágil (poroso), devido principalmente à desmineralização da micela de caseína causada pela pré-acidificação do leite, o que reduz as ligações cruzadas entre os polímeros de caseína (2).

O coagulante usado na fabricação dos queijos tem dupla função: a primeira é coagular o leite, e a segunda, é que pequena parcela residual de coagulante permanece proteoliticamente ativa no queijo, sendo responsável pela proteólise primária durante a estocagem e maturação (3). Vários estudos (4, 5, 6) têm relatado a relação direta entre a

quantidade de quimosina adicionada ao leite, a concentração e a quantidade de quimosina ativa no queijo. Além disso, a taxa de proteólise em queijo, durante o armazenamento refrigerado, tem sido diretamente relacionada com a concentração residual de quimosina (4, 5).

A quantidade de coagulante retida no queijo depende das condições de fabricação e a atividade proteolítica residual depende da sua sensibilidade ao calor e ao pH, estando os dois fatores diretamente relacionados à quantidade adicionada ao leite. Assim, a quantidade de quimosina com atividade proteolítica residual no queijo aumenta com a diminuição do pH e da intensidade do tratamento térmico (5, 7), e com o aumento da velocidade de acidificação do leite (8). Uma maior quantidade de quimosina é adsorvida às caseínas, principalmente α_{s1} e β -caseína, quando o pH de coagulação do leite está próximo a 5,6, resultando em maior quantidade de coagulante retido (9). Portanto, em queijos feitos por acidificação direta, o baixo pH inicial do leite, a maior velocidade de acidificação e a maior estabilidade da quimosina a pH ácido (10) devem promover maior retenção de quimosina, em comparação com queijos elaborados com fermento láctico. É provável que seja possível reduzir a quantidade de coagulante consideravelmente abaixo do convencionalmente utilizado sem modificar o processo de fabricação. Entretanto, os efeitos do uso de menores quantidades de quimosina na composição e proteólise do queijo Mussarela feito por acidificação direta não são claros. O objetivo deste trabalho foi determinar a influência do uso de diferentes concentrações de quimosina obtida por fermentação na composição e proteólise do queijo Mussarela feito por acidificação direta com ácido acético.

2. Material e métodos

2.1 Fabricação do queijo

Para cada concentração de quimosina (0,02; 0,05; e 0,10 mg/kg de leite), representando, respectivamente, 20%, 50% e 100% da quantidade normalmente usada na coagulação do leite, foram realizados ensaios em triplicata, perfazendo nove ensaios, sendo estes previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução. A metodologia empregada para a produção do queijo Mussarela por acidificação direta foi a proposta por

KOSIKOWSKI & MISTRY (11) e modificada por VIOTTO & OLIVEIRA (12). As modificações incluíram a padronização do teor de caseína: gordura, a coagulação e agitação da massa a 41°C, a inclusão de tempo de repouso por 5 minutos logo após o corte da massa e, a salga na massa em duas etapas. Leite cru desnatado e creme foram misturados em proporções adequadas para a obtenção de uma relação caseína: gordura de 1:1. O leite, padronizado foi pasteurizado a 63°C por 30 minutos em tanque de camisa dupla (Modelo Inadal 563A®), resfriado a 4°C e estocado por uma noite. No dia seguinte, o leite, a 4°C, foi acidificado a pH 5,6 com solução de ácido acético glacial a 50% (Chemco®). Após o ajuste do pH, o leite foi aquecido a 41°C e transferido para um tanque de fabricação (Marca ICMA®). A temperatura de 41°C foi mantida por circulação de água quente na camisa do tanque. 200 ppm de cloreto de cálcio (Merck®) foram adicionados ao leite. O coagulante usado foi a quimosina obtida por fermentação (Chymax®, Chr. Hansen). Após o corte e agitação durante 3 minutos, deixou-se a coalhada em repouso por 5 minutos, findo os quais iniciou-se a dessoragem. A massa foi então cortada e agitada por 10 minutos, mantendo-se a temperatura a 41°C. A salga foi efetuada na massa (3% sal do peso da massa, p/p) em duas aplicações, agitando-se durante um minuto para incorporação do sal, com 3 minutos de intervalo entre as duas aplicações. Durante a salga, a temperatura da massa foi mantida a 41°C. A filagem foi então realizada manualmente, sendo a temperatura da água de filagem 80°C e a temperatura interna média da massa, 57°C. O queijo foi resfriado em água gelada por 1 hora, tendo permanecido em prateleira durante a noite para secagem e, no dia seguinte, embalado a vácuo. Os queijos foram numerados e depois sorteados para as análises de composição e proteólise.

2.2 Preparo de amostras

De cada peça de queijo, tomada aleatoriamente, retirou-se uma fatia de mais ou menos 1cm das laterais, parte superior e inferior, que foram desprezadas. A outra parte foi cortada em cubos pequenos e triturada em multiprocessador até a obtenção de partículas de tamanho entre 2-3mm. O material assim obtido foi homogeneizado manualmente e acondicionado em frascos plásticos, sem espaço livre. As amostras foram mantidas sob refrigeração (4-8°C) até o momento das análises de composição dos queijos. No 5º, 12º,

19^o, 26^o e 33^o dia de estocagem refrigerada, os queijos previamente sorteados foram submetidos ao mesmo procedimento de amostragem e preparação para as análises de avaliação da proteólise (pH, acidez e NS em pH 4,6 e 12% TCA).

2.3 Análises de composição

Os teores de umidade e de cinzas dos queijos foram determinados, respectivamente, segundo os métodos 925.23 e 935.42, da AOAC (13). O teste de Gerber foi usado para medir o teor de gordura do queijo (14). O teor de sal no queijo foi determinado pelo método de Volhard (15). Os teores de nitrogênio total (16), nitrogênio não caseíco (17) e nitrogênio não protéico (13) foram determinados pelo método de Kjeldahl. A porcentagem de cálcio no queijo foi determinada pelo método de digestão úmida, seguida de titulação com EDTA, na presença de murexida (18). Todas as análises químicas, exceto as de umidade e gordura do queijo (quadruplicata), e as de nitrogênio total do queijo (triplicata), foram realizadas em duplicata.

2.4. pH e Acidez Titulável

O pH dos queijos foi determinado em triplicata, através de método potenciométrico (13), utilizando-se pHâmetro Micronal, Modelo B375®. A determinação de acidez dos queijos foi realizada em triplicata, conforme RICHARDSON (15). Foram tomados 10g da amostra previamente homogeneizada por 35 segundos em liquidificador com 95ml de água destilada a 60°C, para extração do ácido láctico. Em seguida o material foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1 e, a partir do filtrado, determinou-se a acidez por titulação com NaOH 0,1N, sendo o resultado expresso em porcentagem de ácido láctico.

2.5. Nitrogênio solúvel em pH 4,6 e 12% TCA

Os teores de nitrogênio solúvel em tampão de acetato a pH 4,6 e em 12% TCA foram determinados para medir a extensão e a profundidade da proteólise no queijo ocorrida durante o armazenamento a 4°C, usando a metodologia de BYNUM & BARBANO (19). Os teores de nitrogênio solúveis foram determinados por macro Kjeldahl

e convertidos a proteína solúvel multiplicando-se pelo fator de conversão 6,38. Os resultados foram expressos como porcentagem dos teores de proteína total da Mussarela.

2.6. Eletroforese

A eletroforese em gel de uréia poliacrilamida (uréia-PAGE) (gel de separação a 12,5% e de concentração a 4%) foi realizada usando-se uma unidade vertical Protean II xi (Bio-Rad®), usando método descrito por FARKYE et al. (20). Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250, seguindo-se metodologia descrita por BLAKESLEY & BOEZI (21). Os extratos para eletroforese foram preparados dissolvendo-se 100mg de queijo em 5mL de tampão, com aquecimento a 40°C durante 1 hora. O padrão foi preparado com 50mg de caseinato de sódio dissolvido em 5mL de tampão, de acordo com SHALABI & FOX (22). Foram aplicados 7µl de amostra e 5µl de padrão no gel. O tampão para dissolução da amostra foi preparado usando-se 1,5g de tris-hidroximetil aminometano (TRIS), 98 g de uréia, 0,8mL de ácido clorídrico concentrado, 1,4 mL de 2-mercaptoetanol, 0,3g de azul de bromofenol, para um volume final de 200 mL com água destilada. A separação das amostras foi feita inicialmente a 280V e depois a 300V, até o corante indicador (azul de bromofenol) atingir o final do gel (cerca de 4 a 5 horas). Os géis foram corados por imersão na solução corante durante 1 noite e descorados com água destilada.

2.7. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados

O delineamento experimental foi do tipo aleatorizado em blocos. O fator estudado foi a concentração de coagulante (A), utilizado nos níveis de 0,02; 0,05 e 0,10 mg/kg de leite. Os resultados de composição foram analisados por Análise de Variância, utilizando-se o teste de Duncan para verificar diferenças entre as médias. Para a avaliação dos índices de proteólise (pH, acidez, nitrogênio solúvel a pH 4,6 e 12% TCA) foi adotado um delineamento do tipo "split-plot", sendo que a sub-parcela foi obtida pela incorporação do fator tempo de armazenamento refrigerado (B), conforme (Tabela 1). As análises foram realizadas nos dias 5, 12, 19, 26 e 33 de armazenamento refrigerado. O teste F-ANOVA foi usado para testar as diferenças entre tratamentos, tempo de armazenamento refrigerado e a interação tempo versus tratamentos. Foi utilizado o teste de Duncan de comparação

múltipla para agrupar tratamento e/ou tempos com médias cujas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 1: Modelo estatístico usado para análise dos dados		
Fatores	GL ¹	Analisado como
Concentração do coagulante (A)	2	Classificação
Erro (a)	6	
Tempo (B)	4	Quantitativo
Interação (A)*(B)	8	Classificação x Quantitativo
Erro (b)	24	
1 Graus de liberdade		

3. Resultados e discussão

3.1 Composição do queijo

Como pode ser verificado na Tabela 2, todos os queijos apresentaram valores de umidade de cerca de 50% o que, pela legislação brasileira, enquadra a Mussarela na categoria de queijo de média umidade (47-55%). O teor de gordura variou de 20,73% a 21,66%, o que o classifica como um queijo semigordo, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos, BRASIL (23). Os dados da Tabela 2 mostram que a concentração de quimosina não influenciou significativamente na composição dos queijos. Valores semelhantes de composição foram encontrados por MICKETTS & OLSON (24), quando trabalharam com quantidades reduzidas de coagulante bovino em queijo Mussarela feito por acidificação direta.

Tabela 2: Composição média (n=3) do queijo Mussarela produzido por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina¹ obtida por fermentação.

Componente	Concentração de quimosina (mg/kg de leite)		
	0,02	0,05	0,10
PH	5,62	5,59	5,62
Umidade, %	49,83	50,66	50,03
Gordura, %	20,20	20,30	20,80
GBS ² , %	40,34	41,22	41,62
Proteína, % (N x 6.38)	23,26	22,84	24,29
Cálcio, %	0,685	0,708	0,703
Sal, %	1,59	1,50	1,50
Cinzas, %	2,96	3,00	2,99
Sal/Umidade, %	3,19	2,96	2,99
Cálcio / Proteína, %	2,94	3,16	2,89

^{a,b,c} Numa mesma linha, médias com letras em comum não diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

¹ Chymax®, Chr. Hansen®. ² Gordura em Base Seca.

3.2 Evolução do pH e acidez

Todos os queijos apresentaram valores de pH relativamente elevados, comportamento esperado para este tipo de queijo fabricado sem a adição de fermento láctico. A concentração de quimosina ($p=0,064$) e o tempo de estocagem ($p=0,087$) não influenciaram significativamente o pH dos queijos; entretanto, a interação concentração de quimosina*tempo foi significativa ($p < 0,01$) (Tabela 3).

A Fig. 1A mostra a evolução do pH e 1B acidez durante os 33 dias de armazenamento refrigerado, evidenciando uma manutenção dos valores iniciais de pH dos queijos, sem grandes variações. Para todos os queijos, pode ser observado um comportamento do pH linear e praticamente constante até o 26^o dia de estocagem refrigerada (Fig. 1A). Após o 26^o dia, houve uma diminuição do pH, mais acentuada para os queijos fabricados com concentrações mais elevadas de quimosina.

A Fig. 1B mostra o comportamento da acidez titulável para os queijos fabricados com 0,02; 0,05 e 0,10 mg/kg leite de quimosina durante os 33 dias de armazenamento refrigerado. A concentração de quimosina ($p=0,085$) e o tempo de estocagem ($p=0,094$) não influenciaram a acidez titulável dos queijos (Tabela 3). No entanto, a interação concentração de quimosina * tempo foi significativa ($p<0,01$) (Tabela 3), sendo observado apenas um leve aumento da acidez titulável com o tempo de estocagem refrigerada (Fig. 1B). Não se espera que queijos fabricados sem fermento láctico apresentem aumento de acidez com o tempo, uma vez que não há fermentação da lactose em ácido láctico pela ação de bactérias do fermento. A pequena variação na acidez titulável dos queijos com o tempo de estocagem refrigerada pode ser atribuída à ação de flora contaminante e/ou sobrevivente à pasteurização, favorecida pelo pH relativamente alto e ausência de competição do fermento láctico, ausente no processo de acidificação direta. A possível produção de ácido por microrganismos contaminantes e/ou sobreviventes à pasteurização pode explicar também o comportamento do pH dos queijos (Fig. 1A), cuja diminuição na última semana de maturação coincide com a elevação da acidez titulável (Fig. 1B).

Tabela 3: Quadrado médio e probabilidades para acidez titulável, pH e índices de proteólise, Nitrogênio Solúvel (pH 4,6 e 12% TCA) em queijo Mussarela fabricado por acidificação direta, armazenado a 4°C durante 33 dias

Fatores	Acidez titulável				pH				Nitrogênio Solúvel				
	GL	QM	P		QM	P			QM	P			
Concentração de Quimosina (A)	2	5,467	0,085		7,247	0,064		2324219	<0,01*			0,158	0,087
Erro (a)	6	<0,01			0,478			0,207				0,458	
Tempo de armazenamento (B)	8	12,453	0,094		9,546	0,087		796947	<0,01*			1,066	<0,01*
Interação A*B	4	7,864	<0,01*		1,241	<0,01*		10,799	<0,01*			<0,01*	<0,01*
Erro (b)	24	<0,01			<0,01			49,455				2,600	
R ²			0,8330			0,9986			0,9929				0,9995

GL= graus de liberdade; P= probabilidades; QM= quadrado médio

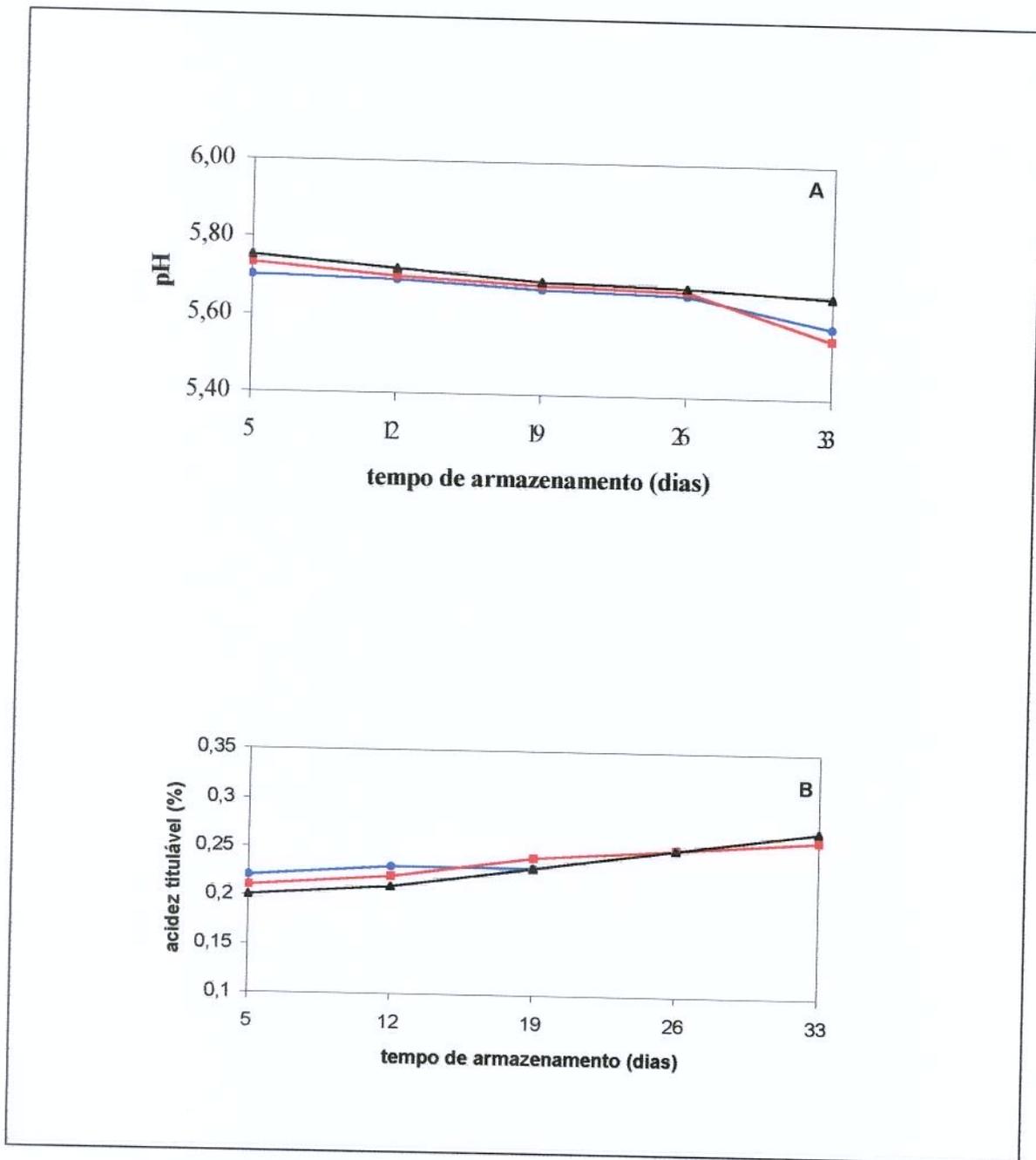


Fig.1: Evolução do pH (A) e acidez titulável (B) em queijo Mussarela feito por acidificação direta com 0,02 (●); 0,05 (■) e 0,10 (▲) mg de quimosina/kg de leite, obtida por fermentação durante armazenamento refrigerado a 4°C.

3.3 Índices de proteólise (NS em pH 4,6 e em 12% TCA)

A formação de nitrogênio solúvel em pH 4,6 é um indicador da atividade proteolítica devido à ação do coagulante residual. Nesta determinação, medem-se principalmente os peptídeos de alto e médio peso molecular, oriundos da hidrólise da α_{s1} -caseína, podendo também estar incluídos peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos (25, 26). Portanto, a porcentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 é um bom indicador da extensão de proteólise em queijo.

A Fig. 2A mostra a evolução da relação nitrogênio solúvel em pH 4,6 / NT, e 2B do NS em 12% TCA / NT do queijo Mussarela feito por acidificação direta com diferentes concentrações de quimosina, durante o armazenamento refrigerado a 4°C. A concentração de quimosina ($p < 0,01$) e o tempo de estocagem ($p < 0,01$) influenciaram significativamente a extensão da proteólise. Como a interação concentração de quimosina*tempo de armazenamento ($p < 0,01$) (Tabela 3) foi estatisticamente significativa, há necessidade de se avaliar esses parâmetros em conjunto. A Fig. 2A mostra que, somente a partir do 12º dia de estocagem, houve diferenças nos teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 com o uso de diferentes concentrações de quimosina. Portanto, os dados indicam que a hidrólise da caseína pela quimosina foi significativa somente a partir do 12º dia de armazenamento, quando os valores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 foram diretamente proporcionais às concentrações de quimosina empregada. Deve ser ressaltado que os queijos fabricados com 0,02 mg quimosina/kg leite praticamente não sofreram proteólise devido à ação do coagulante, como pode ser observado pelos valores constantes dos índices de extensão de proteólise com o tempo de armazenamento refrigerado (Fig. 2A). Provavelmente, a pequena quantidade de coagulante adicionado ao leite (0,02 mg quimosina/kg leite), e o conseqüente teor residual do coagulante na massa foi insuficiente para promover a proteólise durante a estocagem refrigerada.

Para todos os queijos, os índices de extensão de proteólise encontrados foram maiores do que os observados por CHAVES (27) para queijo Mussarela fabricado com fermento mesofílico. Tal fato pode ser explicado pela maior umidade dos queijos Mussarela fabricados por acidificação direta e pelo menor pH de coagulação do leite (5,6), o que possibilita maior retenção de coagulante no queijo e, conseqüentemente, maior extensão de

proteólise. Os resultados evidenciam que a temperatura de 57°C, atingida pela massa durante a filagem, não foi suficiente para inativar o coagulante residual e reforça a teoria de que a quimosina é bastante estável ao aquecimento a pH 5,6 (8).

A formação de peptídeos de baixo peso molecular é um bom indicativo da atividade proteolítica das endo e exopeptidases do fermento láctico (25, 26). Portanto, a porcentagem de NS em 12% TCA em relação à porcentagem de nitrogênio total é utilizada como um indicador de profundidade de proteólise no queijo, sendo usada para medir a atividade das enzimas do fermento láctico e de outros microrganismos presentes .

A evolução da relação de nitrogênio solúvel em 12% TCA/nitrogênio total durante a estocagem refrigerada é apresentada na Fig. 2B. Não houve diferença significativa ($p=0,087$) na profundidade de proteólise devido à mudança na concentração de quimosina, como era esperado. Entretanto, houve um aumento do teor de nitrogênio solúvel em 12% TCA ($p<0,01$) com o tempo de armazenamento refrigerado. Como não houve o emprego de cultura láctica durante a fabricação dos queijos, os pequenos aumentos observados ao longo do tempo para as várias concentrações de quimosina podem ter sido ocasionados por contaminantes durante o processo ou pelo desenvolvimento de flora secundária sobrevivente à pasteurização do leite.

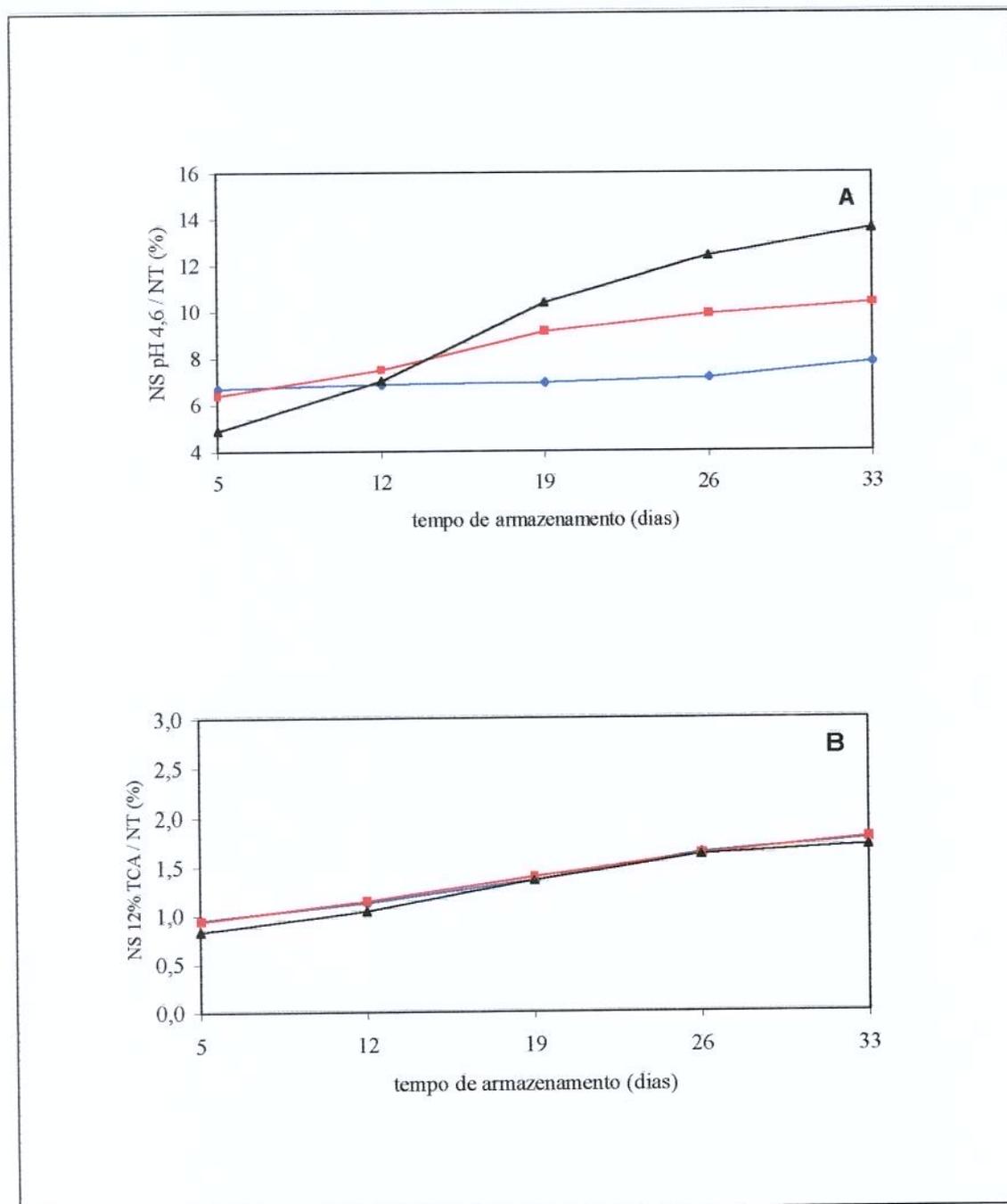


Fig 2: Evolução da relação do NS em pH 4,6/ NT (A) e NS em 12% TCA/NT (B) do queijo Mussarela feito por acidificação direta com 0,02;(●) 0,05;(■) e 0,10 (▲) mg de quimosina/kg de leite, obtida por fermentação durante estocagem refrigerada a 4°C.

3.4 Eletroforese

A Fig. 3 mostra o eletroforetograma correspondente às concentrações de quimosina de 0,02; 0,05 e 0,10 mg/kg de leite no 5º, 19º e 33º dia de armazenamento refrigerado. Através do eletroforetograma fica evidenciado que ocorreu o desdobramento progressivo e em proporções crescentes da α_{s1} -caseína em α_{s1-I} caseína com o decorrer do tempo de armazenamento e com aumento da concentração de quimosina. A variação da concentração de quimosina não afetou o teor de β -caseína, que permaneceu constante com o tempo de estocagem refrigerada. A proteólise ocorrida foi devido à ação do coagulante residual, sendo esse o principal agente de cura do queijo Mussarela por acidificação direta.

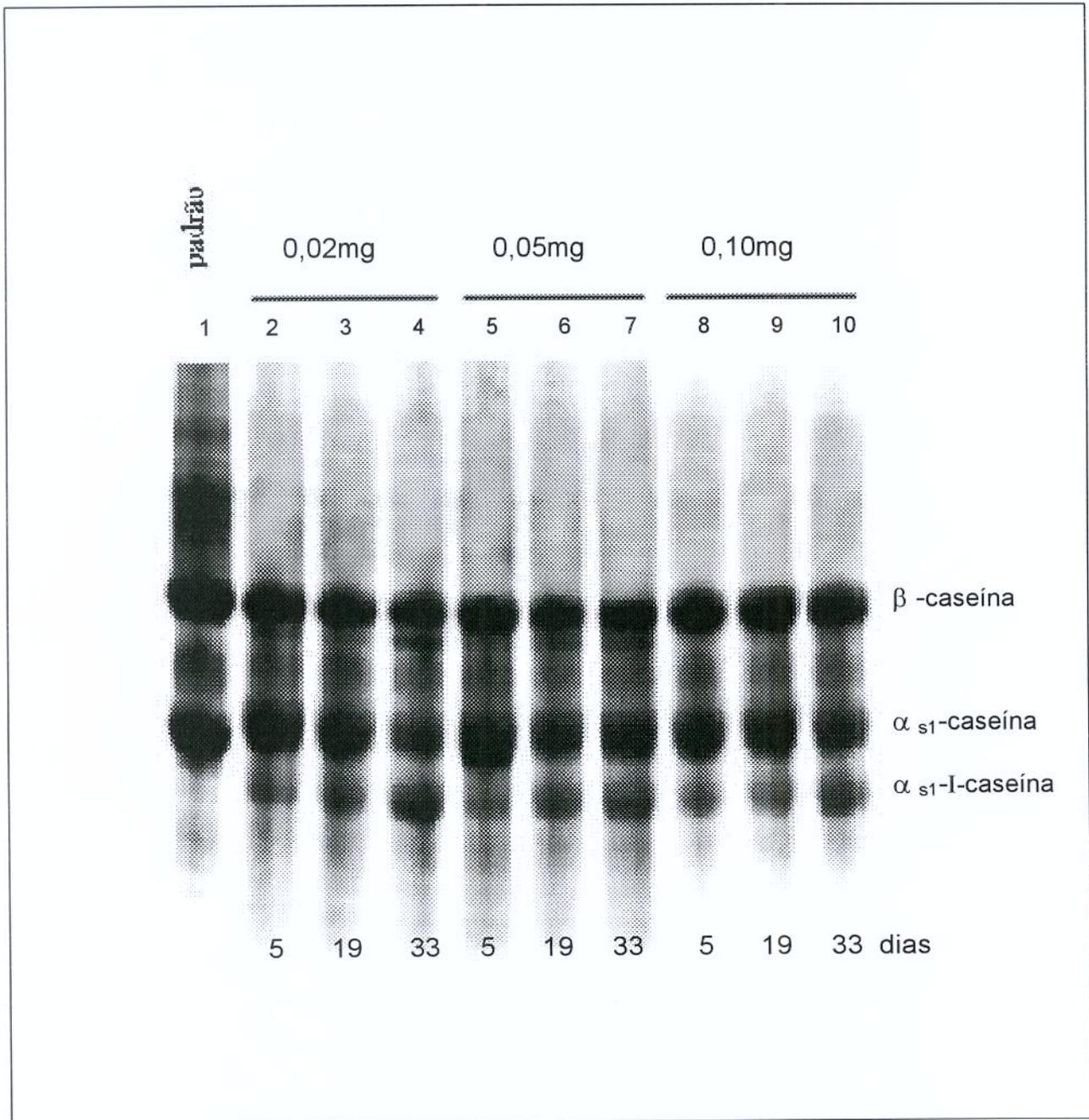


Fig 3: Eletroforetograma de queijo Mussarela feito por acidificação direta com ácido acético. Banda 1 = Caseinato de sódio (padrão). Bandas 2, 3 e 4 = 0,02 mg de quimosina/kg de leite (5; 19 e 33dias). Bandas 5, 6 e 7 = 0,05 mg de quimosina/ kg de leite (5; 19 e 33dias). Bandas 8, 9 e 10 = 0,10 mg de quimosina/kg de leite (5; 19 e 33dias).

4 Conclusões

Diferentes concentrações de quimosina não afetaram significativamente a composição química dos queijos fabricados por acidificação direta. Após 12 dias de estocagem refrigerada, o aumento da concentração de quimosina resultou em aumento progressivo da proteólise. Para todos os queijos, houve degradação da α_{s-1} -caseína. A extensão de proteólise durante a estocagem refrigerada foi afetada pela concentração de coagulante, sendo que maiores concentrações de quimosina resultaram em maior extensão de proteólise. Mudanças na proteólise provocadas pela manipulação da concentração de quimosina podem ser uma excelente ferramenta de controle da funcionalidade do queijo Mussarela de acidificação direta. Outros estudos devem ser realizados para maior entendimento do sistema, o que pode capacitar os queijeiros a melhorar a funcionalidade do queijo Mussarela feito por acidificação direta.

5. Referências

- (1) OLSON, N.F.: Food Technol. **41** (10) 28-31 (1971)
- (2) LUCEY, J.A., FOX, P.F. J.: Dairy Sci. **76** (6) 1714-1724 (1993)
- (3) LAW, B.A. In: Cheese: Chemistry physics and microbiology. (Ed. FOX, P.F): Elsevier Applied Science. New York (1987)
- (4) DE JONG, L.: Neth. Milk Dairy J. **31** (3) 314-317 (1977)
- (5) DULLEY, J.R.: Aust. J. Dairy Technol. **29** (2) 65-73 (1974)
- (6) VISSER, F.M.W.: Neth. Milk Dairy J. **31** (2) 247-264 (1977)
- (7) STADHOUDERS, J., HUP, G.: Neth. Milk Dairy J. **29** (2) 335-351 (1975)
- (8) YUN, J.J., BARBANO, D.M., KINDSTEDT, P.S., LAROSE, K.L.: J. Dairy Sci. **78** (1) 1-7 (1995)
- (9) LARSSON, K.I., ANDRÉN, A.: Int. Dairy J. **7** 615-618 (1998)
- (10) GARNOT, P.: Int. Dairy Fed. Bull. (194) 2-7 (1985)
- (11) KOSIKOWSKI, F.V., MISTRY, V.V.: Cheese and Fermented Milk Foods. 3^a ed. AVI Publishing Company, Westport, (1997)
- (12) VIOTO, W.H., OLIVEIRA, A.N.: Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes. **53** 44-52 (1998)

- (13) AOAC: Official Methods Analysis Association Official Agricultural Chemists. 16th ed., Arlington, VA (1995)
- (14) INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do IAL. D.B. Rebocho Ed. São Paulo- SP, 371p. (1985)
- (15) RICHARDSON, G.H. In: Standard Methods for Examination of Dairy Products. 15th ed. Washington, DC. (1985)
- (16) INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. FIL- IDF. Standard (20A) 1-3 (1962)
- (17) BARBANO, D. M., LYNCH, J.M., FLEMING, J. R.: J. AOAC. **74** (2) 281-288 (1991)
- (18) TARAS, M. J. In: Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 15th ed. Washington: DC (1971)
- (19) BYNUM, D. G., BARBANO, D. M.: J. Dairy Sci. **68** (1) 1-10 (1985)
- (20) FARKEY, N.Y., KIELY, L.J., ALLSHOUSE, R.D., KINDSTEDT, P.S.: J. Dairy Sci. **74** (3) 1433-1438 (1991)
- (21) BLAKESLEY, R.W., BOEZI, J.A.: Anal. Biochem. **82** (2) 580-582 (1977)
- (22) SHALABI, S.I., FOX, P.F.: Irish J. Food Sci. Technol. **11** (2) 135-151 (1987)
- (23) BRASIL Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 364 de 4 de set. de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Mussarela. Diário Oficial, Brasília, 8 de set. de 1997.
- (24) MICKETTS, R., OLSON, N.F.: J. Dairy Sci. **57** (3) 273-279 (1974)
- (25) CHRISTENSEN, T.M., BECH, A.M., WERNER, H.: Int. Dairy Fed. Bull. (261) 4-9 (1991)
- (26) FARKEY, N.Y., FOX, P.F.: Trends Food Sci. Technol. **1** (2) 37-40 (1990)
- (27) CHAVES, A.C.S.D., VIOTTO, W.H., GROSSO, C.R.F.: J. Food Sci. **64** (2) 202-205 (1999)

**CAPÍTULO 4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE QUIMOSINA NAS
PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO QUEIJO MUSSARELA
FEITO POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA COM ÁCIDO
ACÉTICO**

TRABALHO A SER ENVIADO À REVISTA MILCHWISSENSCHAFT

Influência da concentração de quimosina nas propriedades funcionais do queijo Mussarela feito por acidificação direta com ácido acético

RESUMO

A influência de diferentes concentrações de quimosina obtida por fermentação no derretimento, óleo livre e perfil de textura TPA do queijo Mussarela obtido por acidificação direta com ácido acético, foram determinados durante 33 dias de estocagem refrigerada, a 4°C. Cem litros de leite foram usados em cada processamento de queijo usando-se 0,02; 0,05 e 0,10 mg de quimosina/kg de leite. Cada tratamento foi realizado em triplicata, perfazendo 9 ensaios, que foram previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução. O método de fabricação seguiu um fluxograma modificado, visando obter um produto final o mais uniforme possível em relação à composição físico-química. As modificações incluíram a padronização do teor de caseína : gordura, a coagulação e agitação da massa a 41°C e a salga na massa. Análises de Perfil de Textura (dureza TPA, elasticidade TPA e coesividade TPA), óleo livre e capacidade de derretimento foram realizadas para todos os queijos, durante os 33 dias de armazenamento refrigerado. O aumento da concentração de quimosina resultou em queijos com menor dureza TPA ($p < 0,01$), maior capacidade de derretimento ($p < 0,01$) e maior separação de óleo livre ($p < 0,01$), provavelmente em função da proteólise mais intensa. A elasticidade ($p < 0,08$) e coesividade TPA ($p < 0,09$) da Mussarela não foram afetadas pelas diferenças na concentração de quimosina. Portanto, a concentração de coagulante parece ser uma variável bastante útil para se controlar as propriedades funcionais do queijo Mussarela fabricado por acidificação direta com ácido acético.

Queijo Mussarella acidificação direta (avaliação de funcionalidade)

ABSTRACT

The influence of different concentrations of chymosin derived by fermentation, on the melting, free oil and texture profile analysis (TPA) of Mozzarella cheese obtained by direct acidification with acetic acid, were determined for 33 days of refrigerated storage at 4°C. One hundred litres of milk were used in each vat and the cheeses were made with

chymosin added at rate of 0.02, 0.05 and 0.10 mg/kg of milk. Each treatment was carried out in triplicate resulting in 9 trials, which were previously randomised to determine the order of execution. The production of the cheese followed a modified flow diagram to obtain a final product as uniform as possible with respect to the physical-chemical composition. The modifications included the standardization of the casein : fat ratio, coagulation and stirring of the batch at 41°C, the inclusion of a 5 minute resting period immediately after cutting the curd and a two-stage curd salting process. The cheeses were analysed for their texture profile analysis (TPA hardness, TPA springiness and TPA cohesiveness), free oil and melting capacity, during 33 days of refrigerated storage. An increase in the concentration of chymosin resulted in cheeses with lower TPA hardness ($p < 0.01$), greater melting capacity ($p < 0.01$) and greater separation of free oil ($p < 0.01$), probably as a function of more intense proteolysis, these values being statistically different for the three concentrations of chymosin. TPA springiness ($p < 0.08$) and cohesiveness ($p < 0.09$) of cheeses were not affected by different amounts of chymosin. Thus, the concentration of coagulant appears to be a useful variable in the control of the functional properties of Mozzarella cheese prepared by direct acidification with acetic acid.

Direct acidified Mozzarella cheese (evaluation functionality)

1. Introdução

Funcionalmente, a Mussarela deve ser firme o suficiente para permitir o fatiamento ou a trituração. Quando usada para fins culinários, o queijo deve derreter de forma contínua e uniforme (capacidade de derretimento), sem excessiva separação de gordura (óleo livre). Sob tensão, a Mussarela deve formar fibras que se alongam sem rompimento (stretchability) com a capacidade de resistir à elongação permanente (elasticidade), (1, 2).

O aumento da competição entre as indústrias para produção de Mussarela de baixo custo, visando à obtenção de rendimento elevado, redução do tempo de maturação ou estabilização, diminuição do custo dos ingredientes adicionados tem aumentado o interesse pela técnica de acidificação direta. Nesta técnica de fabricação não se usa cultura láctica e o leite é acidificado, antes da coagulação, pela adição direta de ácido em grau alimentício, como o acético e o cítrico. Outras vantagens da Mussarela obtida por acidificação direta incluem um tempo de processo reduzido, controle preciso do pH, maior capacidade de

retenção de água pela matriz protéica e, portanto maior resistência à sinérese e nenhuma necessidade de maturação do queijo. Além disso, a eliminação dos custos da cultura láctica e de sua variabilidade se soma à possibilidade de diminuição da concentração de coagulante, uma vez que o leite acidificado apresenta um pH mais baixo, que melhora a ação da quimosina. O pH ao redor de 5,6 e a acidificação rápida também favorecem uma maior retenção da quimosina na massa que, aliada à umidade mais elevada da Mussarela obtida por acidificação direta, propicia uma proteólise bastante intensa quando comparada com a Mussarela tradicional (3).

Variações na quantidade de quimosina podem afetar a microestrutura, a proteólise, a absorção de água e, conseqüentemente as propriedades funcionais do queijo. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da quantidade de quimosina na funcionalidade do queijo Mussarela fabricado por acidificação direta e as mudanças ocorridas no queijo durante o armazenamento refrigerado.

2 Material e métodos

2.1 Fabricação do queijo

Para cada concentração de quimosina (0,02, 0,05 e 0,10 mg/kg de leite), foram realizados ensaios em triplicata num total de nove, sendo estes previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução. A metodologia empregada para a produção do queijo Mussarela por acidificação direta foi a proposta por KOSIKOWSKI & MISTRY (4) e modificada por VIOTTO & OLIVEIRA (5). As modificações incluíram a padronização do teor de caseína: gordura, a coagulação e agitação da massa a 41°C, a inclusão de tempo de repouso de 5 minutos logo após o corte da coalhada e, a salga na massa em duas etapas. Leite cru desnatado e creme foram misturados em proporções adequadas para a obtenção de uma relação caseína: gordura de 1:1. Uma vez padronizado o leite, foi feita a pasteurização a 63°C por 30 minutos em tanque de camisa dupla (Modelo Inadal 563A®), resfriado a 4°C e estocado por uma noite. No dia seguinte, o leite, a 4°C, foi acidificado a pH 5,6 com solução de ácido acético glacial a 50% (Chemco®). Após o ajuste do pH, o leite foi aquecido a 41°C e transferido para um tanque de fabricação (Marca ICMA®). A

temperatura de 41°C foi mantida por circulação de água quente na camisa do tanque. 200 ppm de cloreto de cálcio (Merck®) foram adicionados ao leite. O coagulante usado foi a quimosina obtida por fermentação (Chymax®, Chr. Hansen), verificado o ponto de corte, o mesmo foi realizado com agitação da coalhada por 3 minutos, deixou-se a coalhada em repouso por 5 minutos, findo os quais, iniciou-se a dessoragem. A massa foi então cortada e agitada por 10 minutos, mantendo-se a temperatura a 41°C. A salga foi efetuada na massa (3% sal do peso da massa, p/p) em duas aplicações, agitando-se durante 1 minuto para incorporação do sal, com 3 minutos de intervalo entre as duas aplicações. Durante a salga, a temperatura da massa foi mantida a 41°C. A filagem foi realizada manualmente, sendo 80°C a temperatura da água de filagem e 57°C a temperatura interna média da massa. O queijo foi resfriado em água gelada por 1 hora, tendo permanecido, durante a noite, em câmara fria, para secagem, e no dia seguinte foi embalado a vácuo. Os queijos foram numerados e depois sorteados para as análises de composição e funcionalidade.

2.2 Preparo de amostras

De cada peça de queijo, tomada aleatoriamente, retirou-se uma fatia de mais ou menos 1cm das laterais, parte superior e inferior, que foram desprezadas. A outra parte foi cortada em cubos pequenos e triturada em multiprocessador até a obtenção de partículas de tamanho entre 2-3 mm. O material assim obtido foi homogeneizado manualmente e acondicionado em frascos plásticos, sem espaço livre. As amostras foram mantidas sob refrigeração (4-8°C) até o momento das análises. No 5º, 12º, 19º, 26º e 33º dia de estocagem refrigerada, os queijos previamente sorteados foram submetidos ao procedimento de amostragem e preparação para as análises de funcionalidade (perfil de textura, formação de óleo livre e capacidade de derretimento).

2.3 Propriedades funcionais

A textura da Mussarela foi avaliada através da Análise de Perfil de Textura (TPA) segundo, em quintuplicata, usando o texturômetro TAXT₂ Stable Micro Systems® (6, 7). O equipamento foi operado pelo programa Texture Expert®. O derretimento do queijo foi

medido em sextuplicata pelo teste de Schreiber, descrito por KOSIKOWSKI & MISTRY (4). A formação de óleo livre foi avaliada pelo método de Gerber modificado, em triplicata, conforme KINDSTEDT & FOX (8). Todos esses testes foram realizados para cada concentração de quimosina, em cada tempo de armazenamento refrigerado.

2.4 Planejamento experimental e análise estatística dos resultados

O delineamento experimental foi do tipo aleatorizado em blocos. O fator estudado foi a concentração de coagulante (A), utilizado nos níveis de 0,02; 0,05 e 0,10 mg/kg de leite. Os resultados de composição foram analisados através de Análise de Variância, utilizando-se o teste de Duncan para verificar diferenças entre as médias. Para a avaliação das propriedades funcionais (capacidade de derretimento, formação de óleo livre e perfil de textura TPA (dureza, elasticidade e coesividade)) foi adotado um delineamento do tipo "split-plot", sendo que a subparcela foi obtida pela incorporação do fator tempo de armazenamento refrigerado (B), conforme Tabela 1. As análises foram realizadas nos dias 5, 12, 19, 26 e 33 de armazenamento refrigerado. O teste F-ANOVA foi usado para verificar as diferenças entre tratamentos, tempo de armazenamento refrigerado e a interação tempo versus tratamento. Foi utilizado o teste de Duncan de comparação múltipla para agrupar tratamento e/ou tempo com médias cujas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 1: Modelo estatístico usado para análise dos dados		
Fatores	GL ¹	Analisado como
Concentração do coagulante	2	Classificação
Erro (a)	6	
Tempo (B)	4	Quantitativo
Interação (A) x (B)	8	Classificação x Quantitativo
Erro (b)	24	
¹ Graus de liberdade		

3 Resultados e discussão

3.1 Perfil de Textura do queijo não derretido

A dureza TPA foi significativamente afetada pela concentração de quimosina ($p < 0,01$) e pelo tempo de estocagem ($p < 0,01$); também foi observada a interação concentração de quimosina * tempo de estocagem ($p < 0,01$) (Tabela 2). Os valores de dureza TPA apresentados pelos queijos foram inversamente proporcionais à concentração de quimosina empregada. Todos os queijos apresentaram diminuição da dureza com o tempo de armazenamento em função do aumento da proteólise. Conforme mostra a Fig. 1A, em queijos com menor concentração de quimosina a taxa de diminuição da dureza com o tempo foi mais lenta. A proteólise da fração α_{s1} -caseína no queijo Mussarela resultou da ação da quimosina residual, que não foi completamente inativada durante o aquecimento e filagem da massa. O desdobramento da α_{s1} em α_{s1-I} -caseína pela ação do quimosina ocasionou o enfraquecimento da matriz protéica, que foi responsável pelo amaciamento do queijo durante o período de estocagem. Quanto maior a concentração de quimosina usada, maior foi a diminuição da dureza, provavelmente em função da maior quantidade de quimosina retida na massa. Esse amaciamento também foi encontrado por outros pesquisadores, (9, 10 e 11) observaram diminuição da dureza TPA em queijos Mussarela fabricados por acidificação direta, e atribuíram o fato à incorporação de água livre pelas proteínas do queijo, aliada à diminuição da quantidade de α_{s1} -caseína intacta.

A Fig. 1B e 1C mostram a influência da concentração de quimosina nos parâmetros elasticidade e coesividade TPA, respectivamente, para o queijo Mussarela feito por acidificação direta. Em todos os queijos, a elasticidade ($p < 0,08$) e a coesividade ($p < 0,09$) não foram influenciadas significativamente pelas diferentes concentrações de quimosina e pelo tempo de armazenamento (Tabela 2). Observou-se que os queijos apresentaram boa elasticidade e coesividade já a partir da primeira semana, e mantiveram-se praticamente inalterados durante o tempo de estocagem.

Tabela 2: Quadrado médio e probabilidades para perfil de textura TPA (dureza, elasticidade e coesividade), derretimento e óleo livre como % de gordura total em queijo Mussarela feito por acidificação direta armazenado a 4°C durante 33 dias

Fatores	Perfil de Textura TPA																
	Dureza				Elasticidade				Coesividade				Derretimento				Óleo Livre
	GL ¹	QM ²	P ³	QM	P	QM	P	QM	P	QM	P	QM	P	QM	P	QM	P
Concentração de quimosina (A)	2	232421	<0,01*	0,186	0,084	0,197	0,093	374,34	<0,01*	9,546	<0,01*						
Erro (a)	6	0,207		<0,01		0,615		<0,01		0,478							
Tempo de estocagem (B)	8	796947	<0,01*	0,548	0,074	0,189	0,091	38,206	<0,01*	7,247	<0,01*						
Interação Concentração (A) * Tempo (B)	4	28914	<0,01*	23,489	0,148	21,983	0,137	7,864	<0,01*	1,241	<0,01*						
Erro (b)	24	<0,01		<0,01		<0,01		<0,01		<0,01							
R ²			0,9998		0,9994		0,9996		0,9998		0,9994		0,9998		0,9994		

¹ graus de liberdade ² Quadrado Médio ³ Probabilidade

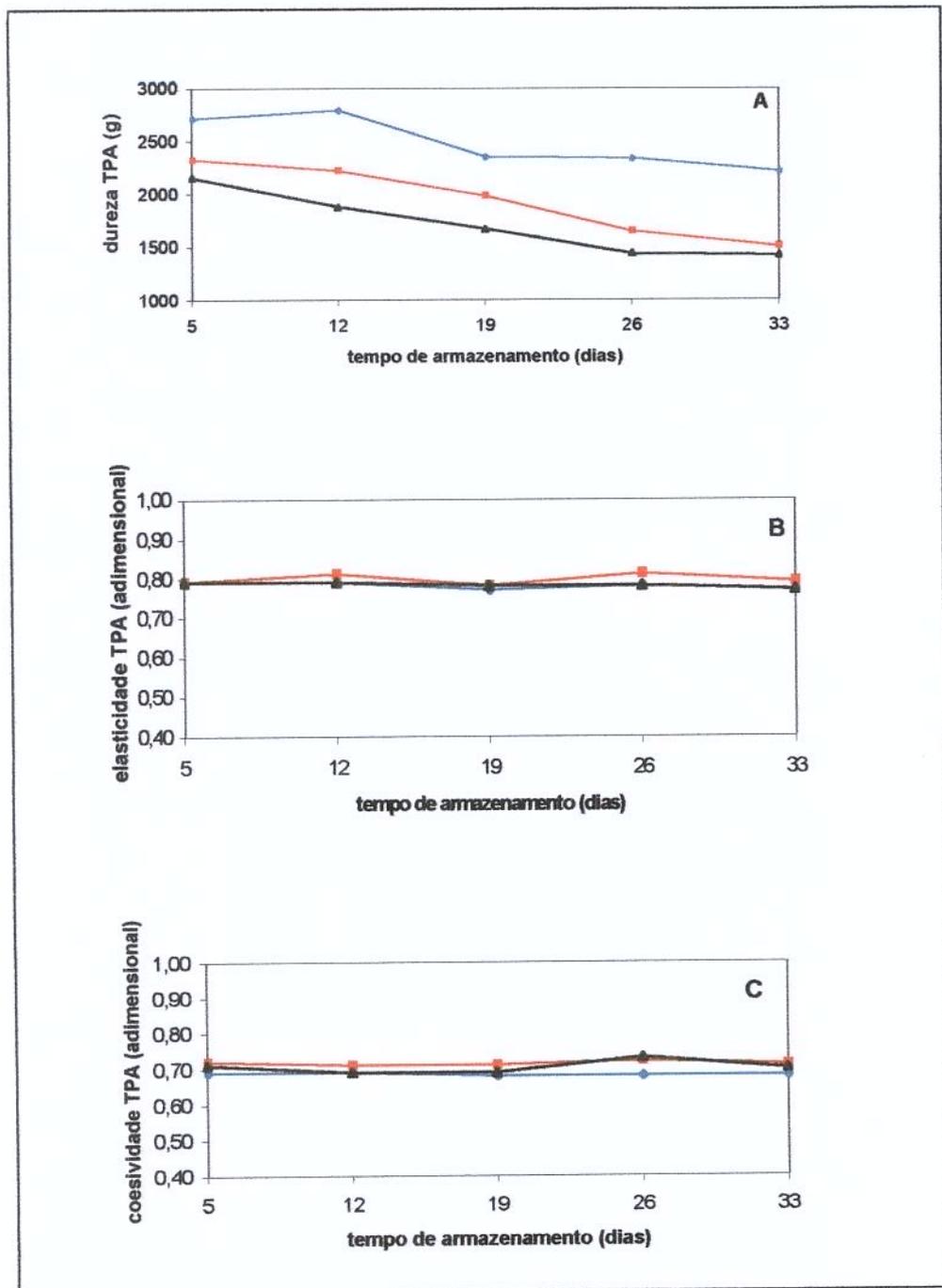


Fig. 1: Influência da concentração de quimosina no Perfil de Textura; dureza (A), elasticidade (B) e coesividade (C) do queijo Mussarela feito por acidificação direta com 0,02(●); 0,05(■) e 0,10(▲) mg de quimosina/kg de leite, durante 33 dias de estocagem refrigerada a 4°C.

3.2 Propriedades funcionais do queijo derretido (derretimento e óleo livre)

Todos os queijos apresentaram elevada capacidade de derretimento, quando comparados com valores de queijo Mussarela fabricado pela técnica tradicional, como os obtidos por YUN *et al.* (12). Isso pode estar associado ao menor pH em que ocorreu a coagulação (5,6), que favorece uma maior retenção de quimosina na massa, resultando em maior extensão de proteólise durante o armazenamento e conseqüentemente, maior derretimento do queijo. A concentração de quimosina ($p < 0,01$) e o tempo de armazenamento refrigerado ($p < 0,01$) afetaram o derretimento do queijo. O termo de interação da concentração de quimosina x tempo de estocagem foi significativo estatisticamente ($p < 0,01$) (Tabela 2). Houve aumento da capacidade de derretimento do queijo com o aumento da concentração de quimosina e com o tempo de armazenamento, porém o comportamento dos queijos fabricados com maior concentração de quimosina diferem bastante daqueles com menor concentração do coagulante. Os queijos fabricados com 0,10 mg de quimosina/kg de leite apresentaram um aumento da capacidade de derretimento mais pronunciado com o tempo. Queijos fabricados com as menores concentrações de coagulante (0,02 e 0,05 mg/kg de leite) mantiveram praticamente inalterada a capacidade de derretimento com o tempo de armazenamento refrigerado, conforme mostra a Fig. 2A. Isso provavelmente está ligado à quantidade de quimosina residual ativa no queijo. Para os queijos fabricados com 0,02 e 0,05 mg de quimosina/kg de leite, a proteólise não resultou em grandes variações na capacidade de derretimento. Portanto, a capacidade de derretimento dos queijos já está definida ao final da fabricação, não havendo necessidade do período de estabilização para o uso do queijo em pizza, como ocorre com a Mussarela feita com fermento. Isso indica que para a Mussarela por acidificação direta fabricada com essas concentrações de quimosina (0,02 e 0,05 mg/kg de leite), qualquer manipulação da capacidade de derretimento deve ser obtida pela modificação no teor de umidade e/ ou gordura do queijo.

A extensão de proteólise tem sido correlacionada positivamente com o aumento da capacidade de derretimento da Mussarela fabricada com fermento (13, 14). Durante o derretimento, a fase sólida do queijo se liquefaz, as moléculas de proteína se reorientam e os glóbulos de gordura coalescem e fluem quando a matriz protéica se colapsa (15). Assim, qualquer tratamento que afete a estrutura da proteína e a distribuição de gordura pode afetar

a capacidade de derretimento. Segundo OBERG *et al.* (16), uma boa estruturação da matriz protéica tem efeito inversamente proporcional na capacidade de derretimento dos queijos. Provavelmente, a estrutura mais frágil da matriz protéica da Mussarela feita por acidificação direta explique a elevada capacidade de derretimento encontrada no queijo fresco, encontrada para todas as concentrações de quimosina no presente estudo.

A Figura 2B mostra a formação de óleo livre dos queijos para as diferentes concentrações de quimosina em função do tempo de estocagem. Houve diferença significativa para a concentração de quimosina ($p < 0,01$) e para o tempo ($p < 0,01$), sendo também verificada interação concentração de quimosina * tempo de estocagem ($p < 0,01$) (Tabela 2). Houve aumento da formação de óleo livre com o aumento da concentração de coagulante, provavelmente em função da maior retenção de quimosina na massa e, portanto maior extensão de proteólise (17). Esse aumento da liberação de óleo também foi observado com o tempo de armazenagem refrigerada dos queijos. O aumento da proteólise do queijo com a concentração de quimosina e com o tempo de armazenamento causou a desestruturação da matriz de caseína, que atua como uma barreira física, evitando a coalescência dos glóbulos de gordura. PAQUET & KALAB (15) e KIELY *et al.* (18) mostraram evidências de que os glóbulos de gordura próximos se aglomeram após o colapso da matriz de paracaseína durante o aquecimento. Todos os queijos apresentaram liberação de óleo superior à de queijos feitos pela técnica tradicional (12). No processo de acidificação direta, o efeito da ação quelante do ácido sobre a caseína pode ter modificado sua capacidade de emulsificação de gordura, resultando em maior formação de óleo livre.

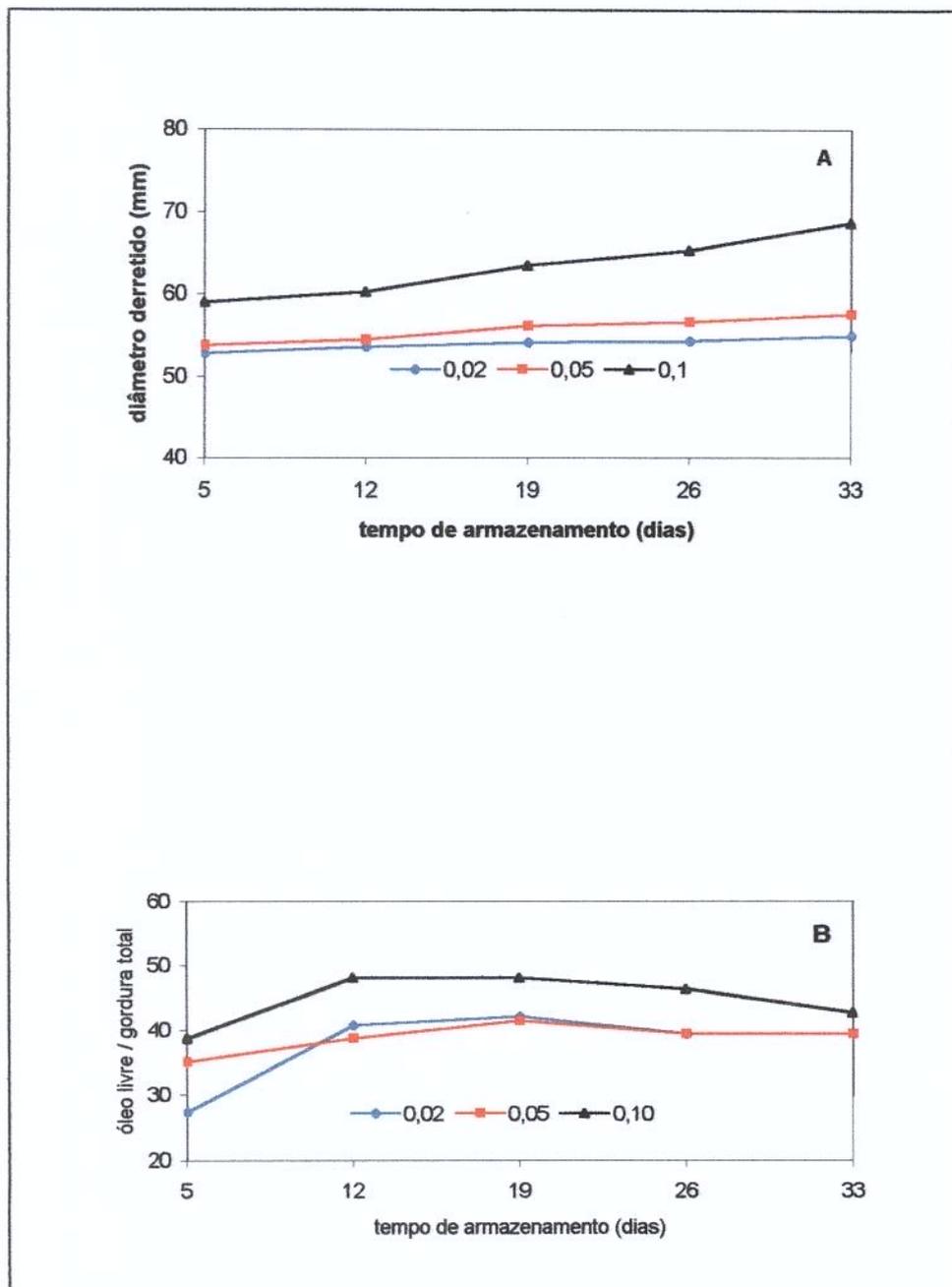


Fig. 2: Influência da concentração de quimosina no derretimento (A) e óleo livre (B) do queijo Mussarela feito por acidificação direta com 0,02 (●); 0,05 (■) e 0,10 (▲) mg de quimosina/kg de leite durante 33 dias de estocagem refrigerada a 4°C.

3.4 Proteólise e funcionalidade

A extensão da proteólise no queijo, medida pelo teor de nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6, foi significativamente afetada pela quantidade de quimosina durante a estocagem refrigerada, conforme mostram OLIVEIRA & VIOTTO (17), existindo uma relação direta entre os teores de NS e as concentrações de quimosina empregadas. As propriedades funcionais, particularmente a dureza TPA, derretimento e óleo livre, foram significativamente influenciadas pela concentração de quimosina.

3.5 Significado prático

O queijo Mussarela é usualmente estocado em temperatura de refrigeração por uma a três semanas antes de ser usado como ingrediente em pizza ou em outros alimentos preparados. Esse período, chamado de estabilização da Mussarela, é necessário para que o queijo possa apresentar as propriedades funcionais desejáveis. No presente estudo, a Mussarela feita por acidificação direta apresentou boas características de derretimento e formação de óleo livre já a partir do 5º dia, bem como já apresentou boa coesividade, elasticidade e dureza TPA, qualificando-se para ser cortado, fatiado ou moído. O queijo obtido apresentou boas propriedades funcionais para uso em pizzas, já a partir da primeira semana, dispensando assim, o período de estabilização. Isso representa diminuição de custos com estocagem, maior agilidade na circulação do capital empatado, eliminação de gastos com cultura láctica, aliada também à real possibilidade de redução da quantidade de quimosina empregada no processo de coagulação. Portanto, a produção de Mussarela por acidificação direta, com quantidade reduzida de quimosina, mostrou-se uma alternativa viável, econômica e tecnologicamente, ao processo tradicional.

4 Conclusões

A diminuição da concentração de coagulante resultou em diminuição da dureza TPA e da capacidade de derretimento e formação de óleo livre. Essas mudanças na textura e propriedades funcionais foram significativamente afetadas pelo tempo de armazenamento refrigerado. Houve diminuição da dureza TPA e aumento do derretimento e óleo livre com transcorrer do tempo. As diferenças encontradas nas propriedades funcionais dos queijos durante a estocagem foram relacionadas à quimosina residual no queijo e aos diferentes índices de proteólise causados pelas diferentes concentrações de quimosina.

5 Referências

- (1) KINDSTEDT, P.S.: *Cult. Dairy Prod. J* **26** (3) 27-31 (1991)
- (2) KINDSTEDT, P.S., GUO, M.R.: *Aust. J. Dairy Technol.* **52** (1) 41-43 (1997)
- (3) PAULSON, M.B., McMAHON, D.J., OBERG, C.J.: *J. Dairy Sci.* **81** (8) 2053-2064, 1998.
- (4) KOSIKOWSKI, F.V., MISTRY, V.V.: *Cheese and Fermented Milk Foods*. 3rd ed. AVI Publishing Company, Westport, (1997)
- (5) VIOTO, W.H., OLIVEIRA, A.N.: *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes.* **53** 44-52 (1998)
- (6) BOURNE, M.C.: *Food Technol.* **32** (7) 62-72 (1978)
- (7) CHAVES, A.C.S.D., VIOTTO, W.H., GROSSO, C.R.F.: *J. Food Sci.* **64** (2) 202-205 (1999)
- (8) KINDSTEDT, P.S., FOX, P.F.: *J. Dairy Sci.* **56** (4) 1115-1116 (1991)
- (9) CERVANTES, M.A., LUND, D.B., OLSON, N.F.: *J. Dairy Sci.* **66** (2) 204-213 (1983)
- (10) TUNICK, M.H., MACKEY, K.L., SMITH, P.W., HOLSINGER, V.H.: *Neth. Milk Dairy J.* **45** (2) 117-125 (1991)
- (11) MICKETTS, R., OLSON, N.F.: *J. Dairy Sci.* **57** (3) 273-279 (1974)
- (12) YUN, J.J., KIELY, L.J., BARBANO, D.M., KINDSTEDT, P.S.: *J. Dairy Sci.* **76** (12) 3664-3673 (1993)
- (13) OBERG, C.J., McMANUS, W.R., McMAHON, D.J.: *Food Struct.* **12** (2) 251-258 (1993).
- (14) KINDSTEDT, P.S.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **33** (2) 167-187 (1993)
- (15) PAQUET, A., KALAB, M.: *Food Microstruct.* **7** (1) 93-103 (1988)
- (16) OBERG, C.J., MERRILL, R.K., BROWN, R.J., RICHARDSON, G.H.: *J. Dairy Sci.* **75** (3) 669-675 (1992)
- (17) OLIVEIRA, A.N., VIOTTO, W.H.: Influência da concentração de quimosina na composição e proteólise do queijo Mussarela fabricado por acidificação direta com ácido acético. Artigo a ser submetido para publicação.
- (18) KIELY, L.J., KINDSTEDT, P.S., HENDRICKS, G.M., LEVIS, J.E., YUN, J.J., BARBANO, D.M.: *Food Struct.* **12** (1) 13-20 (1993)

