

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DO USO DE QUIMOSINA PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* VAR. *awamori*
NA FABRICAÇÃO DE QUEIJO TIPO PRATO.

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Marília Ieda da Silveira Folegatti e aprovada pela Comissão Julgadora em 04.11.94.

Marília Ieda da Silveira Folegatti 1678
Zootecnista

gatti e aprovada pela Comissão Julgadora em 04.11.94.

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig +
Orientador

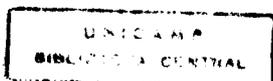
Salvador Massaguer Roig

Dr. Múcio Mansur Furtado 1712000
Co-orientador

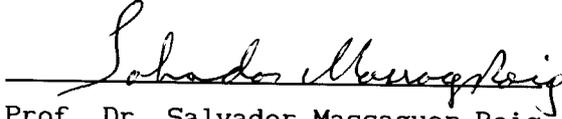
TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

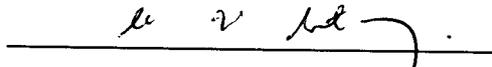
CAMPINAS

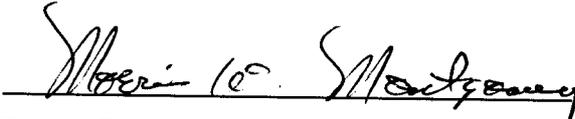
1994



BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
Orientador


Prof. Dr. Aloísio José Antunes
Membro


Prof. Dr. Morris Willian Montgomery
Membro


Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
Suplente

Campinas, 04 de novembro de 1994.

Ao meu irmão Fábio.

Aos meus pais, José Carlos e Iêda e irmãos, Carla e Bruno.

Ao Cláudio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig e ao Dr. Múcio Mansur Furtado, pela orientação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aloísio José Antunes, Prof. Dr. Morris Willian Montgomery e Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant, pelo exame prévio do manuscrito e sugestões sobre a tese.

Aos funcionários da planta piloto de Laticínios, do Laboratório Geral do Departamento de Tecnologia de Alimentos, do Laboratório de Análise Sensorial e do Laboratório de Nutrição e Processamento de Alimentos, pela colaboração prestada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de pós-graduação; à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa; ao Laboratório de Bioquímica do ITAL, ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes e à Ha-La do Brasil, pelas facilidades proporcionadas.

Aos meus pais, José Carlos e Iêda, meus irmãos, Carla, Fábio e Bruno e ao Cláudio, pelo amor e incentivo.

SUMÁRIO.

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
SUMMARY	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O FENOMENO DA COAGULAÇÃO DO LEITE	3
2.2. COALHOS E COAGULANTES	3
2.3. RENDIMENTO	5
2.4. COALHO OBTIDO POR FERMENTAÇÃO	6
2.5. MATURAÇÃO E PROTEÓLISE EM QUEIJOS	10
2.6. PAPEL DOS AGENTES PROTEOLÍTICOS EM QUEIJOS	11
2.7. EFEITO DO TEOR DE SAL NA PROTEÓLISE	13
2.8. EXTENSÃO E PROFUNDIDADE DE PROTEÓLISE	15

2.9. GOSTO AMARGO EM QUEIJOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. MATÉRIAS-PRIMAS	21
3.1.1. LEITE	21
3.1.2. FERMENTO	21
3.1.3. COALHOS	21
3.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DOS COALHOS	22
3.3. TRATAMENTO DO LEITE	23
3.4. FABRICAÇÃO DOS QUEIJOS	23
3.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE PASTEURIZADO	24
3.5.1. ACIDEZ TITULÁVEL	24
3.5.2. pH	24
3.5.3. GORDURA	25
3.5.4. SÓLIDOS TOTAIS	25
3.5.5. DENSIDADE	25
3.6. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SORO	25
3.7. CÁLCULOS DAS PORCENTAGENS DE PERDA DE SÓLIDOS TOTAIS E GORDURA DO LEITE	25
3.8. CÁLCULO DO RENDIMENTO DE FABRICAÇÃO	27
3.9. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS QUEIJOS	27
3.9.1. ANÁLISES COMPOSICIONAIS	27

3.9.1.1. GORDURA	27
3.9.1.2. SÓLIDOS TOTAIS	28
3.9.1.3. UMIDADE	28
3.9.1.4. GORDURA NO EXTRATO SECO	28
3.9.1.5. NITROGÊNIO TOTAL	28
3.9.1.6. PROTEÍNA TOTAL	28
3.9.1.7. SAL	29
3.9.2. ATIVIDADE DE ÁGUA	29
3.9.3. ANÁLISES PARA ACOMPANHAMENTO DA PROTEÓLISE	29
3.9.3.1. pH	29
3.9.3.2. FRACIONAMENTO DO NITROGÊNIO TOTAL	29
3.9.3.2.1. NITROGÊNIO SOLÚVEL	29
3.9.3.2.2. NITROGÊNIO NÃO PROTÉICO	30
3.9.3.3. DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO SOLÚVEL E DO NITROGÊNIO NÃO PROTÉICO	30
3.9.3.4. TIROSINA	30
3.10. CÁLCULO DOS ÍNDICES DE EXTENSÃO E PROFUNDIDADE DA PROTEÓLISE	31
3.11. ELETROFORESE	31
3.12. ANÁLISE SENSORIAL	33
3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE	35
4.2. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO QUEIJO	36
4.3. RENDIMENTO	39

4.4. PORCENTAGEM DE SAL E ATIVIDADE DE ÁGUA DO QUEIJO	43
4.5. EVOLUÇÃO DO pH	44
4.6. ÍNDICES DE MATURAÇÃO DOS QUEIJOS	46
4.7. DETERMINAÇÃO DE TIROSINA	50
4.8. ELETROFORESE	50
4.9. AVALIAÇÃO SENSORIAL	55
5. CONCLUSÕES	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS.

- TABELA 1. Valores de acidez, pH, gordura, sólidos totais e densidade dos leites empregados nos três dias de processamento_____35
- TABELA 2. Valores de sólidos totais, umidade, gordura, gordura no extrato seco (GES), nitrogênio total, proteína bruta, sal e atividade de água (Aw) dos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação_____36
- TABELA 3. Transições de gordura e sólidos totais (ST) do leite para o queijo e rendimentos de fabricação nos tratamentos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação_____39
- TABELA 4. Teores de sal e atividade de água (Aw) dos queijos produzidos com coalhos bovino, de vitelo e obtido por fermentação, salgados por 3 e 6 horas_____43
- TABELA 5. Valores de pH dos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, salgados por 3 e 6 horas, aos 6, 36 e 66 dias de maturação_____45

LISTA DE FIGURAS.

- FIGURA 1a. Índice de extensão de maturação nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 3 horas de salga_____47
- FIGURA 1b. Índice de extensão de maturação nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 6 horas de salga_____47
- FIGURA 2a. Índice de profundidade de maturação nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 3 horas de salga_____48
- FIGURA 2b. Índice de profundidade de maturação nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 6 horas de salga_____48
- FIGURA 3a. Teor de tirosina nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 3 horas de salga (mg/100 g de queijo)_____51
- FIGURA 3b. Teor de tirosina nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 6 horas de salga (mg/100 g de queijo)_____51
- FIGURA 4. Eletroforese (PAGE-uréia 7M) das proteínas extraídas dos queijos produzidos por tratamento com coalho bovino, obtido por fermentação e de vitelo_____52
- FIGURA 5a. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho bovino, com 3 horas de salga (I-6 dias; II-66 dias)_____53
- FIGURA 5b. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho de vitelo, com 3 horas de salga (I-6 dias; II-66 dias)_____53

- FIGURA 5c. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho obtido por fermentação, com 3 horas de salga (I-6 dias;II-66 dias)___53
- FIGURA 6a. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho bovino, com 6 horas de salga (I-6 dias; II-66 dias)_____54
- FIGURA 6b. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho de vitelo, com 6 horas de salga (I-6 dias; II-66 dias)_____54
- FIGURA 6c. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho obtido por fermentação, com 6 horas de salga (I-6 dias;II-66 dias)___54

RESUMO.

Avaliou-se o efeito do emprego de três tipos de coalho (bovino, de vitelo e obtido por fermentação com *Aspergillus niger* var. *awamori*, modificado geneticamente) na fabricação de queijos tipo Prato, submetidos a dois níveis de salga (em salmoura a 16^oBe, por 3 e 6 horas) e maturados por 6, 36 e 66 dias (a 12^oC e 90% de UR).

Não foram detectadas diferenças significativas para as porcentagens de transição de gordura nos tratamentos nos quais foram empregados os coalhos de vitelo e o produzido por fermentação (87,35%). Por outro lado, este valor foi superior àquele do tratamento com coalho bovino (85,55%), sendo as diferenças entre tratamentos significativas ao nível de $p < 0,25$.

Com relação à transição de sólidos totais do leite para o queijo, o maior valor obtido foi com o tratamento com o coalho de vitelo (50,20%), seguindo-se o coalho obtido por fermentação (49,48%) e o bovino (49,01%). As diferenças destes tratamentos foram significativas ao nível de $p < 0,25$.

O rendimento, em termos de g de sólidos totais (ST) por litro de leite, foi maior com o coalho de vitelo (64,67); para os tratamentos com o coalho obtido por fermentação e com o bovino, estes valores foram de 64,13 e 63,53, respectivamente, sendo as diferenças significativas à $p < 0,25$.

Os teores de nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 e de nitrogênio não protéico (NNP), solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12%, aumentaram, progressivamente, durante o processo de maturação, com a mesma tendência sendo observada para o aminoácido tirosina. Ocorreu, por consequência, um aumento dos índices de extensão de maturação (NS/nitrogênio total), os quais, em todos os tratamentos, aumentaram de 9% para cerca de 17%. Para os índices de profundidade de maturação (NNP/nitrogênio total), o aumento médio foi de 4,5% para, aproximadamente, 9%, não se verificando diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os dados sugerem que não houve influência dos teores de sal sobre estes índices, o que pode ser justificado pela similaridade dos valores de atividade de água entre as diferentes amostras de queijos.

O comportamento eletroforético (eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de uréia 7M -PAGE) das proteínas dos queijos com 6 e 66 dias indicou que a fração β -caseína permaneceu sem degradação sensível, enquanto que a fração α_s -caseína foi mais suscetível à proteólise durante o processo de maturação, dando origem a diversas sub-unidades protéicas, indicando diferentes graus de degradação em função dos diferentes coalhos empregados. O menor nível de proteólise ocorreu em queijos tratados com coalho obtido por fermentação, sugerindo que a pepsina exerceu intensa ação proteolítica durante a maturação.

A avaliação sensorial não indicou preferência dos provadores por nenhum dos tipos de queijos elaborados com os diferentes coalhos ($p < 0,05$).

SUMMARY.

Three different types of rennets (bovine, calf and fermentation-derived from *Aspergillus niger*, var. *awamori*, genetically engineered) have been evaluated for the manufacture of Prato cheese, salted at two levels (brine at 16° Be, for 3 and 6 hours) and ripened for 6, 36 and 66 days (12°C and 90% relative moisture).

The evaluation of fat recovery (%) shows no significant differences ($p < 0.25$) for milk samples treated with calf and fermentation-derived rennets (87.35%). However, this value was greater than the one obtained for bovine rennet (85.55%) (significantly different at $p < 0.25$).

The values for the recovery of total solids (TS) were 50.20%, 49.48% and 49.01% for calf, fermentation-derived and bovine rennets, respectively. There was significant differences among treatments ($p < 0.25$).

Results from yield determinations (TS g/L of milk) show greater value for calf rennet (64.67), followed by fermentation-derived (64.13) and bovine rennets (63.53); these values were statistically different ($p < 0.25$).

Water soluble (pH 4.6) and trichloroacetic acid (TCA) 12% soluble nitrogen values increased gradually during ripening, as well as tyrosine content. There were no significant differences among the treatments and salt content did not seem to have played a role concerning the intensity of protein breakdown during ripening ($p < 0.05$). This is probably due to the similarity observed in the A_w values of the cheeses.

The electrophoretic patterns revealed that β -casein was quite resistant to breakdown during ripening, however α_{s1} -casein was extensively degraded and the most intense degradation was found in cheeses manufactured with bovine rennet. The least amount of breakdown was observed in cheeses made with fermentation-derived rennet, indicating that pepsin may have played an important role in proteolysis during ripening.

Results from sensory evaluation indicated no differences among cheeses made with different rennets ($p < 0.05$).

1. INTRODUÇÃO.

A fabricação de queijos desempenha papel importante na economia brasileira, movimentando cerca de 1,4 bilhão de dólares anualmente. Em 1990, o Brasil produziu cerca de 350 mil toneladas de queijos, sendo que o queijo Prato e as suas variedades corresponderam a 28% deste total. Um dos defeitos mais comuns no queijo Prato é o desenvolvimento de gosto amargo. Trata-se de um problema complexo, cujas origens estão ligadas aos papéis desempenhados pelo coalho e pelos fermentos lácticos durante a maturação (DESMAZEAUD & GRIPON, 1977; STADHOUDERS & HUP, 1975). De acordo com GUIGOZ & SOLMS (1976), o gosto amargo é decorrente da formação e acúmulo de peptídios de baixo peso molecular, com alto grau de hidrofobicidade. STEELE & UNLU (1992) e LEMIEUX & SIMARD (1991) demonstraram a relação entre a formação destes componentes amargos e a degradação da β -caseína durante a maturação. Esta caseína é, geralmente, muito resistente à proteólise. Entretanto, sob a influência de diversos fatores, como a composição do coalho (especialmente o teor de pepsina bovina) e teores de sal e pHs baixos, a fração β da caseína pode ser mais degradada, aumentando a incidência de gosto amargo no queijo (FOX, 1988).

Os coalhos produzidos no Brasil são processados à partir de estômagos de bovinos adultos, e apresentam teores de pepsina bovina superiores a 80% (coalho bovino) (RETTL *et alii*, 1992). Esta enzima é menos específica e mais proteolítica que a quimosina (EC 3.4.23.4), predominante no coalho de vitelo, e, em condições favoráveis, pode hidrolisar excessivamente as frações de caseína, promovendo perda de sólidos do leite para o soro, no momento da coagulação, e amargor (VISSER, 1981).

O crescimento da produção mundial de queijos (cerca de 4% ao ano) e o decréscimo da oferta de coalho de vitelo, têm resultado no aumento do preço deste produto no mercado e, conseqüentemente, na busca de produtos alternativos (VISSER, 1993). Técnicas avançadas de biotecnologia viabilizaram a produção de um coalho composto por 100% de quimosina, obtido através de fermentação por microrganismos transgênicos (HARBOE, 1992). O coalho obtido por fermentação apresenta algumas vantagens, se comparado aos coalhos tradicionais, incluindo pureza, oferta constante no mercado, custo reduzido e

elevada eficiência de rendimento (BARBANO & RASMUSSEN, 1992; TEUBER, 1990), e é hoje empregado em cerca de 60% dos laticínios americanos.

No Brasil, seu uso é ainda incipiente, e não existem referências de estudos do seu desempenho na fabricação de variedades brasileiras de queijo. Desta maneira, realizou-se o presente trabalho com os seguintes objetivos:

- a. avaliar o efeito do uso deste coalho no rendimento da fabricação;
- b. estudar o comportamento da quimosina produzida por fermentação durante a maturação dos queijos e seu papel na proteólise das frações de caseína;
- c. avaliar a eventual influência do coalho (100% de quimosina) na diminuição da incidência de gosto amargo.

2. REVISÃO.

2.1. O FENÔMENO DA COAGULAÇÃO DO LEITE.

A função primária do coalho é iniciar a coagulação do leite. O processo de coagulação inclui dois estágios: as fases primária e secundária. Na primeira fase da coagulação ocorre a clivagem específica do glicomacropéptido hidrofílico das moléculas de κ -caseína (κ -CN), localizadas na periferia das micelas de caseína. Esta clivagem ocorre preferencialmente no sítio Phe105-Met106 da κ -caseína, altamente suscetível à hidrólise por proteinases ácidas, resultando no aparecimento de para- κ -caseína e glicomacropéptidos (FOX, 1988). Na sua forma intacta, as micelas de caseína são mantidas coloidalmente dispersas no leite por repulsões de natureza estérica e eletrostática, envolvendo o glicomacropéptido negativamente carregado das moléculas de κ -caseína. Quando esta barreira repulsiva é retirada enzimaticamente com a remoção do glicomacropéptido, as micelas tornam-se instáveis e, em temperatura adequada ($\pm 30^{\circ}\text{C}$), a para- κ -caseína começa a coagular-se sob a influência dos íons Ca^{2+} do meio (fase secundária da coagulação) (VISSER, 1993).

A quimosina, principal componente enzimático do coalho de vitelo, é uma excelente enzima coagulante, e sua atividade é altamente específica. Outras enzimas proteolíticas empregadas como coagulantes, como as pepsinas e as enzimas microbianas, também atuam na posição Phe105-Met106 da κ -caseína, porém, com menor especificidade pelo substrato, o que pode ocasionar efeitos indesejáveis durante a maturação (VISSER, 1993).

2.2. COALHOS E COAGULANTES.

Define-se como coalho o extrato de abomaso de animais ruminantes, rico em proteinases ácidas, com atividade coagulante sobre o leite. As demais proteinases de origens diferentes, capazes de coagular o leite sob condições adequadas, são denominadas coagulantes.

Embora haja indícios do uso de proteinases vegetais como coagulantes desde tempos pré-históricos, as proteinases gástricas de vitelos, cabritos ou cordeiros têm sido tradicionalmente usadas como coalhos (FOX, 1988).

O coalho extraído do abomaso de vitelos contém aproximadamente 80% de quimosina e 20% de pepsina bovina. Nos coalhos extraídos de animais já adultos, esta proporção se inverte, sendo o teor de pepsina bovina superior a 80% e o de quimosina inferior a 20%. Quase a totalidade dos coalhos utilizados no país é extraída do abomaso de bovinos adultos e contém, em geral, mais de 85% de pepsina bovina (RETTL *et alii*, 1992).

A ação da quimosina sobre uma cadeia peptídica é semelhante à da pepsina bovina, porém bem mais específica. Uma série de publicações compara a atividade proteolítica da quimosina à da pepsina. Na maioria destes trabalhos, a quimosina é apontada como uma enzima menos proteolítica que a pepsina (FOX, 1988 e VISSER, 1981), embora LAWRENCE *et alii* (1987) afirmem o contrário. Além disto, a quimosina atua numa faixa mais ampla de pH. Sendo assim, embora a experiência tenha demonstrado que o uso de coalhos com alto teor de pepsina possa resultar em queijos de alta qualidade, o coalho mais adequado à produção de queijos é o coalho de vitelo.

O crescimento da produção mundial de queijos (cerca de 4% ao ano) e o decréscimo da oferta de coalho de vitelo, têm resultado no aumento do preço deste produto no mercado e, conseqüentemente, na busca de possíveis produtos alternativos (VISSER, 1993). Existe hoje um grande número de substitutos potenciais de coalhos, como os coagulantes de origem animal, microbiana e vegetal. Contudo, a aplicação destas enzimas na coagulação do leite pode resultar em inconvenientes, como a redução do rendimento da fabricação (decorrente da intensa atividade proteolítica destas enzimas) e o aparecimento de defeitos de aroma e sabor (especialmente o gosto amargo). Dentre os coagulantes disponíveis no mercado, apenas cinco têm sido considerados razoavelmente aceitáveis para algumas variedades de queijos: a pepsina suína e a avícola e as proteinases ácidas de *Mucor miehei*, *M. pusillus* e *Endothia parasitica* (FOX, 1988).

A pepsina de aves é o menos adequado destes coagulantes, sendo amplamente usado apenas em Israel e, numa menor extensão, na Checoslováquia. A pepsina suína é uma protease muito ácida, sensível a $\text{pH} > 6,6$, e pode ser extensamente desnaturada durante o processamento do queijo, contribuindo pouco para a proteólise durante a maturação. Embora uma mistura 50:50 de pepsina suína e quimosina dê geralmente resultados aceitáveis, a pepsina suína tem estado fora de muitos mercados. No Brasil, este coagulante é pouco usado, sendo empregado eventualmente na fabricação de queijos frescos. O uso de enzimas coagulantes de origem microbiana ganhou espaço nos últimos anos. Atualmente, são oferecidas no mercado enzimas obtidas de três tipos diferentes de fungos: *Mucor miehei*, *M. pusillus* e *Endothia parasitica*. As proteinases destes mofos têm características diferentes entre si, mas têm em comum, se comparadas com os coalhos, atividade proteolítica mais acentuada. As especificidades proteolíticas destes coagulantes são diferentes da especificidade dos coalhos, mas a aceitação de muitas variedades de queijos feitos usando estes coagulantes tem sido razoavelmente boa. Os coagulantes microbianos são largamente usados nos Estados Unidos, mas o coalho de vitelo é sempre predominante na maioria dos países europeus e na Nova Zelândia.

As enzimas vegetais têm sido pesquisadas há mais tempo que as microbianas, mas até o momento não se encontrou nenhuma que pudesse, satisfatoriamente, substituir as de origem animal ou mesmo microbiana. Estas enzimas vegetais têm uma atividade proteolítica acentuada em relação ao seu poder coagulante, e provocam defeitos na massa e gosto amargo ou anormal. Chegou-se a usar, entre outras, a ficina, a bromelina e a papaína, com pouco sucesso (RETTL *et alii*, 1992; FOX, 1988).

2.3. RENDIMENTO.

O rendimento na fabricação de queijos pode ser definido como a quantidade de queijo com determinado teor de umidade, produzido a partir de um peso fixo de leite, com um dado conteúdo de gordura (KOSIKOWSKI, 1982a,b).

O elevado custo da produção de queijos e o aumento gradativo dos preços das matérias-primas e de energia têm evidenciado a necessidade da otimização

do rendimento de produção na indústria queijeira (BANKS *et alii*, 1981). Pequenas diferenças de rendimento podem determinar a economicidade do processo.

Segundo BANKS *et alii* (1981), os principais fatores que afetam o rendimento do queijo são: a composição do leite, em especial a quantidade de gordura e caseína; a porcentagem de transição dos constituintes do leite para o queijo e a quantidade de umidade retida no queijo. Outros autores, como VAN SLYKE, BABCOCK e SHUTTLEWORTH (citados por EMMONS *et alii*, 1990) também relacionam o rendimento do queijo à quantidade de gordura e caseína do leite. Ainda podem ser citados como fatores que contribuem para o rendimento do queijo a incorporação de sais insolúveis e proteínas solúveis, e a concentração de sal (NaCl) adicionado à massa (KOSIKOWSKI, 1982a,b). Os tratamentos térmico e mecânico aplicados ao leite e ao coágulo, durante o processamento, também influenciam de modo sensível o rendimento.

Um método eficiente para estimar o rendimento da produção de queijos baseia-se nas cifras de transição dos principais constituintes do leite para o queijo (FURTADO & WOLFSCHOON-P, 1978). Estabelecendo-se índices ideais de recuperação para gordura e caseína, é possível fazer-se uma estimativa do rendimento em queijo para uma determinada quantidade de leite cru. A literatura sugere uma série de fórmulas para estimativa de rendimento. A eficiência da operação pode ser medida comparando-se os resultados de produção com o rendimento teórico. A recuperação de gordura e caseína pode ser otimizada para o sistema, e o conteúdo de umidade do queijo pode ser manipulado pela alteração da tecnologia de processamento (PHELAN, 1981).

2.4. COALHO OBTIDO POR FERMENTAÇÃO.

A produção de quimosina por fermentação envolve avançados processos de engenharia genética. Inicialmente, o RNA mensageiro (mRNA), contendo a sequência de bases (ou gene) codificada para a produção de proquimosina, é isolado das células do abomaso de bezerros e transcrito, com o auxílio da enzima transcriptase reversa, a DNA complementar (cDNA). O cDNA contém a sequência de nucleotídeos responsável pela sequência correta de aminoácidos

da proquimosina, sem as sequências de introns presentes no DNA natural desta enzima. A ausência de introns possibilita a clonagem e expressão do DNA por bactérias e fungos. Uma vez determinada a sequência de bases do gene da proquimosina, o cDNA pode ser obtido por síntese bioquímica (TEUBER, 1990; STRYER, 1988).

O passo seguinte à obtenção do cDNA é sua incorporação (clonagem) a um vetor de expressão, por sua vez inserido em um microrganismo hospedeiro. Um grande número de plasmídios pode ser utilizado como vetor de expressão; a escolha do vetor é definida pelo microrganismo empregado como hospedeiro. Microrganismos como *Escherichia coli* K12, *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus niger* var. *awamori* vêm sendo utilizados como hospedeiros na produção industrial de coalhos, embora várias outras espécies de bactérias (como *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*) e fungos (como *Saccharomyces cerevisiae*) prestem-se a este fim (TEUBER, 1990; FOX, 1988).

Especificamente no caso do coalho "Chymogen", o cDNA da proquimosina é inserido no vetor de expressão imediatamente depois da região codificada para a glicoamilase do *Aspergillus niger* var. *awamori*. O vetor de expressão é então incorporado, por transformação, ao *Aspergillus niger* var. *awamori*, que passa a integrar a unidade de expressão ao seu genoma. A expressão do cDNA da proquimosina é controlada pelo sistema promotor/inibidor da glicoamilase. Assim, a unidade de expressão construída promove a expressão e secreção do complexo glicoamilase-proquimosina (HARBOE, 1992; TEUBER, 1990). A formação de quimosina ocorre provavelmente por um mecanismo autocatalítico de ativação (FOLTMANN, 1987). Durante a fermentação, o complexo glicoamilase-proquimosina é totalmente processado à quimosina ativa, como consequência do pH relativamente baixo do meio de fermentação.

A produção de quimosina em escala industrial envolve um processo fermentativo baseado em substratos de qualidade alimentícia, acompanhado por procedimentos convencionais de fermentação. Concluída a fermentação, as células fúngicas são inativadas no fermentador e a quimosina é recuperada do fermentado por métodos convencionais de purificação de proteínas, incluindo tratamento ácido (que assegura a degradação de qualquer DNA residual), cromatografia gasosa e ultrafiltração (HARBOE, 1992).

A quimosina produzida por fermentação é idêntica, química e funcionalmente, à quimosina do coalho de vitelo. Quanto às propriedades tecnológicas, a atividade hidrolítica sobre a caseína, durante o processo de coagulação, e a característica e o grau de proteólise na maturação (responsável pelo desenvolvimento de sabor e textura no queijo) são indistinguíveis nestas duas enzimas. Em relação aos parâmetros intrínsecos ao processamento de queijos, como acidez, teor de cálcio e temperatura, novamente estas enzimas comportam-se de maneira similar.

Embora o coalho produzido por fermentação seja referido como idêntico ao coalho de vitelo, existe entre eles diferenças em três pontos. Primeiramente, o coalho obtido por fermentação é composto unicamente por quimosina, enquanto o coalho de vitelo tradicional contém, além de enzimas, estruturas protéicas sem atividade enzimática. Em segundo lugar, o coalho de vitelo tradicional é composto por três enzimas: quimosina e pepsina bovina I (gastricsina) e II, encontradas na proporção aproximada de 80% de quimosina, 3% de gastricsina e 17% de pepsina bovina II (FERSHT, 1985; FOLTMANN, 1987; ALAIS, 1984). A literatura recente tem relatado a importância da pepsina bovina para a correta maturação do queijo. Alguns testes realizados com quimosina produzida por fermentação têm confirmado esta afirmação. Como consequência disto, tem sido desenvolvido um produto no qual a pepsina bovina é adicionada à quimosina produzida por fermentação, com a intenção de se obter um efeito mais próximo ao do coalho de vitelo na maturação de queijos (HARBOE, 1990). Um terceiro ponto a ser ressaltado refere-se ao tipo de quimosina encontrado nestes dois coalhos. O coalho animal contém uma mistura de quimosinas A, B e C na proporção aproximada de 30:55:15. Alguns animais produzem a quimosina A, outros a quimosina B. A quimosina C é um produto da degradação da quimosina A, e apresenta baixa atividade específica (30% da atividade específica da quimosina A). As quimosinas A e B diferem entre si por apenas um aminoácido. Esta única diferença confere à quimosina A uma atividade específica de 15-20% mais alta que a da quimosina B, especialmente a pHs mais baixos. Quanto à especificidade destas enzimas, supõe-se que a quimosina A seja ligeiramente, porém não significativamente, mais específica que a quimosina B, embora não haja comprovação experimental para esta suposição. Por outro lado, a quimosina B é um produto mais estável (HARBOE, 1992). No coalho obtido por fermentação, não ocorre a mistura de mais de um

tipo de quimosina; ele é composto exclusivamente pelo tipo A ou B.

A produção de quimosinas por fermentação está hoje num estágio comercial. Experimentos com produção de queijos em larga escala têm apresentado resultados satisfatórios. Um número razoável de trabalhos científicos comparou o uso de coalhos tradicionais e obtidos por fermentação em diversas variedades de queijos. A utilização do coalho produzido por *Kluyveromyces lactis* foi testada nas variedades italianas Parmigiano Reggiano, Grana Padano e Montasio. Não foram observadas diferenças significativas no rendimento, textura, aroma e sabor entre os queijos elaborados com coalho de vitelo e obtido por fermentação (DISEGNA *et alii*, 1991; CORRADINI *et alii*, 1990). Trabalhos recentes avaliaram as características organolépticas, os níveis de nitrogênio solúvel e os eletroforetogramas de queijos Cheddar maturados. Não foram encontradas diferenças significativas entre os queijos fabricados com os coalhos de vitelo e de *Kluyveromyces lactis* (FOX, 1988). BROOME & HICKEY (1990) e HICKS *et alii* (1988) reportaram resultados satisfatórios para queijos Cheddar testados com quimosina produzida por *Escherichia coli*, comparados com queijos produzidos com coalho de vitelo. BROOME & HICKEY (1990) não evidenciaram diferenças de consequências práticas na manufatura e nas análises composicionais, microbiológicas e de atividade proteolítica dos queijos, mas observaram um aumento significativo ($p < 0.025$) no rendimento e na atividade residual do coalho nos queijos elaborados com coalho obtido por fermentação. Por outro lado, os resultados do trabalho realizado por BANKS (1992), comparando os coalhos de vitelo e obtido por fermentação, não mostraram diferença significativa entre os tratamentos em termos de rendimento. BARBANO & RASMUSSEN (1992) obtiveram resultados semelhantes num estudo comparativo da utilização de coalho bovino, de vitelo e produzido por *Escherichia coli* na fabricação de queijo Cheddar. O trabalho concluiu que o rendimento foi similar nas fabricações onde se empregou os coalhos de vitelo e produzido por fermentação. Entretanto, o rendimento da fabricação com coalho bovino foi 0.39% menor se comparado aos outros dois processos.

Queijos tipo Gouda foram elaborados com a utilização de coalhos de vitelo e produzido por *Kluyveromyces lactis*. Observou-se um comportamento de coagulação ligeiramente diferente entre os tratamentos, devido à presença de

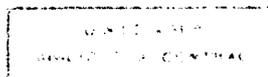
pepsina bovina no coalho tradicional; porém, o rendimento, a composição e a proteólise durante a maturação foram similares nos dois queijos (VAN DEN BERG & KONING, 1990).

O desempenho do coalho obtido por fermentação tem sido testado em provas de produção ainda em muitas outras variedades de queijos, como Emmental, Appenzell, Edam, Tilsit, St Paulin, Camembert, Italico e Crescenza, entre outros (PRAANING VAN DALEN, 1992).

2.5. MATURAÇÃO E PROTEÓLISE EM QUEIJOS.

O processo de maturação de queijos envolve uma série de eventos químicos, bioquímicos e microbiológicos e, como resultado destes eventos, os principais constituintes do queijo (proteínas, lipídios e lactose residual) são degradados a produtos primários e secundários. Entre os produtos de degradação isolados de muitas variedades de queijos maturados, estão os peptídios, aminoácidos, tióis e tioésteres (de proteínas), ácidos graxos, metilcetonas, lactonas e ésteres (de lipídios), ácidos orgânicos (ácido láctico, acético, propiônico), dióxido de carbono, ésteres e álcoois (da lactose). Nas combinações diretas, estes compostos são responsáveis pelo "flavor" característico de vários queijos.

Enquanto a lipólise e a glicólise são críticas para algumas variedades de queijos, como queijos azuis, variedades italianas duras e queijos tipo Suíço, a proteólise é essencial a todas as variedades, especialmente àquelas maturadas por bactérias internas e superficiais, nas quais é provavelmente o principal evento bioquímico durante a maturação (VISSER, 1993). A proteólise contribui para a maturação do queijo de, pelo menos, quatro formas: (1) pela contribuição direta em "flavor" ou "off flavor" como, por exemplo, amargor, ou indiretamente via catabolismo de aminoácidos a aminas, ácidos, tióis, tioésteres, etc.; (2) pelo aumento da liberação de compostos com sabor durante a mastigação; (3) alterando o pH, via formação de NH_3 e (4) modificando a textura através da quebra da rede protéica, aumento do pH e da ligação de água e formação de grupos amina e carboxila.



2.6. PAPEL DOS AGENTES PROTEOLÍTICOS EM QUEIJOS.

Quatro , e em algumas variedades cinco , agentes estão envolvidos na maturação do queijo : (1) coalho ou seu substituto ; (2) enzimas naturais do leite (plasmina); (3) fermento bacteriano e suas enzimas , que são liberadas depois da lise das células ; (4) fermentos secundários , por exemplo , bactérias propiônicas , *Brevibacterium linens* , leveduras , mofos (*Penicillium roqueforti* e *P. candidum*) e suas enzimas , que são de grande importância em algumas variedades , e (5) bactérias contaminantes , isto é , microrganismos que sobreviveram à pasteurização do leite ou ganharam acesso ao leite pasteurizado ou ao coágulo durante a manufatura (FOX, 1988.) Apenas cerca de 6% do coalho adicionado ao leite são retidos na massa (no caso de queijos tipo Gouda, cerca de 10%, segundo VISSER, 1993.) A quantidade retida é influenciada pelo tipo de coalho (algumas enzimas são extensamente desnaturadas durante a fabricação do queijo, como a pepsina suína), pelo pH (que quando baixo favorece a retenção de quimosina , mas não de pepsinas e coagulantes microbianos, além de reduzir sua desnaturação) ; e pela temperatura de cozimento. A plasmina, por sua vez, está presente em quantidades significativas nas variedades de queijos que, durante seu processamento, sofrem tratamentos térmicos mais intensos, e apresentam valores mais elevados de pH durante a drenagem da massa. Em qualquer variedade de queijo, as concentrações das diferentes proteinases e peptidases bacterianas dependem das culturas de fermento empregadas, da extensão do seu crescimento e lise, e do número de bactérias contaminantes presentes.

O principal processo de proteólise que ocorre na maturação de um queijo parece envolver a degradação inicial, relativamente limitada, da caseína pelo coalho e pela plasmina. Os polipeptídios produzidos por esta degradação são então decompostos a peptídios pequenos e aminoácidos pelo sistema proteinase/peptidase das bactérias do fermento e contaminantes.

O coalho desempenha um importante papel na degradação inicial da α_{s1} -caseína, que em solução possui várias ligações suscetíveis à quimosina, a hidrólise das quais é dependente do pH e da concentração de NaCl do queijo. As enzimas do coalho hidrolisam prontamente a α_{s1} -caseína em queijos tipo Cheddar e holandeses (FOX,1988), embora a quimosina, particularmente, seja

pouco efetiva na proteólise de outras frações da caseína (FARKEY & FOX, 1990; LAWRENCE *et alii*, 1987; DESMAZEAUD & GRIPON, 1977). Dois fatores estão envolvidos neste processo: a especificidade da enzima e a acessibilidade das ligações peptídicas à enzima. A quimosina cliva predominantemente as ligações nas quais estão presentes os aminoácidos leucina e fenilalanina, mas degrada a α_1 caseína no queijo mais extensamente que a β -caseína, cujas ligações suscetíveis à ação desta enzima estão menos acessíveis. A β -caseína é muito resistente à proteólise em queijos maturados por bactérias. Embora a concentração de β -caseína nestes queijos diminua durante a maturação, os β -peptídios normalmente produzidos pelo coalho não aparecem, sugerindo que a plasmina e/ou proteinases bacterianas sejam as causadoras desta degradação (FOX, 1988). Na maioria das variedades de queijos, parte da β -caseína permanece intacta ao final da maturação, excetuando-se as variedades curadas por mofos internos.

A κ e a α_2 -caseína são proteínas que, por conterem cistina, possuem ligações dissulfídicas determinando sua estrutura, o que pode explicar sua insensibilidade ao ataque da quimosina. Desta forma, tanto a κ -caseína quanto a α_2 -caseína permanecem intactas em queijos maturados por bactérias (FOX, 1988; LAWRENCE *et alii*, 1987; WOLFSCHOON-P, 1983).

Em queijos contendo pouco ou nenhum coagulante residual, a plasmina parece ser responsável pela degradação inicial das caseínas. A plasmina é uma enzima específica para ligações peptídicas da extremidade C-terminal de resíduos lisina e arginina, particularmente na β e α_2 -caseína. A forte susceptibilidade da α_2 caseína tem sido relacionada com seu elevado conteúdo de resíduos de lisina.

De maneira geral, os fermentos lácticos empregados na fabricação de queijos não são capazes de degradar a α_1 caseína. As proteinases dos *Lactococcus lactis* var. *lactis* e *L. lactis* var. *cremoris* são, quase sem exceção, específicas para a β -caseína (WOLFSCHOON-P, 1983). Especula-se que esta especificidade esteja relacionada ao alto teor de prolina das caseínas.

As proteinases de diferentes origens também agem sinergisticamente. Por exemplo, os produtos da degradação da β -caseína, liberados pelo coalho ou

pela plasmina, são decompostos pelos sistemas proteinase/peptidase do fermento. As bactérias lácticas contêm até três diferentes peptidases específicas para prolina, das quais a mais importante é a prolildipeptidilpeptidase. A presença de aminopeptidase-P e peptidases específicas para prolina em todas as três espécies de *Streptococci* do grupo N, parece permitir a hidrólise completa de todos os polipeptídios, derivados da degradação primária das caseínas, a aminoácidos (LAWRENCE *et alii*, 1987).

2.7. EFEITO DO TEOR DE SAL NA PROTEÓLISE.

A atividade proteolítica das enzimas do fermento e do coalho é fortemente influenciada pelo conteúdo de sal no queijo.

O sal interfere acentuadamente na atividade proteolítica das enzimas da parede celular e intracelulares dos microrganismos do fermento (VISSER *et alii*, 1983a), sendo capaz de influenciar a formação/degradação de peptídios amargos e de retardar o aparecimento de sabor amargo no queijo (STADHOUDERS *et alii*, 1983).

O crescimento de *Lactococci* é marcadamente inibido a níveis de sal/umidade superiores a 4,90%, o que leva a crer que o efeito do sal seja mais específico no fermento. LAWRENCE & GILLES (1969) mostraram que teores elevados de sal/umidade reduzem a incidência de amargor em queijos produzidos com fermentos "amargos". Este efeito se dá pela ação inibitória do NaCl na degradação da β -caseína pelas proteinases bacterianas e do coalho. EXTERKATE (1983) confirmou o papel essencial do sal na degradação de peptídios amargos pelas enzimas do fermento. O sal pode agir na parede celular e nas estruturas da membrana dos microrganismos do fermento, diminuindo a acessibilidade das enzimas bacterianas, ou ter um efeito inibitório direto em várias enzimas proteolíticas (VISSER *et alii*, 1983b).

De acordo com STADHOUDERS (1962), citado por LEMIEUX & SIMARD (1991), a atividade do coalho é ótima a pH 5,2 e concentrações de sal próximas a 3%, decrescendo acentuadamente em concentrações superiores a 5%. Até determinado nível, o sal exerce efeito estimulante na atividade do coalho, uma vez que

aumenta a solubilidade da paracaseína, tornando o substrato diretamente acessível à enzima (LEMIEUX & SIMARD, 1991).

A quimosina degrada a α_{s1} -caseína mais extensamente que a β -caseína. Isto é uma consequência da influência da composição do queijo, especialmente do nível de NaCl, na conformação da proteína. A agregação da β -caseína induzida pelo sal e a consequente inacessibilidade das ligações da região hidrofóbica C-terminal, sensíveis à quimosina, são intensificadas pelo aumento do teor de sal/umidade do queijo (FOX, 1989 ;LAWRENCE *et alii*, 1987).

NOOMEN (1978), citado por GRAPPIN *et alii* (1985), reportou uma pequena degradação da β -caseína (10-20%) em queijos com 4% de sal/umidade, entre os limites de pH de 4,85-5,75, sendo a hidrólise acentuada pelo aumento do pH. Na ausência de sal, mais de 40% da β caseína foram degradados (pH 5,0). DE JONG & DE GROOT MOSTERT (1977) sugeriram que baixas concentrações de sal/umidade (<3-4%) aumentam a hidrólise da β -caseína. Segundo FOX (1988), a proteólise da β -caseína pela quimosina ou pepsina é significativamente reduzida a 5%, e completamente inibida a 10% de NaCl.

O grau de proteólise da α_{s1} -caseína é máximo na presença de 5-10% de NaCl, de acordo com FOX (1988). NOOMEN (1978), citado por GRAPPIN (1985), e STADHOUDERS (1962), citado por LEMIEUX & SIMARD (1991), afirmam que a degradação da α_{s1} -caseína (pH 5,2) é estimulada por um aumento gradativo do teor de sal/umidade até o nível ótimo de 4%, acima do qual o efeito passa a ser de inibição.

Experimentos com queijos tipo Cheddar mostraram existir uma estreita relação entre o baixo conteúdo de sal/queijo e o aparecimento de um gosto amargo característico (TUCKEY & RUEHE, 1940). PHELAN *et alii* (1973) trabalharam com queijos tipo Cheddar com elevado teor de umidade e concentrações de sal inferiores a 1,6%. Estas condições promoveram uma extensa proteólise, causando gostos amargos e pútridos. LAWRENCE & GILLES (1969) e STADHOUDERS (1962), citado por LEMIEUX & SIMARD (1991), observaram um decréscimo no amargor em queijos Cheddar com teores de sal superiores a 4,90%.

THOMAS & PEARCE (1981) estudaram o efeito do teor de sal/umidade na degradação das α_{s1} e β -caseínas, em queijos Cheddar com um mês de maturação. No tratamento com teor de sal/umidade de 4%, aproximadamente 5% da α_{s1} -caseína e 50% da β -caseína permaneceram intactos. A mesma tendência foi observada para o tratamento com 6% de sal/umidade, onde 30% da α_{s1} e 80% da β -caseína não foram hidrolisados, e para o tratamento com 8% de sal/umidade, onde os respectivos valores foram de 60 e 95%.

Na variedade egípcia Kaskaval, MONEIB & SAFWAT (1972) reconheceram um leve amargor no gosto de queijos com concentrações de sal inferiores a 4%; porém, este efeito não se manifestou a níveis de sal entre 4-5%. Do mesmo modo, os resultados de KELLER *et alii* (1974) com queijos tipo Mussarela, sugeriram que o desenvolvimento de amargor poderia ser inibido pelo aumento do conteúdo de sal do queijo.

A literatura confirma a tendência de redução de sabor amargo, por influência do teor de sal, em queijos tipo Gouda. Também nestas variedades, quanto maior o conteúdo de sal, menor a intensidade de gosto amargo (STADHOUDERS & HUP, 1975). Dos estudos de STADHOUDERS *et alii* (1983), conclui-se que o efeito inibitório do sal na formação de peptídios amargos, supera seu efeito de mascarar gostos amargos. VISSER & DE GROOT-MOSTERT (1977), citados por GRAPPIN *et alii* (1985), indicaram a presença de produtos da degradação da β -caseína em queijos Gouda (assépticos, isentos de fermento) com 6 meses de maturação, quando elevadas quantidades de coalho foram empregadas. Com quantidades normais de coalho, cerca de 60% da β -caseína permaneceram intactos.

2.8. EXTENSÃO E PROFUNDIDADE DE PROTEÓLISE.

O uso da proteólise como um índice de maturação é comumente adotado para muitas variedades de queijos, e envolve a separação, quantificação e caracterização dos componentes nitrogenados do queijo durante a cura (FARKEY & FOX, 1990).

Os termos "extensão" e "profundidade" de proteólise foram sugeridos por BONDZYNSKI, citado por WOLFSCHOON-P (1983), em 1894. A extensão da proteólise, ou índice de maturação, caracteriza-se pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis (NS), acumuladas durante o processo de degradação de proteína, e expressas 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 alii* (1975), citados por DESMAZEAUD & GRIPON, (1977), 28% da fração solúvel a pH 4,6 é composta por peptídios com pesos moleculares inferiores a 3000 Da; 50% por peptídios com pesos moleculares entre 3000 e 5000 Da e 20% por peptídios com pesos moleculares superiores a 5000 Da.

A profundidade da proteólise abrange as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular (como aminoácidos, oligopeptídios, aminas, etc.), acumuladas durante o processo. A profundidade pode ser quantificada pelo teor de nitrogênio não protéico (NNP), solúvel em ácido tricloracético (TCA) a 12%, ou pela determinação direta dos aminoácidos produzidos e expressos como percentual da proteína solúvel total:

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

A ação enzimática do coalho estende-se por todo o período de maturação do queijo, produzindo peptídios de altos (e eventualmente baixos) pesos moleculares, porém sem chegar à produção de aminoácidos (WOLFSCHOON-P, 1983). Em outras palavras, o coalho é responsável pela produção de grande parte do nitrogênio solúvel em água ou a pH 4,6 em queijos maturados, embora pouco

nitrogênio solúvel em TCA seja resultante de sua ação (FOX,1988). Experimentos com queijos tipo St. Paulin assépticos mostraram que a liberação de peptídios pela ação exclusiva do coalho foi tão efetiva que os valores de nitrogênio solúvel obtidos foram comparáveis àqueles encontrados em queijos St. Paulin convencionais (DESMAZEAUD & GRIPON, 1977). Isto equivale a dizer que a extensão da proteólise deve-se principalmente à ação proteolítica do coalho sobre as caseínas do queijo.

As proteinases e peptidases do fermento láctico atuam sobre os peptídios liberados, principalmente, pelo coalho, produzindo aminoácidos e compostos de baixo peso molecular. Logo, o índice de profundidade de proteólise relaciona-se à atividade proteolítica do fermento na maturação de queijos (ARDO & MANSSON, 1990; DESMAZEAUD & GRIPON, 1977). JARRETT *et alii* (1982), citados por FARKEY & FOX (1990), encontraram uma correlação altamente significativa ($p < 0,001$) entre a idade e a intensidade de "flavor" em queijos Cheddar e seu teor de nitrogênio solúvel em TCA.

2.9. GOSTO AMARGO EM QUEIJOS.

O gosto amargo em alimentos pode ser consequência da ocorrência natural de componentes amargos, ou resultante de reações químicas ocorridas durante o processamento ou a estocagem do produto.

O amargor é um defeito que ocorre com muita frequência em queijos tipo Cheddar e Gouda, decorrente do acúmulo de peptídios de gosto amargo, formados pela ação de enzimas proteolíticas sobre a caseína (STADHOUDERS & HUP, 1975). Os peptídios amargos têm propriedades químicas especiais que possibilitam sua interação com os botões gustativos da região posterior da língua, causando a sensação de amargor. Segundo OKAI (1977), citado por LEMIEUX & SIMARD (1991), os peptídios amargos possuem dois sítios determinantes de gosto amargo, capazes de se ligarem aos receptores da língua. O resíduo hidrofóbico de um peptídio age como um primeiro sítio de ligação, e, na presença de um segundo sítio, chamado sítio de estímulo, o gosto amargo é detectado. A concentração de peptídios amargos no queijo precisa exceder um determinado nível de "threshold", acima do qual o amargor é perceptível.

Aceita-se hoje que o gosto amargo em queijos, produzido durante a hidrólise enzimática da caseína, deve-se a tipos particulares de peptídios. O amargor de peptídios de baixo peso molecular é causado pela propriedade de hidrofobicidade das cadeias laterais de seus aminoácidos, e pode ser predito pela lei proposta por NEY (1971), citado por GUIGOZ & SOLMS (1976), que sugere uma relação semi-quantitativa (chamada hipótese-Q) entre a composição de aminoácidos de um peptídio e seu amargor. Segundo esta lei, todos os peptídios com hidrofobicidades médias (soma da hidrofobicidade do peptídio dividida pelo número de resíduos de aminoácidos) altas, iguais ou superiores a 1400 cal/resíduo, têm gosto amargo. A sequência de aminoácidos num peptídio não tem influência sobre o gosto amargo, embora a natureza dos aminoácidos terminais e seus parâmetros estéricos tenham alguma importância na intensidade de amargor (NEY, 1979).

A intensa degradação da caseína a peptídios de baixo peso molecular (de aproximadamente 1400 Da) pode ocasionar amargor (BIEDE & HAMMOND, 1979; MATOBA & HATA, 1972).

Embora a análise das sequências de aminoácidos das frações da caseína revelem a existência de muitos fragmentos hidrofóbicos que, expostos por uma hidrólise, poderiam provocar amargor, a identificação de peptídios amargos (isolados da caseína integral e de queijos) tem mostrado que estes se originam principalmente das α_{s1} e β -caseínas. Estas duas frações possuem hidrofobicidades médias elevadas (1170 e 1330 cal/resíduo para a α_{s1} e a β -caseína, respectivamente) e, portanto, são fontes potenciais de fragmentos amargos. A porção C-terminal da β -caseína tem um gosto extremamente amargo (VISSER *et alii*, 1983b), e é apontada como a principal fonte de peptídios amargos no queijo Gouda (VISSER *et alii*, 1983b,c). Até agora, não existe qualquer referência da identificação de produtos amargos, decorrentes da degradação da κ -caseína, em queijos, ainda que VISSER *et alii* (1975) tenham reportado que o coalho e a quimosina purificada poderiam gerar peptídios amargos à partir da para- κ -caseína.

Os principais fatores que influenciam o desenvolvimento de gosto amargo em queijos são a proliferação bacteriana no tanque de processamento, e o tipo e quantidade de fermento e coalho empregados na fabricação (LEMIEUX & SIMARD,

1991). Os peptídios amargos são liberados das moléculas de caseína pela ação das proteinases do fermento e do coalho, além da contribuição das peptidases bacterianas, que podem reduzir o tamanho de peptídios inicialmente muito grandes para provocarem amargor. A β -caseína é apontada como a principal fonte de peptídios amargos produzidos pelas proteinases presentes na parede celular das bactérias do fermento (EXTERKATE, 1976), enquanto a quimosina (coalho) pode produzir peptídios amargos de todas as frações da caseína (EXTERKATE, 1983).

O nível final de amargor num queijo deve ser determinado considerando-se a relação entre a formação de peptídios amargos e a degradação destes a produtos não amargos (STADHOUDERS & HUP, 1975). Os peptídios amargos produzidos pela ação do coalho ou das proteinases da parede celular de determinadas bactérias do fermento, podem ser degradados pela ação das enzimas da membrana citoplasmática das células bacterianas, combinadas ou não a enzimas citoplasmáticas (LEMIEUX & SIMARD, 1991).

Fermentos lácticos "não amargos" apresentam baixa atividade proteolítica e, conseqüentemente, degradam peptídios de alto peso molecular (inclusive a β -caseína) mais lentamente que os fermentos "amargos". Além disto, nos fermentos "não amargos" a atividade de peptidase é mais intensa, o que os capacita a hidrolisar peptídios amargos produzidos pela proteólise. JAGO (1962), citado por LEMIEUX & SIMARD (1991), sugeriu que o amargor em queijos poderia resultar da formação do ácido carboxílico pirrolidona na extremidade N-terminal de um peptídio hidrofóbico, derivado da proteólise da caseína. Mais tarde, especulou-se que a presença de uma peptidase carboxil pirrolidona nos fermentos "não amargos", e sua ausência nas "amargos", seria a diferença crítica entre estes fermentos em relação à capacidade de degradação de peptídios amargos.

O coalho, por sua vez, também desempenha um papel importante no desenvolvimento de amargor em queijos. Alguns peptídios produzidos pelo coalho são suficientemente pequenos para influenciar diretamente o gosto. Infelizmente, alguns destes peptídios são amargos e a proteólise excessiva, decorrente, por exemplo, do excesso de coalho ou do uso de coalhos muito proteolíticos, ou ainda, de condições ambientais inadequadas, como umidade

elevada ou baixos teores de NaCl , resultam em amargor. Além disto, os peptídios produzidos pelo coalho servem como substrato para proteinases e peptidases microbianas , que produzem peptídios pequenos e aminoácidos, formadores de "flavor" e amargor em queijos maturados (FOX, 1988). À partir de experimentos com queijos tipo Gouda produzidos assepticamente, VISSER (1977) demonstrou que o coalho tem, como fator isolado, potencial para produzir peptídios amargos. STADHOUDERS & HUP (1975) observaram que a menor retenção de coalho na massa de queijos tipo Gouda diminuiu a intensidade de gosto amargo nos queijos maturados.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

Foram avaliados três tipos de coalho (bovino, de vitelo e obtido por fermentação) e dois níveis de intensidade de salga, na fabricação de queijo Prato. O experimento foi conduzido em três dias consecutivos. A cada dia, seis lotes de queijos eram fabricados simultaneamente, aplicando-se os três tratamentos (tipos de coalho) e os dois subtratamentos (tempo de salga) à mesma matéria-prima.

Cada lote de queijo, resultante dos três dias consecutivos de produção, foi dividido em sub-lotes, por sua vez submetidos a três diferentes períodos de maturação (6, 36 e 66 dias).

3.1. Matérias-primas.

3.1.1. Leite :

O leite usado na fabricação do queijo Prato foi fornecido pelo Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, Minas Gerais.

3.1.2. Fermento:

O fermento empregado neste estudo foi o DVS, tipo "O", nº 703, (HA-LA do Brasil Chr. Hansen's Ind. e Com. Ltda). Trata-se de um fermento mesofílico homofermentativo, composto por múltiplas cepas e múltiplas cepas mistas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *L. lactis* ssp. *cremoris*.

3.1.3. Coalhos:

Foram utilizados no presente trabalho três tipos de coalhos (HA-LA do Brasil Chr. Hansen's Ind. e Com. Ltda.):

- Coalho bovino, obtido à partir do abomaso de bovinos adultos, composto por aproximadamente 20% de quimosina e 80% de pepsina bovina, além de cloreto de sódio.

- Coalho de vitelo, obtido do abomaso de bovinos lactentes, composto por aproximadamente 90% de quimosina e 10% de pepsina bovina, e cloreto de sódio .

- Coalho, produzido por fermentação pelo *Aspergillus niger* var. *awamori* modificado geneticamente, composto por 100% de quimosina tipo B e cloreto de sódio.

3.2. Determinação da atividade coagulante dos coalhos.

Para a determinação da atividade coagulante, utilizou-se a metodologia sugerida por WOLFSCHOON-P. (1980). 100 mg das amostras de coalho foram diluídas em 100mL de água destilada (sol. A). 5 mL destas soluções foram adicionados, sob agitação constante, a 100 mL de leite desengordurado, reconstituído a 9%. O leite adicionado de coalho foi mantido a 35°C, sob agitação lenta e contínua, até ser observado o início do aparecimento de grumos finos. O tempo decorrido entre a aplicação do coalho e a floculação inicial foi aplicado à fórmula para o cálculo da força do coalho:

$$FC = \frac{V \times 2.400.000}{C \times T}$$

onde FC = Força do coalho.

V = Volume de leite usado.

C = mg de coalho contidos em 5 mL da sol. A.

T = tempo (min) entre a adição do coalho e a floculação inicial.

3.3. Tratamento do leite.

Os leites utilizados na fabricação dos queijos, nos três dias de processamento, foram pasteurizados a 73°C por 15 segundos e padronizados quanto ao teor de gordura.

3.4. Fabricação dos queijos.

O processamento descrito a seguir foi repetido durante os três dias de fabricação:

300 kg de leite pasteurizado e resfriado a 34°C, foram pesados e divididos em três tanques de processamento (com 100 kg de leite cada), aos quais adicionou-se 300 ppm de CaCl₂, 80 ppm de urucum e 2% de fermento, sob agitação constante. Após 30 minutos de repouso para a pré-maturação do fermento, a cada tanque foi adicionado um tipo de coalho (bovino, de vitelo e obtido por fermentação), na proporção adequada para que a coagulação se completasse em 45 minutos. Atingindo-se o ponto de corte, determinado pela verificação da resistência do coágulo, efetuou-se o corte em pequenos grãos de 5 mm de aresta, com o auxílio de uma lira, mantendo-se a massa em repouso por 5 minutos.

Procedeu-se então a uma agitação lenta e cuidadosa por 20 minutos, seguida por uma dessoragem parcial da massa (retirou-se o volume de 30 L de soro). À partir de então, iniciou-se o aquecimento gradativo da massa (com o aumento de cerca de 1°C a cada 3 minutos) pela adição gradual de 20 L de água quente, sob agitação constante, alcançando-se a temperatura de 42°C em 25 minutos. Uma vez atingida a temperatura de 42°C, intensificou-se a agitação da massa (por cerca de 30 minutos) até a obtenção do ponto da massa (verificado pela consistência dos grãos), o que ocorreu aproximadamente 80 minutos após o corte do coágulo.

Realizou-se a pré-prensagem da massa no tanque por 15 minutos (aplicando-se uma pressão equivalente a cerca do dobro do peso da massa) e, em seguida, a enformagem. Utilizou-se formas retangulares de 0,5 kg, com

depressoradores, próprias para queijos Prato tipo Lanche. Os queijos foram então prensados em duas fases: na primeira, aplicou-se por 20 minutos uma pressão de 20 lb/pol²; os queijos foram virados, e iniciou-se a segunda fase da prensagem, com uma pressão de 30 lb/pol² por 60 minutos.

Após a prensagem, os queijos resultantes de cada tratamento foram pesados e então divididos em dois lotes, salgados em salmoura (16°Bé) por períodos de tempo diferentes (3 e 6 horas). Quando retirados da salmoura, os queijos permaneceram secando por 24 horas (na própria câmara de maturação) e foram embalados à vácuo em embalagens plásticas impermeáveis termoencolhíveis (CRYOVAC).

Cada lote de queijo sofreu três diferentes períodos de maturação: 6, 36 e 66 dias, em câmaras a 12°C e 90% de UR.

3.5. Análises físico-químicas do leite pasteurizado.

As análises físico-químicas foram efetuadas nos leites pasteurizados utilizados em cada dia de experimento. As determinações foram feitas em triplicata.

3.5.1. Acidez titulável:

A acidez das amostras de leite foi medida utilizando-se o método de titulação da acidez com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença do indicador fenolftaleína, como descrito por ATHERTON & NEWLANDER (1981).

3.5.2. pH:

As medidas de pH foram efetuadas utilizando-se um potenciômetro TECNAL (modelo DMPH-2), previamente calibrado.

3.5.3. Gordura:

O teor de gordura das amostras foi determinado pelo método de Gerber, descrito por ATHERTON & NEWLANDER (1981). Utilizou-se para esta análise uma centrífuga do tipo Gerber da marca FANEM.

3.5.4. Sólidos totais:

A determinação dos teores de sólidos totais (ST) das amostras de leite foi feita pelo método de secagem em estufa a 105°C (estufa de secagem e esterilização, modelo 315-SE, FANEM), como descrito na seção 16.032 da A.O.A.C. (1975).

3.5.5. Densidade:

A densidade das amostras foi determinada pela leitura direta em um termolactodensímetro, corrigindo-se o efeito da temperatura, segundo o método descrito na seção das NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1976).

3.6. Análises físico-químicas do soro.

O soro foi amostrado durante a dessoragem parcial da massa, antes do início do aquecimento por adição de água, em todos os tratamentos.

As determinações de acidez titulável, pH, gordura, sólidos totais e densidade do soro foram feitas em triplicata, seguindo as metodologias descritas nos itens 3.5.1., 3.5.2., 3.5.3., 3.5.4. e 3.5.5. deste capítulo.

3.7. Cálculos das porcentagens de transição de gordura e sólidos totais do leite para o soro.

As porcentagens de transição de gordura do leite para o soro foram

obtidas da seguinte maneira:

a. o volume de leite empregado em cada processamento de queijo foi calculado dividindo-se a massa do leite pela sua densidade;

b. o volume de gordura presente no leite foi obtido multiplicando-se o volume pela porcentagem de gordura do leite;

c. a diferença entre a massa do leite e a soma das massas dos queijos obtidos à partir deste resultou na massa do soro. Dividindo-se a massa pela densidade do soro obteve-se o volume do soro;

d. o volume de gordura presente no soro foi obtido pela multiplicação do volume de soro por sua porcentagem de gordura;

e. da relação entre o volume de gordura do soro e o volume de gordura do leite calculou-se a porcentagem de perda de gordura no soro.

f. a porcentagem de transição de gordura do leite para o queijo resulta da diferença (100% - porcentagem de perda de gordura).

Os cálculos das porcentagens de transição de sólidos totais do leite para o soro, aplicados a todos os processamentos, são os que se seguem:

a. multiplicando-se a massa do leite pela porcentagem de sólidos totais obteve-se a massa de sólidos totais do leite; da mesma forma, a multiplicação da massa do soro pela porcentagem de sólidos totais resultou na massa de sólidos totais do soro;

b. a porcentagem de perda de sólidos totais no soro foi calculada pela relação entre a massa de sólidos totais do soro e a massa de sólidos totais do leite;

c. a porcentagem de transição de sólidos totais do leite para o queijo é o resultado da diferença (100% - porcentagem de perda de sólidos totais).

3.8. Cálculos de rendimento de fabricação.

Os rendimentos das fabricações, expressos em L de leite/kg de queijo, foram calculados pela divisão do volume de leite empregado no processamento pela soma da massa dos queijos obtidos.

Os rendimentos expressos em g de ST de queijo/L de leite foram obtidos da seguinte maneira:

a. multiplicando-se a porcentagem de sólidos totais do queijo por 1000g, obteve-se a massa (em g) de sólidos totais em 1 kg de queijo;

b. a divisão da massa de sólidos totais/kg de queijo pelo volume de leite necessário para a produção de 1 kg de queijo (rendimento em L de leite/kg de queijo) resultou no rendimento em g de ST de queijo/L de leite.

3.9. Análises físico-químicas do queijo.

As análises de composição, assim como as determinações dos índices de atividade de água (A_w), foram realizadas com amostras de queijos dos diferentes tratamentos aos 6 dias de maturação. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

3.9.1. Análises composicionais.

3.9.1.1. Gordura:

O teor de gordura das amostras de queijo foi determinado pelo método de Gerber (utilizando-se uma centrífuga tipo Gerber da marca FANEM), como descrito por KOSIKOWSKI (1977).

3.9.1.2. Sólidos totais:

A determinação dos teores de sólidos totais dos queijos baseou-se no método de secagem em estufa a 105°C (estufa de secagem e esterilização, modelo 315-SE, FANEM), descrito na seção 16.217 da A.O.A.C. (1975).

3.9.1.3. Umidade:

A porcentagem de umidade das amostras de queijo foi calculada pela diferença (100% - porcentagem de sólidos totais do queijo).

3.9.1.4. Gordura no extrato seco:

Calculou-se a porcentagem de gordura no extrato seco (GES) dos queijos, multiplicando-se a massa média de gordura correspondente a 100g de queijo por 100 (g de ST), e dividindo-se o valor resultante pela massa média de sólidos totais referente a 100g de queijo.

3.9.1.5. Nitrogênio total:

O teor de nitrogênio total (NT) das amostras de queijo foi determinado pelo método semimicro Kjeldahl (HILLER *et alii*, 1948). As amostras foram digeridas em bloco aquecedor da marca SARGE, modelo 40-25, e destiladas em equipamento TECNAL, modelo TE-036.

3.9.1.6. Proteína total:

A porcentagem de proteína total (PT) das amostras foi obtida multiplicando-se os valores médios de porcentagem de nitrogênio total pelo fator 6,38.

3.9.1.7. Sal:

O teor de sal dos queijos foi determinado pelo teste de Volhard modificado, descrito por KOSIKOWSKI (1977).

3.9.2. Atividade de água:

A atividade de água (A_w) das amostras foi calculada pela fórmula proposta por ANTUNES (1992), utilizando-se o valor médio do teor de sal/umidade do queijo:

$$A_w = 1,0212 - (0,0123 \times \text{NaCl}/100 \text{ gH}_2\text{O})$$

3.9.3. Análises para acompanhamento do comportamento da proteólise.

As análises descritas a seguir foram realizadas a intervalos de 30 dias (aos 6, 36 e 66 dias), durante a maturação dos queijos dos diferentes tratamentos. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

3.9.3.1. pH.

As medidas de pH das amostras de queijo foram efetuadas utilizando-se um potenciômetro TECNAL, modelo DMPH-2, previamente calibrado.

3.9.3.2. Fracionamento do nitrogênio total.

3.9.3.2.1. Nitrogênio solúvel:

As amostras de queijo solubilizadas em citrato de sódio (0,5 M), foram precipitadas pela adição de ácido clorídrico (1,41 N), baixando-se o pH a 4,6. A filtração desta mistura em papel de filtro WHATMAN nº42, resultou numa solução límpida de citrato de sódio e ácido clorídrico, contendo a fração

hidrolisada da proteína do queijo, solúvel a pH 4,6. O nitrogênio presente nesta solução denominou-se nitrogênio solúvel (NS) (VAKALERIS & PRICE, 1959).

3.9.3.2.2. Nitrogênio não protéico:

As amostras de queijo solubilizadas em citrato de sódio (0,5 M), foram precipitadas na presença de ácido tricloroacético (TCA) a 12%. O filtrado (em papel de filtro WHATMAN n°42) obtido desta precipitação contém peptídios de baixo peso molecular e aminoácidos. O nitrogênio presente nesta fração denominou-se de nitrogênio não protéico (NNP) (GRIPON *et alii*, 1975).

3.9.3.3. Determinação do nitrogênio solúvel e do nitrogênio não protéico.

A determinação do nitrogênio solúvel e não protéico, presentes respectivamente nas soluções obtidas pelos fracionamentos descritos nos itens 3.9.3.2.1. e 3.9.3.2.2., foi realizada pelo método de semimicro-Kjeldahl, descrito por HILLER *et alii* (1948).

3.9.3.4. Tirosina:

O teor de tirosina das amostras de queijo foi determinado pelo método proposto por VAKALERIS & PRICE (1959).

Para cada tratamento, soluções de queijo em citrato de sódio 0,5 M foram precipitadas a pH 4,6, conforme descrito no item 3.9.3.2.1.; a fração solúvel obtida por este processo foi diluída (1:1) em água destilada e submetida à leitura no espectrofotômetro BECKMAN DU-série 70, nos comprimentos de onda de 270 e 290 nm. A concentração de tirosina em mg/100 g de queijo foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Tyr} = 906 (0,95 \times A_{270} - 1,31 \times A_{290})$$

onde:

A₂₇₀ = medida da absorvância lida a 270nm.

A₂₉₀ = medida da absorvância lida a 290nm.

3.10. Cálculo dos índices de extensão e profundidade da proteólise.

Os teores de nitrogênio solúvel e nitrogênio total, determinados segundo as metodologias descritas nos itens 3.9.3.3. e 3.9.1.3., respectivamente, foram aplicados à fórmula apresentada a seguir, que expressa o índice de extensão da proteólise:

$$\text{Extensão} = \frac{\text{NSx } 100}{\text{NT}}$$

O índice de profundidade de proteólise baseia-se no teor de nitrogênio não protéico, determinado conforme descrito no item 3.9.3.3., expresso como porcentagem do nitrogênio total:

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

3.11. Eletroforese.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), na presença de uréia (7M), foi realizada segundo os procedimentos de DAVIS (1964) e MELACHOURIS (1969). Tubos de vidro de 7,5 cm de comprimento com diâmetro interno de 0,5 cm foram lavados, sequencialmente, com detergente, ácido clorídrico, água destilada e Photo-Flo (0,5% p/v). Os tubos foram marcados a distâncias de 6 e 7 cm das extremidades. A eletroforese foi conduzida numa unidade BUCHLER INSTRUMENTS (Fort Lee, N.J., USA) com capacidade para 18 tubos e com circulação de água, em conjunto com uma fonte de voltagem constante. Os sistemas empregados foram: 1) "stacking gel" consistindo de 0,062 M TRIS-HCl, pH 6,7 e 4% de acrilamida e

2) "resolving gel" com 0,380M TRIS-HCl, pH 8,9 e 9% de acrilamida. Nos dois sistemas foram usados tetrametilenodiamina (TEMED) como catalisador e persulfato de amônia (0,5% p/v) e N,N'-metileno-bis-acrilamida para polimerização. Azul de bromofenol (1% p/v) foi usado como indicador do movimento das proteínas. Os géis foram corados em Coomassie Blue G-250 (0,4%) dissolvido em ácido acético-metanol-água (9:45:45) por 12 horas. A solução para descorar os géis consistiu de ácido acético:metanol:água nas proporções de 7,5:25:67,5. Após remoção do corante os géis foram preservados em solução de ácido acético a 7,5%. Todos os reagentes foram da marca SIGMA. A corrente empregada foi de 1,0 mA por tubo durante a migração no "stacking gel" e de 3,0 mA por tubo durante a migração no "resolving gel". Os géis obtidos foram fotografados para efeito de comparação.

Utilizou-se um densitômetro a laser fabricado por PHARMACIA, modelo LKB-ULTRASCAN XL, para quantificar as diversas entidades protéicas. Os resultados obtidos no densitômetro representam as áreas dos picos de cada proteína, as quais são porcentagens da área total das proteínas das diferentes amostras. As diversas entidades protéicas foram tentativamente identificadas por comparação com dados da literatura. As diferenças entre as áreas dos picos (%) das frações α s-caseína aos 6 e 66 dias são referidas como porcentagens de decomposição desta fração.

Preparo das amostras para eletroforese.

Amostras de 2 gramas de queijo cortado em pequenos pedaços foram desengorduradas com porções de 20 mL de éter etílico. Após a adição de éter as amostras foram agitadas com bastão de vidro e deixadas em repouso por 15 minutos. Este processo foi repetido por 4 vezes. O éter foi facilmente decantado ao final de cada extração, não sendo necessária filtração. Após a última extração as amostras foram deixadas sobre papel de filtro, em condições ambiente, até completa evaporação do solvente.

A proteína nas amostras desengorduradas foi dosada utilizando-se o método colorimétrico de LOWRY *et alii* (1965). As amostras foram diluídas em 0,8 mL de água destilada e 2,2 mL de "stacking gel buffer" (0,062M TRIS-HCl -

dissolveu-se 3,154 g de TRIS e 210 g de uréia em cerca de 450 mL de água destilada; adicionou-se HCl até pH 6,7 e completou-se o volume para 500 mL). Deixou-se em banho maria a 37°C por 1 hora. Retirou-se do banho e adicionou-se 15 µl de β-mercaptoetanol. Recolocou-se no banho maria por mais 45 minutos. Adicionou-se uns poucos grãos de sacarose. A quantidade de amostra aplicada em cada tubo foi calculada de tal modo que 10 µl desta solução contivessem em torno de 120 µg de proteína.

3.12. Análise sensorial.

A avaliação sensorial dos queijos foi feita através de um teste de aceitação, utilizando-se uma escala hedônica estruturada de 9 pontos.

Foram analisados os queijos produzidos com três tipos de coalhos (bovino, de vitelo e obtido por fermentação), submetidos a 6 horas de salga. Em três dias consecutivos, foram testados respectivamente os queijos produzidos no 1º, 2º e 3º dias de processamento. Utilizou-se o modelo experimental de blocos completos casualizados, aplicados a trinta provadores não treinados. Os testes foram realizados em cabines individuais, sob luz vermelha (para evitar a interferência da cor na avaliação). As amostras foram apresentadas na forma de cubos de 1,5 cm de aresta, servidos em pires de fundo preto codificados (à temperatura ambiente).

3.13. Análise estatística.

O desenho experimental adotado foi o split-plot. Os tratamentos e subtratamentos foram aplicados de forma aleatória na fabricação dos queijos; isto se repetiu independentemente em três dias distintos. Portanto, o experimento foi replicado em blocos completos.

Dentre os dados correspondentes às análises composicionais dos queijos resultantes dos três tratamentos (tipos de coalho) e dois subtratamentos (intensidade de salga), maturados por 6 dias, analisou-se estatisticamente aqueles referentes às determinações de gordura, sólidos totais, umidade,

nitrogênio total, proteína bruta e sal. Os dados referentes ao teor de gordura no extrato seco e atividade de água são o resultado de cálculos que empregam as médias dos valores obtidos experimentalmente e, portanto, como valores médios, não possuem repetição, o que inviabiliza sua análise estatística.

Foram analisados, pelo mesmo procedimento estatístico, os índices de extensão e profundidade de maturação e os teores de tirosina dos queijos submetidos a todos os tratamentos e subtratamentos, maturados por 6, 36 e 66 dias.

Realizou-se a análise de variância pelo procedimento GLM ("General Linear Models Procedure") e o teste de médias REGWQ ("Ryan-Eynot-Gabriel-Welsh Multiple Range Test"), com o auxílio do programa estatístico SAS.

Os dados referentes a rendimento, como as porcentagens de transição de gordura e sólidos totais e os rendimentos expressos em L de leite/kg de queijo e g de ST de queijo/L de leite, assim como os dados da análise sensorial, foram tratados por um procedimento estatístico diferente.

Para a avaliação do rendimento de fabricação, considerou-se apenas os três tratamentos principais (tipos de coalho), tomando-se os valores obtidos para cada dia de experimento (resultados, por sua vez, de cálculos que empregam valores médios) como repetições.

Na análise sensorial, foram avaliados os queijos dos três tratamentos, salgados por 6 horas, referentes a um dos dias de produção (escolhido aleatoriamente). Os escores obtidos de cada provador foram considerados como repetições.

O desenho experimental, nestes dois casos, é completamente aleatorizado. Realizou-se a análise de variância e testou-se as médias pelo teste t de Student.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. Composição físico-química do leite.

A tabela 1 apresenta os resultados das determinações de acidez, pH, gordura, sólidos totais e densidade dos leites empregados nos três dias de processamento. Observa-se que os valores obtidos por estas determinações conferem com os referidos pela literatura (JENNESS, 1988; ALAIS, 1984).

TABELA 1. Valores de acidez, pH, gordura, sólidos totais e densidade dos leites empregados nos três dias de processamento.

	DIAS		
	1	2	3
Acidez (°D)	16,00	17,00	16,50
pH	6,54	6,62	6,58
Gordura (%)	3,50	4,00	3,50
Sólidos totais (%)	11,91	12,37	11,95
Densidade	1,0298	1,0304	1,0302

A composição físico-química do leite influencia, obviamente, a composição final do queijo. Como, em cada dia de processamento, utilizou-se o mesmo leite para a produção dos queijos dos diferentes tratamentos, a composição do leite influenciou igualmente todos os tratamentos.

A variação das composições dos leites dos três dias de processamento implicou em diferenças nas características dos queijos obtidos a cada dia. A influência desta variação sobre os parâmetros estudados nos queijos é anulada, na análise estatística, blocando-se esta variável.

4.2. Composição físico-química do queijo.

Os dados apresentados na tabela 2, para os queijos com 6 dias de maturação, mostram uma composição típica de queijo Prato (VAN DEN BERG & KONING, 1990; WALSTRA *et alii*, 1987; OLIVEIRA, 1982; KOSIKOWSKI, 1977). Isto indica que a produção de queijo Prato com coalho obtido por fermentação pode ser bem executada sob condições convencionais de fabricação.

TABELA 2. Valores de sólidos totais, umidade, gordura, gordura no extrato seco (GES), nitrogênio total, proteína bruta, sal e atividade de água (Aw) dos queijos* produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação.

DETERMINAÇÕES	TRATAMENTOS		
	BOVINO	VITelo	FERMENTAÇÃO
Sólidos totais (%)	56,99 ^b	58,11 ^a	57,93 ^a
Umidade (%)	43,01 ^a	41,89 ^b	42,07 ^b
Gordura (%)	30,46 ^c	31,32 ^b	31,56 ^a
GES (%)	53,45	53,90	54,48
Nitrogênio total (%)	3,36 ^a	3,43 ^a	3,41 ^a
Proteína bruta (%)	21,44 ^a	21,88 ^a	21,76 ^a
Sal (%)	1,30 ^a	1,27 ^a	1,33 ^a
Aw	0,98	0,98	0,98

* queijos salgados por 6 horas.

^{a,b,c} Médias com o mesmo expoente, na mesma linha, não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os valores encontrados para as porcentagens de nitrogênio total, proteína bruta e sal não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Estes resultados estão de acordo com os reportados por BROOME &

HICKEY (1990), DISEGNA *et alii* (1991) e CORRADINI *et alii* (1990), que não encontraram diferenças significativas entre as porcentagens de proteína bruta nos queijos Cheddar, Montasio e Grana, respectivamente, produzidos com coalho de vitelo e obtido por fermentação. BARBANO & RASMUSSEN (1992) não observaram diferenças significativas comparando as porcentagens de proteína bruta em queijos Cheddar produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação. Quanto ao teor de sal dos queijos, estes dados conferem com os referidos por BROOME & HICKEY (1990), DISEGNA *et alii* (1991) e VAN DEN BERG & KONING (1990) (este último trabalhando com queijos Gouda), que não encontraram diferenças significativas entre os queijos elaborados com coalho de vitelo e obtido por fermentação, e com os dados de BARBANO & RASMUSSEN (1992), que não observaram diferenças entre os tratamentos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação.

A diferença entre os tratamentos não implica necessariamente em queijos com porcentagens de proteína diferentes. A obtenção de queijos com a mesma concentração final de proteínas não significa que os coalhos, de composição diferente, tenham apresentado o mesmo comportamento durante a coagulação. É possível se obter quantidades diferentes de queijo com a mesma concentração de proteína; isto indicaria uma diminuição no aproveitamento de proteínas do queijo, que poderia ser revelado pela avaliação do rendimento de produção, discutido adiante (BARBANO & RASMUSSEN, 1992).

O aproveitamento de gordura não é proporcional ao aproveitamento de proteína no queijo, embora a gordura seja retida na massa mecanicamente, associada à estrutura do coágulo (BARBANO & RASMUSSEN, 1992; KOSIKOWSKI, 1977).

As porcentagens de gordura apresentadas na tabela 2 diferiram significativamente ($P < 0,034$) entre tratamentos. Segundo USTUNOL & HICKS (1990), a utilização de coalhos com atividade proteolítica não-específica excessiva, resulta na redução da retenção de gordura no queijo. Dentre os coalhos empregados nos tratamentos, o coalho bovino é o que apresenta a maior porcentagem de pepsina bovina (80%) em sua composição. A ação da pepsina sobre uma cadeia peptídica é muito menos específica que a da quimosina, enzima predominante nos coalhos de vitelo (90%) e obtido por fermentação

(100%) (FOX, 1988; VISSER, 1981). Isto poderia explicar porque o tratamento com coalho bovino apresentou a menor porcentagem de proteína (embora a diferença entre tratamentos para este parâmetro só seja significativa a $p < 0,079$) e gordura nos queijos. O tratamento com coalho de vitelo apresentou um resultado intermediário e o tratamento com coalho produzido por fermentação obteve o maior valor para teor de gordura.

Os valores obtidos para as porcentagens de sólidos totais e umidade dos queijos foram significativamente diferentes ($p < 0,015$) entre o tratamento com coalho bovino e os tratamentos com os coalhos de vitelo e obtido por fermentação (estes últimos não diferiram significativamente entre si). Em parte, a menor porcentagem de sólidos totais dos queijos elaborados com coalho bovino pode ser justificada pelo menor teor de gordura destes queijos. Obviamente, por apresentar maior teor de umidade, a concentração de sólidos totais deste tratamento é menor. USTUNOL & HICKS (1990) e LAWRENCE *et alii* (1987) referem-se a uma possível relação entre a extensão da proteólise causada pelo coalho e a umidade do queijo. Segundo estes autores, a quebra de ligações peptídicas causada por uma proteólise extensiva, origina grupos iônicos que competem pela água disponível no sistema, resultando num aumento do conteúdo de umidade do queijo. Sendo assim, o tratamento que emprega o coalho bovino, composto predominantemente por pepsina, resultaria em queijos mais úmidos, conforme observado. Os dados encontrados neste experimento estão de acordo com os obtidos por VAN DEN DEN BERG & KONING (1990), BROOME & HICKEY (1990), DISEGNA *et alii* (1991) e CORRADINI *et alii* (1990), que não observaram diferenças significativas nas porcentagens de sólidos totais e umidade nos queijos Gouda, Cheddar, Montasio e Grana, respectivamente, produzidos com coalho de vitelo e obtido por fermentação. Os resultados referidos por BARBANO & RASMUSSEN (1992) não demonstraram diferenças entre os tratamentos com os coalhos bovino, de vitelo e obtido por fermentação, para o queijo Cheddar. Já BANKS (1992) e USTUNOL & HICKS (1990) encontraram valores de umidade superiores para os tratamentos com coalho obtido por fermentação, em comparação aos tratamentos com coalho de vitelo.

O maior efeito da variação no teor de umidade dos queijos poderia se refletir no rendimento (em L de leite/kg de queijo) da fabricação. É importante ser observado que, apesar da pequena diferença nos teores de

umidade, a atividade de água foi idêntica nos queijos dos diferentes tratamentos (0,98).

4.3. Rendimento.

A tabela 3 apresenta as porcentagens de transição de gordura e sólidos totais do leite para o queijo, e os rendimentos de fabricação (expressos em L de leite/kg de queijo e em g de ST de queijo/L de leite), nos três tratamentos aplicados.

TABELA 3. Transições de gordura e sólidos totais (ST) do leite para o queijo e rendimentos de fabricação nos tratamentos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação.

	TRATAMENTOS		
	BOVINO	VITelo	FERMENTAÇÃO
Transição de gordura (%)	85,55 ^a	87,35 ^a	87,35 ^a
Transição de ST (%)	49,01 ^a	50,20 ^a	49,48 ^a
Rendimento em L/kg	8,98	8,99	9,04
Rendimento em g de ST/L	63,53 ^a	64,67 ^a	64,13 ^a

^a Médias com o mesmo expoente, na mesma linha, não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A transição de elementos do leite para o queijo constitui-se num método eficiente para a estimativa do rendimento de fabricação (ANTILLA *et alii*, 1982; PHELAN, 1981; FURTADO & WOLFSCHOON-P, 1978).

As porcentagens de transição de gordura, obtidas para os tratamentos nos quais se empregou os coalhos de vitelo e produzido por fermentação, foram

idênticas (87,35%) e ligeiramente superiores à obtida para o tratamento com coalho bovino (85,55%), embora as diferenças entre tratamentos para este parâmetro só seja significativa a $p < 0,25$.

É pertinente observar-se, aqui, que para os dados referentes aos cálculos de rendimento, havia apenas três repetições para cada tratamento. Consequentemente, a variação dentro de tratamentos foi muito alta, e o número de graus de liberdade para o resíduo, pequeno. Neste quadro, a análise de variância só revelaria diferenças entre tratamentos, a $p < 0,05$, caso estas fossem extremas.

Os resultados de transição de gordura, apresentados neste experimento, conferem com os reportados por BROOME & HICKEY (1990), CORRADINI *et alii* (1990) e USTUNOL & HICKS (1990), que não encontraram diferenças ($p < 0,05$) entre as porcentagens de transição de gordura dos tratamentos com coalho de vitelo e obtido por fermentação. BARBANO & RASMUSSEN (1992) não observaram diferenças significativas, entre as transições de gordura, para os queijos produzidos com os coalhos de vitelo e obtido por fermentação. O tratamento com coalho bovino, entretanto, apresentou valores de transição de gordura significativamente menores que os encontrados para os outros dois tratamentos.

Quanto à porcentagem de transição de sólidos totais do leite para o queijo, o maior valor foi observado para o tratamento com coalho de vitelo (50,20%), seguido, nesta ordem, pelos valores obtidos com os coalhos produzido por fermentação (49,48%) e bovino (49,01%), embora a diferença entre tratamentos, neste caso, só seja significativa a $p < 0,25$. Resultados semelhantes foram obtidos por BANKS (1992), que encontrou uma porcentagem de transição de sólidos totais ligeiramente superior (embora não significativamente) para os queijos produzidos com coalho de vitelo, comparada à observada para o coalho obtido por fermentação. BROOME & HICKEY (1990), por outro lado, reportaram valores de transição de sólidos totais significativamente maiores para o tratamento com o coalho obtido por fermentação.

O rendimento com base no volume de leite necessário para produzir um quilo de queijo é um método prático, tradicionalmente empregado em laticínios, para a avaliação da eficiência do processamento de queijos. Os valores encontrados neste trabalho para os rendimentos em L de leite/kg de queijo foram 8,98; 8,99 e 9,04, para os tratamentos com os coalhos bovino, de vitelo e obtido por fermentação, respectivamente. A avaliação destes dados aponta o tratamento com coalho bovino como o mais eficiente, uma vez que emprega o menor volume de leite para a produção da mesma quantidade de queijo. Esta é uma conclusão equivocada. O rendimento expresso em L de leite/kg de queijo desconsidera a umidade dos queijos obtidos nos diferentes tratamentos. Assim, a obtenção de maiores quantidades de queijo não significa, necessariamente, que ocorreu um melhor aproveitamento dos componentes sólidos do leite no queijo; pode ter havido, ao invés disto, uma maior retenção de umidade. Por este motivo, a avaliação correto do rendimento de fabricação deve ser feita com base no teor de sólidos totais do queijo. Ainda na tabela 3, são apresentados os rendimentos em g de ST do queijo/L de leite. Observou-se um melhor rendimento de produção para o tratamento com coalho de vitelo (64,67), seguido pelos tratamentos com os coalhos obtido por fermentação (64,13) e bovino (63,53) (a diferença entre estes tratamentos só é significativa a $p < 0,25$). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos referidos na literatura. Os rendimentos (ajustados para o teor de sólidos totais dos queijos) encontrados por BANKS (1992), EMMONS & BINNS (1991), VAN DEN BERG & KONING (1990), BINES *et alii* (1989), HICKS *et alii* (1988), PROKOPEK *et alii* (1988) e GREEN *et alii* (1985) não diferiram significativamente entre os tratamentos com coalho de vitelo e obtido por fermentação. USTUNOL & HICKS (1990), por sua vez, encontraram um rendimento melhor (embora não significativamente), para o tratamento com o coalho de vitelo. Já BROOME & HICKEY (1990) obtiveram um valor de rendimento significativamente maior para o tratamento com coalho obtido por fermentação.

No trabalho de BARBANO & RASMUSSEN (1992), os coalhos obtido por fermentação e de vitelo resultaram em rendimentos significativamente superiores (0,39% e 0,38%) ao rendimento com o coalho bovino. No presente estudo, o tratamento com coalho de vitelo apresentou um rendimento 0,84% e 1,76% maior que os tratamentos com os coalhos obtido por fermentação e bovino, respectivamente. O coalho obtido por fermentação, comparado ao coalho

bovino, proporcionou um aumento de rendimento de 0,94%.

As diferenças nas porcentagens de transição de gordura e sólidos totais e nos rendimentos, observadas entre os tratamentos com os coalhos bovino, de vitelo e obtido por fermentação, podem estar relacionadas à composição do coalho. Para todos os parâmetros de rendimento avaliados, os valores obtidos para os tratamentos com os coalhos de vitelo e obtido por fermentação estiveram muito próximos, e foram sempre superiores aos encontrados para o tratamento com coalho bovino. Isto poderia ser explicado pela diferença nos teores de quimosina e pepsina bovina destes coalhos, enzimas que apresentam comportamentos diferentes no processo de coagulação do leite (VISSER, 1981). No momento da coagulação, a atividade proteolítica das enzimas do coalho vai além da clivagem inicial da ligação Phe105-Met106 da κ -caseína; outras ligações são rompidas gradualmente, formando compostos nitrogenados solúveis que podem ser perdidos no soro, arrastando consigo parte da gordura do leite. A relação entre as atividades coagulante e proteolítica das enzimas do coalho influencia sobremaneira as perdas de gordura e proteína no soro e, conseqüentemente, o rendimento da fabricação de queijos. Obtem-se melhores rendimentos quando esta relação é alta (BARBANO & RASMUSSEN, 1992). As relações de atividade coagulante/atividade proteolítica encontradas por DALGLEISH (1987) para a quimosina e a pepsina bovina foram, respectivamente, de 40,9 e 4,3, e permitem explicar os resultados apresentados na tabela 3. Observou-se que o coalho de vitelo e o coalho produzido por fermentação, compostos respectivamente por 90 e 100% de quimosina (enzima com uma relação de atividade coagulante/atividade proteolítica alta) proporcionaram rendimentos melhores que o coalho bovino, composto por apenas 20% de quimosina.

Os resultados reportados na literatura sobre o efeito das enzimas coagulantes no rendimento do queijo são um tanto inconsistentes. Esta inconsistência pode ser conseqüência de diferenças nas fontes de leite usadas (que causam variações na composição e afetam o rendimento do queijo), nos equipamentos e nas condições de processamento. Além disso, quando se processa grandes volumes de leite, é difícil realizar as pesagens com precisão, o que compromete a sensibilidade das determinações de rendimento. Portanto, é difícil afirmar que as pequenas diferenças de rendimento observadas neste

tipo de experimento sejam diferenças efetivas e tenham consequências práticas.

4.4. Porcentagem de sal e atividade de água do queijo.

A tabela 4 apresenta os resultados das determinações do teor de sal e dos cálculos da atividade de água das amostras.

TABELA 4. Teores de sal e atividade de água (Aw) dos queijos produzidos com coalhos bovino, de vitelo e obtido por fermentação, salgados por 3 e 6 horas.

DETERMINAÇÕES	TRATAMENTOS	TEMPO DE SALGA (horas)	
		3	6
Umidade (%)	BOVINO	43,31	42,71
	VITelo	42,31	41,46
	FERMENTAÇÃO	42,44	41,69
	*	42,69 ^a	41,95 ^b
Sal(%)	BOVINO	0,97	1,30
	VITelo	1,07	1,27
	FERMENTAÇÃO	1,01	1,33
	*	1,01 ^b	1,30 ^a
Aw	BOVINO	0,99	0,98
	VITelo	0,99	0,98
	FERMENTAÇÃO	0,99	0,98

* Os dados apresentados nesta linha representam as médias dos valores obtidos em cada tratamento (coalho) para 3 e 6 horas de salga.

^{a,b} Médias com o mesmo expoente, na mesma linha, não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Observou-se que os queijos salgados por 6 horas apresentaram teores de sal significativamente superiores ($p < 0,05$) aos dos queijos salgados por 3 horas. Ao mesmo tempo, os queijos submetidos a um período maior de salga obtiveram porcentagens de umidade significativamente menores ($p < 0,05$). A transferência de sal da salmoura para o queijo é um processo de difusão mútua, envolvendo uma penetração de NaCl no queijo, acompanhada por uma migração de água para a salmoura (FOX, 1987; MORRIS *et alii*, 1985; GUINEE & FOX, 1983). A absorção de sal e a perda de umidade ocorridas nos queijos variam com o tempo de salga, embora esta relação não seja linear (FOX, 1987).

Não houve variações relevantes na atividade de água dos queijos salgados por 3 (0,99) e 6 horas (0,98). Provavelmente, não foram observadas diferenças neste parâmetro porque os teores de sal foram muito próximos para os dois tratamentos.

O sal influencia sensivelmente o processo de maturação do queijo, desempenhando um papel importante no controle do crescimento das bactérias do fermento e contaminantes e na regulação da atividade do coalho e das enzimas secretadas por, ou liberadas pela lise de, bactérias do fermento e contaminantes (MORRIS *et alii*, 1985).

4.5. Evolução do pH.

Na tabela 5 são apresentados os valores de pH obtidos aos 6, 36 e 66 dias de maturação dos queijos.

Nas variedades de queijo de massa semi-cozida, a formação de ácido láctico durante o processamento e o metabolismo da lactose residual durante os primeiros dias de maturação, reduzem o pH do queijo para aproximadamente 5,0 ($\pm 0,3$) (FARKEY & FOX, 1990; ALAIS, 1984). Os valores de pH observados para os queijos com 6 dias de maturação não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, e coincidiram com os referidos pela literatura.

TABELA 5. Valores de pH dos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, salgados por 3 e 6 horas, aos 6, 36 e 66 dias de maturação.

TEMPO DE MATURAÇÃO (d)	TRATAMENTOS	TEMPO DE SALGA (h)		**
		3	6	
6	BOVINO	5,08	5,13	5,11 ^a
	VITelo	5,11	5,17	5,14 ^a
	FERMENTAÇÃO	5,15	5,16	5,15 ^a
	*	5,12 ^b	5,15 ^a	5,13 ^{***}
36	BOVINO	5,15	5,15	5,15 ^a
	VITelo	5,14	5,14	5,14 ^a
	FERMENTAÇÃO	5,14	5,13	5,13 ^a
	*	5,14 ^a	5,14 ^a	5,14 ^{***}
66	BOVINO	5,09	5,15	5,12 ^b
	VITelo	5,18	5,22	5,20 ^a
	FERMENTAÇÃO	5,10	5,20	5,15 ^{a,b}
	*	5,12 ^b	5,19 ^a	5,16 ^{***}

* Os dados apresentados nesta linha representam as médias dos valores obtidos em cada tratamento (coalho), para 3 e 6 horas de salga.

^{a,b} Médias com o mesmo expoente, na mesma linha, não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

** Os dados apresentados nesta coluna representam médias dos valores obtidos em cada tempo de salga, para os tratamentos com coalhos bovino, de vitelo e obtido por fermentação.

^{a,b} Médias com o mesmo expoente, no mesmo quadro e coluna, não são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

*** Médias dos valores de pH obtidos nos diferentes tratamentos (coalho) e tempos de salga, para 6, 36 e 66 dias de maturação.

Durante a maturação, o pH do queijo aumenta, como consequência da formação de NH_3 (resultante da proteólise) e do catabolismo do ácido láctico (FARKEY & FOX, 1990; FOX, 1988; ALAIS, 1984). No início da maturação, este aumento é da ordem de 0,5, e até o final da maturação ocorre ainda uma elevação de 0,2 (ALAIS, 1984). Os dados obtidos no presente trabalho (tabela 5) mostram a tendência de elevação dos valores de pH, embora em ordem de grandeza menor do que a citada na literatura.

Diferenças significativas ($p < 0,01$) foram observadas entre os tratamentos com o coalho de vitelo e o bovino, após 66 dias de maturação. Deveria se esperar um valor mais elevado de pH para o tratamento com o coalho bovino.

É conhecido na literatura (FOX, 1987; THOMAS & PEARCE, 1981) que a concentração salina tem um grande efeito no pH do queijo, em razão da influência da relação sal/umidade sobre o metabolismo da lactose. Tal tendência foi verificada (tabela 5) nos valores de pH após 6 e 66 dias de maturação, quando comparou-se os queijos salgados por 3 e 6 horas.

4.6. Índices de maturação dos queijos.

Os índices de extensão e profundidade da maturação são apresentados nas figuras 1a (3 horas de salga) e 1b (6 horas de salga), 2a (3 horas de salga) e 2b (6 horas de salga), respectivamente. O índice de extensão refere-se à quantidade de nitrogênio solúvel em pH 4,6, representado sobretudo por peptídios de peso molecular baixo e médio, produzidos basicamente pela ação das enzimas do coalho, acumulados durante a maturação (FARKEY & FOX, 1990; WOLFSCHOON-P, 1983). Portanto, este é um índice importante para a avaliação do comportamento do coalho na maturação dos queijos.

Observa-se nas figuras 1a e 1b que em todos os tratamentos houve um aumento gradual dos índices de extensão de maturação de, em média, 9%, para cerca de 17%. Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados por MINUSSI (1993) para o queijo Prato elaborado com coalho bovino. Até 36 dias de maturação, os índices observados nos queijos produzidos com coalho bovino

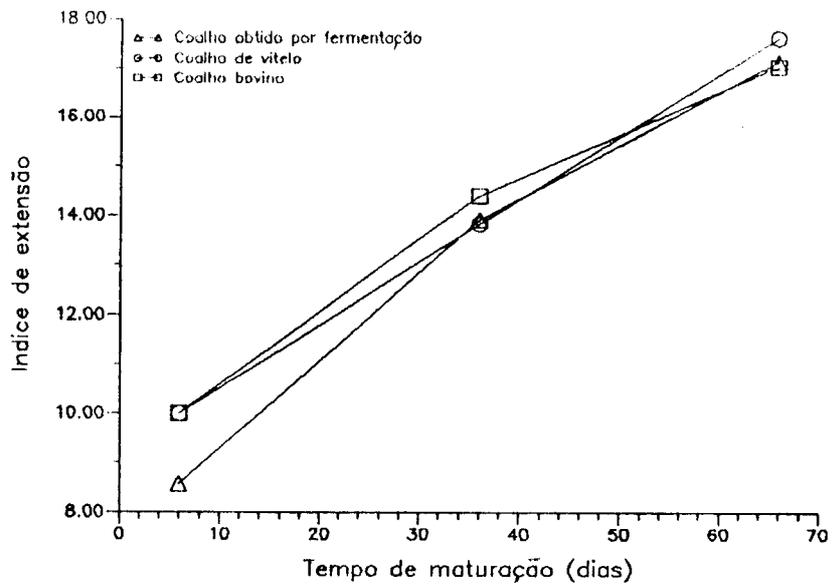


Figura 1a. Índice de extensão de maturação nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 3 horas de salga.

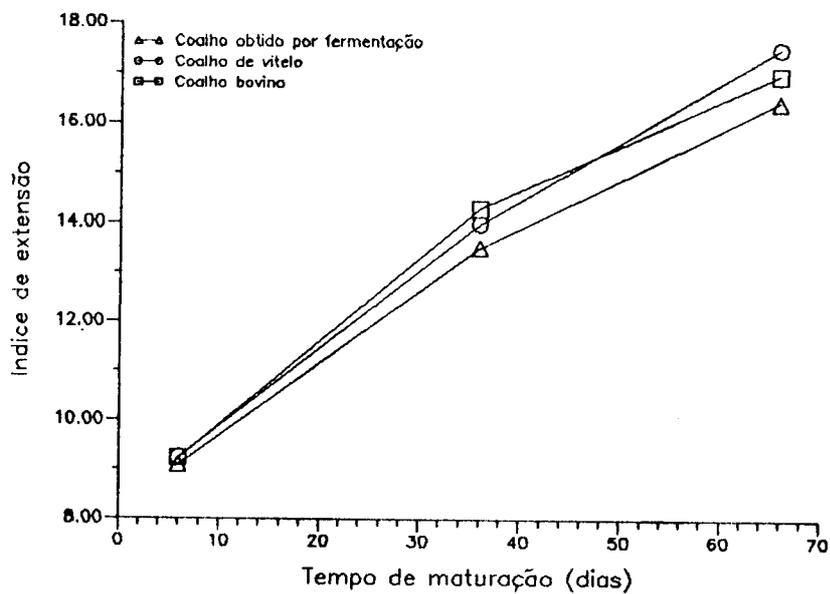


Figura 1b. Índice de extensão de maturação nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 6 horas de salga.

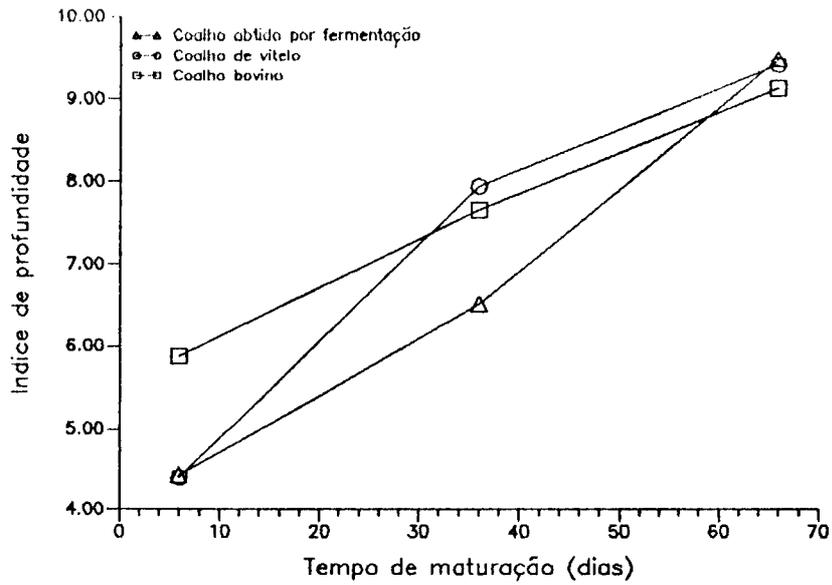


Figura 2a. Índice de profundidade de maturação nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 3 horas de salga.

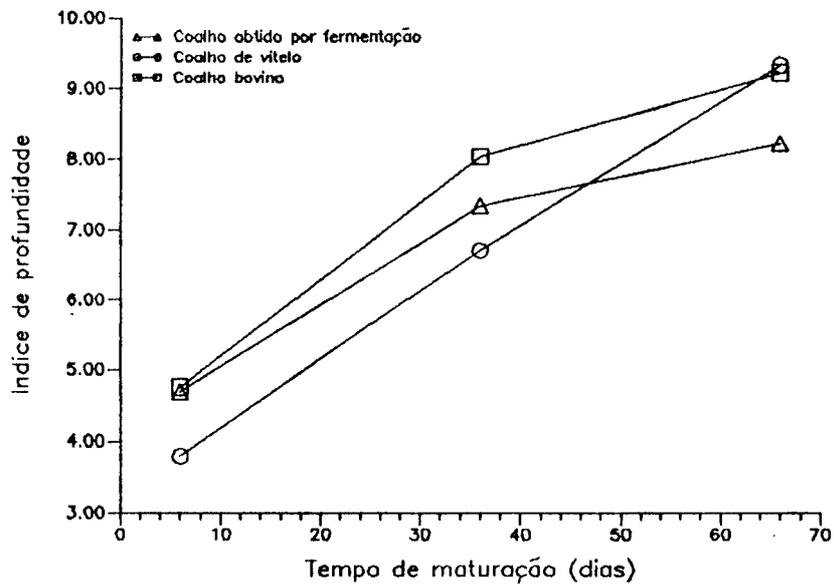


Figura 2b. Índice de profundidade de maturação nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 6 horas de salga.

foram significativamente ($p < 0,04$) mais altos do que os observados para os demais tratamentos. A partir de então observou-se, em geral, índices de proteólise similares entre os tratamentos, sendo que naqueles onde o tempo de salga foi maior, os índices de extensão de maturação foram significativamente menores ($p < 0,05$). Tal fato poderia ser explicado pela influência do pH do queijo na atividade proteolítica das enzimas quimosina e pepsina. No início da maturação do queijo Prato, o pH é geralmente mais baixo (5,1-5,2), o que favorece a atuação da pepsina. Após algumas semanas de maturação, normalmente ocorre uma elevação no pH do queijo, o que tende a prejudicar a atividade da pepsina bovina, sem no entanto afetar a atividade da quimosina, que atua numa faixa mais ampla de pH (FOX, 1988).

Nas figuras 2a e 2b são apresentados os índices de profundidade da maturação dos queijos. Este índice se refere à determinação do nitrogênio presente em componentes de peso molecular baixo (abaixo de 3.000 daltons) como pequenos peptídios, aminoácidos, uréia, etc (FARKEY & FOX, 1990; WOLFSCHOON-P., 1983), e reflete sobretudo a atuação dos fermentos lácticos que, através de exo e endopeptidases, hidrolisam peptídios de peso molecular alto e médio, formados predominantemente pela ação do coalho. Conforme se observa nas figuras 2a e 2b, houve um aumento gradual deste índice em todos os tratamentos, sendo que nos queijos feitos com coalho bovino os índices foram significativamente mais altos ($P < 0,01$) até 36 dias de maturação; aos 66 dias observou-se maiores índices de profundidade ($P < 0,01$) nos queijos feitos com o coalho de vitelo (9,41 e 9,33%, para os tratamentos com 3 e 6 horas de salga, respectivamente) e com o obtido por fermentação (9,47 e 8,21%), em comparação aos queijos obtidos com o coalho bovino (9,12 e 9,23%). Estes resultados seguiram a mesma tendência observada nos índices de extensão de maturação. É provável que o aumento do teor de nitrogênio solúvel em TCA 12%, no final da maturação, nos queijos feitos com coalhos de vitelo e obtido por fermentação, esteja relacionado com a maior degradação protéica inicial (consequente principalmente da atuação do coalho) observada naqueles tratamentos após 36 dias de cura (figuras 1a e 1b), responsável pelo aumento da disponibilidade de peptídios, substrato para a ação das peptidases do fermento láctico.

4.7. Determinação de tirosina.

A determinação de tirosina em extratos de queijo solúveis em pH 4,6 é um método tradicional para a avaliação da maturação de queijos (FOX, 1989). Este aminoácido possui a propriedade de absorver luz nos comprimentos de onda de 270 e 290 nm (ultra-violeta) e, uma vez liberado no queijo, pode ser quantificado espectrofotometricamente (VAKALERIS & PRICE, 1959). Nas figuras 3a e 3b são apresentados os valores de tirosina (mg/100 g de queijo) observados durante a maturação dos queijos. Como a liberação do aminoácido é uma consequência da ação das enzimas do fermento e do coalho, os valores seguiram a mesma tendência observada nos índices de maturação apresentados nas figuras 1a e 1b, 2a e 2b. Apesar dos valores observados nos queijos salgados por 6 horas terem sido ligeiramente inferiores àqueles encontrados nos queijos salgados por 3 horas, após 66 dias de maturação, não houve diferença relevante entre eles. Esta constatação pode ser justificada pela pequena diferença observada entre os teores médios de sal dos tratamentos, sempre inferiores ao nível considerado mínimo para a inibição parcial dos fermentos lácticos (cerca de 5,5% de sal na umidade).

4.8. Eletroforese.

A degradação da fração α_{s1} da caseína durante a maturação dos queijos foi avaliada através da eletroforese em gel de poliacrilamida (uréia 7M). A figura 4 apresenta os resultados da eletroforese para todos os tratamentos. As figuras 5a, 5b e 5c mostram os densitogramas dos géis correspondentes aos tratamentos nos quais foram empregados os coalhos bovino (aos 6 e 66 dias de maturação), obtido por fermentação (aos 6 e 66 dias) e de vitelo (aos 6 e 66 dias), com 3 horas de salga, e as figuras 6a, 6b e 6c referem-se a um tempo de salga de 6 horas, para os mesmos tratamentos. A observação dos densitogramas deixa claro não ter ocorrido degradação sensível da fração β -caseína durante o período de maturação.

Esta fração é extremamente resistente à decomposição pelas enzimas do coalho (LAWRENCE *et alii*, 1987). Por outro lado, observou-se uma intensa degradação da α_{s1} -caseína, também reportada por outros autores (FOX, 1988;

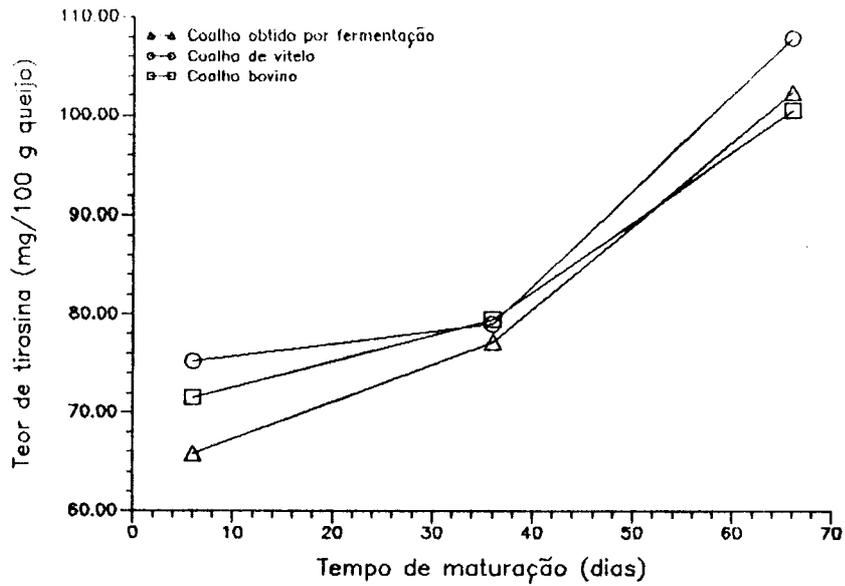


Figura 3a. Teor de tirosina nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 3 horas de salga (mg/100 g de queijo).

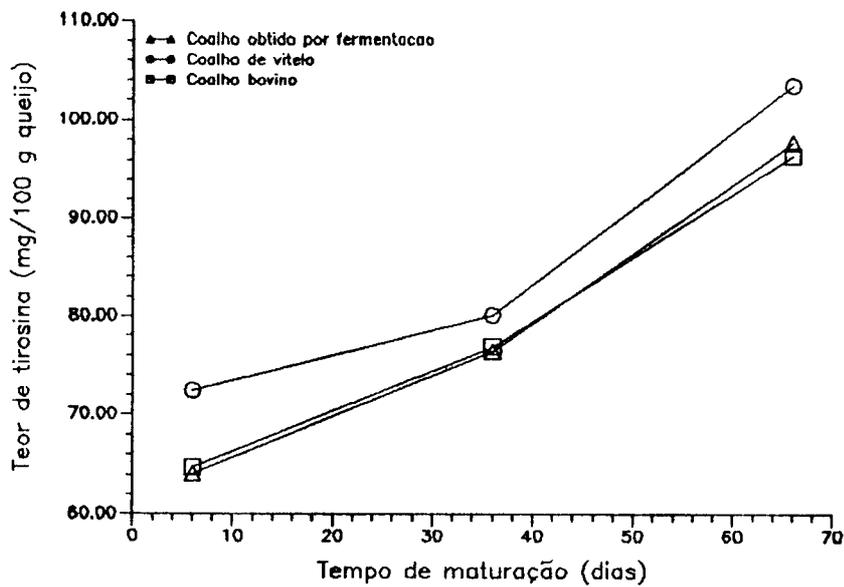


Figura 3b. Teor de tirosina nos queijos produzidos com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, aos 6, 36 e 66 dias de maturação, com 6 horas de salga (mg/100 g de queijo).

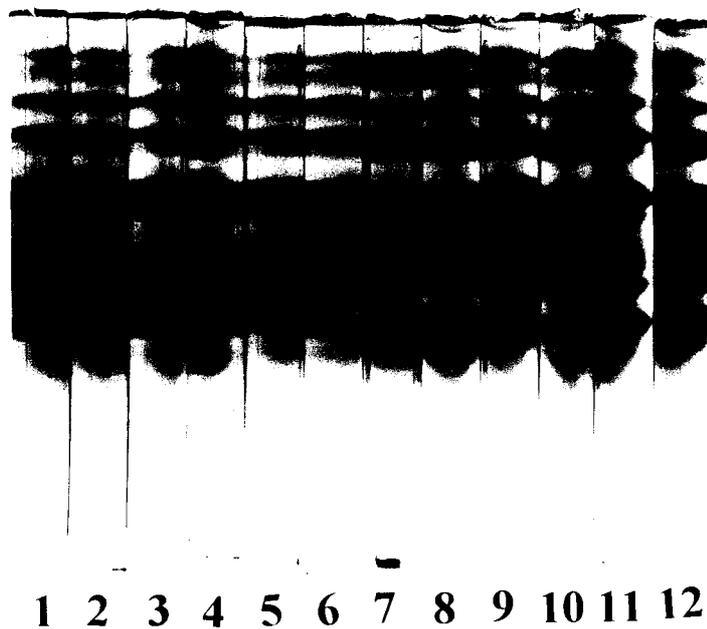


Figura 4. Eletroforese (PAGE- uréia 7M) das proteínas extraídas dos queijos produzidos por tratamento com coalho bovino, obtido por fermentação, e de vitelo.

Gel #	Tratamento	Tempo de salga (horas)	Tempo de maturação (dias)
1	coalho bovino	3	6
2	coalho bovino	6	6
3	obtido por fermentação	3	6
4	obtido por fermentação	6	6
5	coalho de vitelo	3	6
6	coalho de vitelo	6	6
7	coalho bovino	3	66
8	coalho bovino	6	66
9	obtido por fermentação	3	66
10	obtido por fermentação	6	66
11	coalho de vitelo	3	66
12	coalho de vitelo	6	66

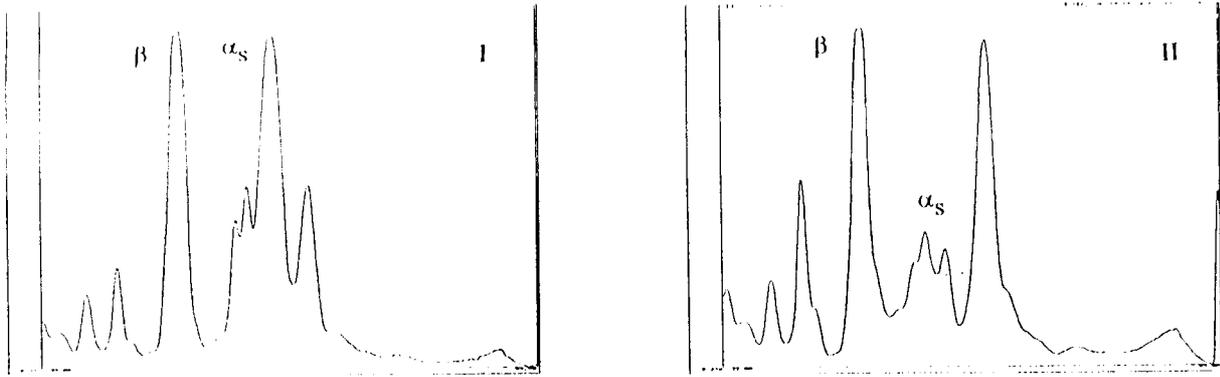


Figura 5a. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho bovino, com 3 horas de salga (I-6 dias; II-66 dias)

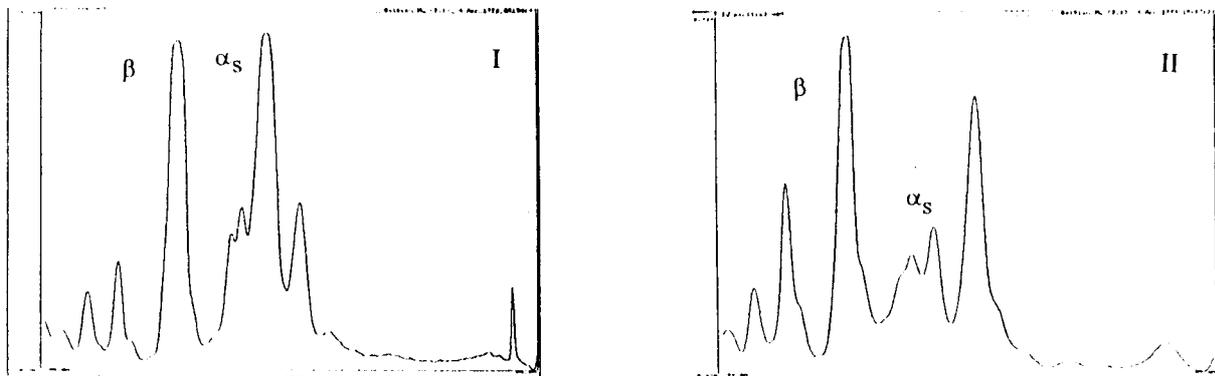


Figura 5b. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho de vitelo, com 3 horas de salga (I-6 dias; II-66 dias).

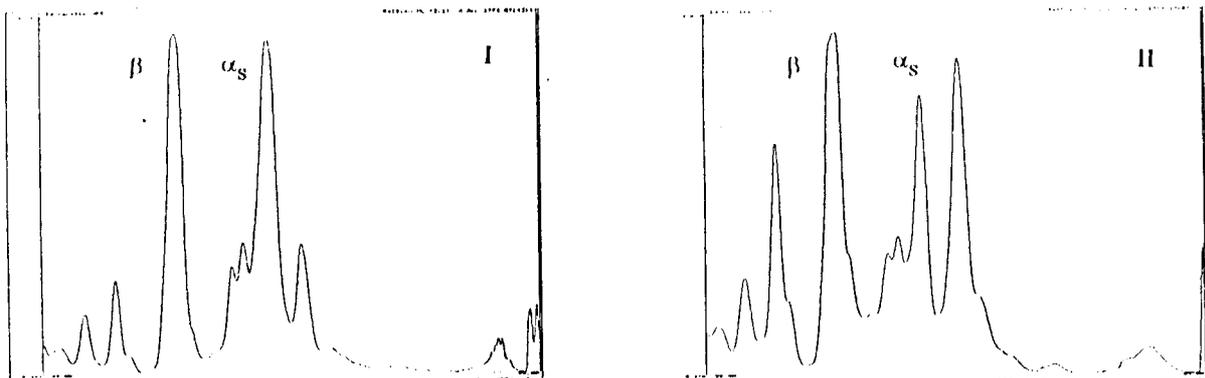


Figura 5c. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho obtido por fermentação, com 3 horas de salga (I-6 dias; II-66 dias).

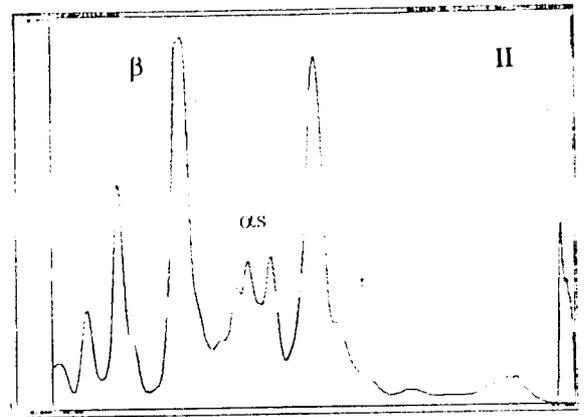
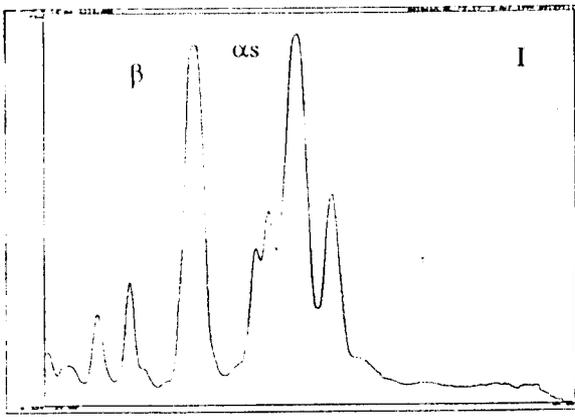


Figura 6a. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho bovino, com 6 horas de salga (I-6 dias; II-66 dias).

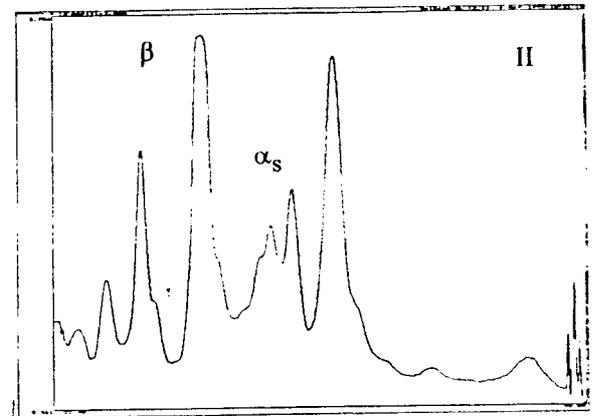
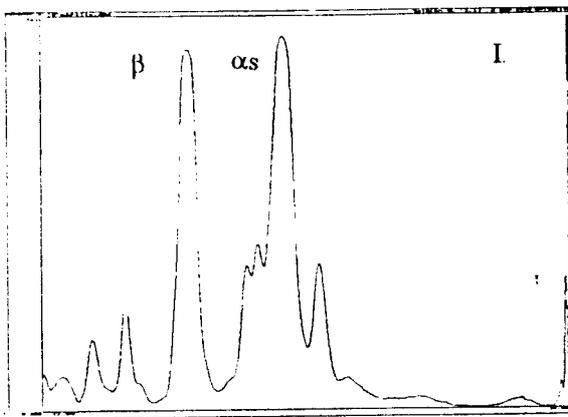


Figura 6b. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho de vitelo, com 6 horas de salga (I-6 dias; II-66 dias).

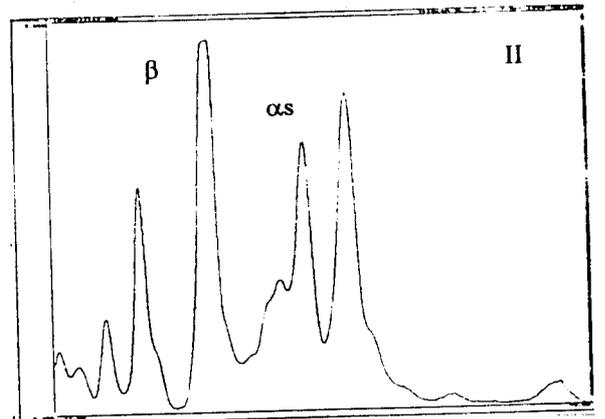
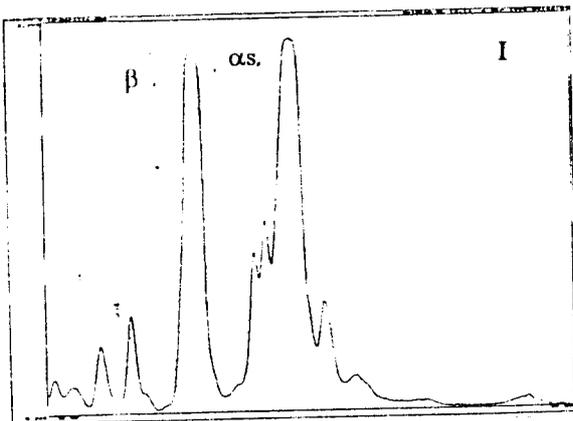


Figura 6c. Densitogramas correspondentes ao tratamento com coalho obtido por fermentação, com 6 horas de salga (I-6 dias; II-66 dias).

5. CONCLUSÕES.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso de três tipos de coalho (bovino, de vitelo e obtido por fermentação por *Aspergillus niger* var. *awamori*) na fabricação do queijo Prato, salgado por períodos de tempo diferentes (3 e 6 horas) e maturado por 6, 36 e 66 dias (12°C e 90% de umidade relativa). As principais conclusões deste estudo foram:

1. Os melhores rendimentos de fabricação (g ST/L de leite) foram obtidos com o uso dos coalhos de vitelo e produzido por fermentação. O emprego destes coalhos permitiu um melhor aproveitamento de gordura e sólidos totais do leite no queijo, em comparação com o uso do coalho bovino (diferenças significativas ao nível de $p < 0,25$).

2. Os resultados indicam que coalhos compostos por maiores teores de pepsina, como o bovino, apresentam menores rendimentos ($p < 0,25$), provavelmente devido à maior atividade proteolítica desta enzima durante a coagulação do leite.

3. Durante a maturação houve um aumento progressivo dos teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e TCA 12%. Os índices de maturação (extensão e profundidade) foram maiores nos queijos feitos com coalho bovino até 36 dias de maturação ($p < 0,05$). A partir de então, ocorreu um incremento nos índices observados nos queijos feitos com os coalhos de vitelo e obtido por fermentação.

4. Não foi observada influência dos teores de sal nos índices de maturação, já que todos os queijos apresentaram valores de A_w muito próximos.

5. A determinação espectrofotométrica do aminoácido tirosina comprovou ser uma metodologia adequada para a avaliação da intensidade de maturação, uma vez que os valores obtidos apresentaram a mesma tendência daqueles dos índices de extensão e profundidade da maturação.

6. A análise eletroforética demonstrou que a fração β da caseína permaneceu praticamente intacta, enquanto a α_1 -caseína foi intensamente degradada durante a maturação dos queijos. A maior degradação da fração α_1 -caseína ocorreu nos queijos produzidos com coalho bovino, seguida pelos queijos nos quais empregou-se os coalhos de vitelo e o obtido por fermentação. Estes resultados indicam que a presença de maiores teores de pepsina no coalho bovino teve um papel importante na degradação da α_1 -caseína.

7. A análise sensorial não indicou preferência dos provadores pelos queijos elaborados com os três tipos de coalho ($p < 0,05$).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ALAIS,C. *Science du lait: principes des techniques laitieres*. 4. ed. Paris: SEPAIC, 1984, 814p.
- ANTILA,V.; HAKKARAINEN,H.; LAPPALAINEN,R. The transfer of milk components to Finnish Edam and Emmental cheeses. *Milchwissenschaft*, v.37, n.6, p.321-324, 1982.
- ANTUNES,L.A.F.; TEIXEIRA,E.C.; SILVA,R.S.S.F. Models for determination of activity water in Prato cheese. *J. Dairy Sci.*, v.75, n.1, p.104, 1992.
- ARDO,Y.; MANSSON,H.L. Heat-treated *lactobacilli* develop desirable aroma in low-fat cheese. *Scand. Dairy Inf.*, v.4, n.1., p.38-40, 1990.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 12. ed. Washington: 1975. 1094p.
- ATHERTON,H.V. *Chemistry and testing of dairy products*. 4. ed. Westport: AVI, 1981, 396p.
- BANKS,J.M. Yield and quality of Cheddar cheese produced using a fermentation-derived calf chymosin. *Milchwissenschaft*, v.47, n.3, p.153-156, 1992.
- BANKS,J.M.; BANKS,W.; MUIR,D.D.; Wilson,A.G. Cheese yield: composition does matter. *Dairy Ind. International*, 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. *J.Dairy Sci.*, v.75, p.1-12, 1992.
- BIEDE,S.L.; HAMMOND,E.C. Swiss cheese flavor. II. Organoleptic analysis. *J. Dairy Sci.*, v.62, p.238-248, 1979.

- BINES,V.E.; YOUNG,P.; LAW,B.A. Comparison of Cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. *J. Dairy Res.*, v.56, p.56, 1989.
- BROOME,M.C.; HICKEY,M.W. Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in Cheddar cheese. *Aust. J.Dairy Technol.*, p.53-59, 1990.
- CHAVES,J.B.P. A análise sensorial na indústria de laticínios. *Revista do Inst. de Latic. Cândido Tostes*, v.45, n.267/272, p.38-52, 1990.
- CORRADINI,C.; BOTTAZZI,V.; RESMINI,P.; HOGENBOON,J.A.; PAZZAGLIA,C.; LODI,R.; CARINI,S.; RAMPILLI,M. A formaggio Grana con chimosina da *Kluyveromyces lactis* (Maxiren). *Il Latte*, v.15, p.860-865, 1990.
- DAVIS,B.J. Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.*, v.121, p.404-427, 1964.
- DE JONG,L.; DE GROOT-MOSTERT,A.E.A. The proteolytic action of rennet on different casein substrates under various conditions. *Neth. Milk Dairy J.*, v.31, p.296, 1977.
- DESMAZEAUD,M.J.; GRIPON,J.C. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, v.32, n.12, p.731-734, 1977.
- DISEGNA,L.; TEALDO,E.; LODDO,A.; SCULCO,G.; ANTONELLO,F.; GIACON,D.; FELLIN,A. Impiego di chimosina B da *Kluyveromyces lactis* nella tecnologia indicativa del Montasio. *Il Latte*, p.486-490, 1991.
- EMMONS,D.B.; BINNS,M.R. Milk clotting enzymes. IV. Proteolysis during Cheddar cheese making in relation to estimated losses of basic yield using chymosin derived by fermentation (*A. niger*) and modified enzyme from *M. miehei*. *Milchwissenschaft*, v.46, n.6, p.341-408, 1991.
- EMMONS,D.B.; ERNSTROM,C.A.; LACROIX,C.; VERRET,P. Predictive formulas for yield of cheese from composition of milk: a review. *J.Dairy Sci.*,

v.73, p.1365-1394, 1990.

EMMONS,D.B.; REISER,B.; GIROUX,R.N.; STANLEY,D.W. Cheddar cheese made with bovine pepsin. I.Yield and quality of cheese. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, v.9, n.4, p.189, 1976.

EXTERKATE,F.A. Comparison of strains of *Streptococcus cremoris* for proteolytic activities associated with the cell wall. *Neth. Milk Dairy J.*, v.30, p.90-105, 1976.

----- . The proteolytic system of starter *Streptococci* :the crucial point in cheesemaking. *Neth. Milk Dairy J.*, v.37, p.94-96, 1983.

FARKEY,N.Y.; FOX,P.F. Objective indices of cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, p.37-40, 1990.

FERSHT,A. *Enzyme structure and mechanism*. 2. ed. New York: Freeman, 1985, 475p.

FOLTMANN,B. General and molecular aspects of rennets. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology 1*, London and New York: Elsevier, 1987, p.33-61.

----- . Mammalian milk-clotting proteases: structure, function, evolution and development. *Neth. Milk Dairy J.*, v.35, n.3/4, p.223-231, 1981.

FOX,P.F. *Cheese: chemistry, physics and microbiology 1*, London and New York: Elsevier, 1987, 400p.

----- . Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.1379-1400, 1989.

----- . Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biothecnology and Applied Biochemistry*, v.10, p.522-535, 1988.

- . Significance of salt in cheese ripening. *Dairy Ind. Intern.*, v.52, n.9, p.19-22, 1987.
- FURTADO ,M.M. *A arte e a ciência do queijo*. São Paulo: Globo, 1991. 295p.
- . A fabricação de queijos no Brasil. *Inf. do Laticinista*, v.11, n.38, p.24-40, 1992.
- FURTADO,M.M.; WOLFSCHOON-P.,A.F. Étude de quelques aspects de la fabrication des fromages brésiliens Prato et Minas. *Le Lait*, v.58, n.578, p.510-530, 1978.
- GEIS,A; KIEFER,B.; TEUBER,M. Proteolytic activities of lactic acid *Streptococci* isolated from dairy starter cultures. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, v.10, p.83, 1986.
- GRAPPIN,R.; RANK,T.C.; OLSON,N.F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening: review. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.531-540, 1985.
- GREEN,M.L.; ANGAL,S.; LOWE,P.A.; MARSTON,F.A.O. Cheddar cheesemaking with recombinant calf chymosin synthesized in *Escherichia coli*. *J. Dairy Res.*, v.52, p.281, 1985.
- GRIPON,J.C. Étude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la presure commerciale. *Le Lait*, v.55, n.548, p.502-511, 1975.
- GUIGOZ,Y.; SOLMS,J. Bitter peptides, occurrence and structure. *Chemical Senses and Flavor*, v.2, p.71-84, 1976.
- GUINEE,T.P.; FOX,P.F. Sodium chloride and moisture changes in Romano-type cheese during salting. *J.Dairy Res.*, v.50, p.511-518, 1983.
- HARBOE, M.K. *Chymogen*. Horsholm: Chr. Hansen's, 1990, 5p.
- . Chymogen , a chymosin rennet manufactured by fermentation of

- Aspergillus niger*. *Bulletin of the IDF* , v.269, p.3-12, 1992.
- HICKS,C.L.; O'LEARY,J.; BUCY,J. Use of recombinant chymosin in the manufacture of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, v.71, p.1127-1131, 1988.
- HILLER,A; PLAZIN,J.; VAN SLYKE,D.D. A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. *J. Biol. Chem.*, v.176, p.1401, 1948.
- JENNESS,R. Composition of milk. In: *Fundamentals of dairy chemistry*, 3. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988, p.1-38.
- KOSIKOWSKI,F. *Cheese and fermented milk foods*. 2. ed. Ann Arbor: Edwards, 1977, 711 p.
- . Cheese yield prediction simplified. *Dairy Field*, p.27, 1982a.
- . Getting top yields and the highest quality. *Dairy Field*, p.51-52, 1982b.
- KELLER,B.; OLSON,N.F.; RICHARDSON,T. Mineral retention and rheological properties of Mozzarella cheese made by direct acidification. *J. Dairy Sci.*, v.57, p.174-180, 1974.
- LAWRENCE,R.C.; CREAMER,L.K.; GILLES,J. Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, v.70, p.1748-1760, 1987.
- LAWRENCE,R.C.; GILLES,J. The formation of bitterness in cheese : a critical evaluation. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol*, v.4, p.198-196, 1969.
- LEMIEUX,L.; SIMARD,R.E. Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development , mainly in cheese manufacture. *Le Lait*, v.71, p.599-636, 1991.
- LOWRY,O.H.; ROSEBROUGH,N.J.; FARR,H.L.; RANDALL,N.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, v.193, p.265-275, 1965.

- MATOBA,T.; HATA,T. Relationships between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agric. Biol. Chem.*, v.36, p.1423-1431, 1972.
- MELACHOURIS,N.P. Discontinuous gel electrophoresis of whey proteins, casein and clotting enzymes. *J.Dairy Sci.*, v.52, n.4, p.456-459, 1969.
- MINUSSI,R.C. *Avaliação de métodos para a aceleração da maturação do queijo Prato*. Viçosa, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1993. 89p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- MONEIB,A.; SAFWAT,I. Studies on improving locally manufactured Kaskaval cheese. II.Effect of waxing or packing in polyethylene sacs on the physical and chemical properties of cheese. *Agric. Res. Rev.*, v.50, p.169-174, 1972.
- MORRIS,H.A.; GUINEE,T.P.; FOX,P.F. Salt difusion in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.1851-1858, 1985.
- OLIVEIRA,J.S. *Queijos: fundamentos tecnológicos*. São Paulo: FTPT, 1982, 233p.
- PHELAN,J.A. Standardization of milk for cheesemaking at factoring level. *J. Soc. Dairy Technol.*, v.34, n.4, p.152-156, 1981.
- PHELAN,J.A.; GUINEY,J.; FOX,P.F. Proteolysis of β -casein in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, v.40, p.105-112, 1973.
- PRAANING-VAN DALEN,D.P. Application and regulatory position of Maxiren. *Bulletin of the IDF*, v. 259, p.8-12, 1992.
- RETTL,C.; SGUEDONI,A.; JULIANO,A.M.M. Coalhos e coagulantes. *Leite & Derivados*, v.2, n.7, p.27-3, 1992.
- SAS Institute,Inc. *SAS user's guide: statistics*. Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, 1988.

- STADHOUDERS, J.; HUP, G. Factors affecting bitter flavour in Gouda cheese. *Neth Milk Dairy J.*, v.29, p.335-351, 1975.
- STADHOUDERS, J.; HUP, G.; EXTERKATE, F.A.; VISSER, S. Bitter flavour in cheese. 1. Mechanism of the formation of the bitter flavour defect in cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, v.37, p.157-167, 1983.
- STEELE, J.L.; UNLU, G. Impact of the acid lactic bacteria on cheese flavour development. *J. Food Technol.*, v.46, p.128, 1992.
- STRYER, L. *Biochemistry*. 3. ed. New York: Freeman, 1988, 1089p.
- TEUBER, M. Production of chymosin (EC 3.4.23.4) by microorganisms and its use for cheesemaking. *Bulletin of IDF*, n.251, p.3-15, 1990.
- THOMAS, T.D.; PEARCE, K.N. Influence of salt on lactose fermentation and proteolysis in Cheddar cheese. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*, v.16, p.253-259, 1981.
- TUCKEY, S.L.; RUEHE, H.A. Relation of salt content to bitter flavor development in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, v.23, p.517-518, 1940.
- USTUNOL, Z.; HICKS, C.L. Effect of milk-clotting enzymes on cheese yield. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.8-16, 1990.
- VAKALERIS, D.G.; PRICE, W.V. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *J. Food Sci.*, v.42, p.264-276, 1959.
- VAN DEN BERG, G.; KONING, P.J. Gouda cheesemaking with purified calf chymosin and microbially produced chymosin. *Neth. Milk Dairy J.*, v.44, p.189-205, 1990.
- VISSER, S. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 2. Development of bitterness and cheese flavour. *Neth. Milk Dairy J.*, v.31, p.188-209, 1977.

- . Proteolytic enzymes and their action on milk proteins: a review. *Neth. Milk Dairy J.*, v.35, p.65-88, 1981.
- . Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *J.Dairy Sci.*, v.76, p.329-350, 1993.
- VISSER,S.; HUP,G.; EXTERKATE,F.A.; STADHOUDERS,J. Bitter flavour in cheese. 2.Model studies on the formation and degradation of bitter peptides by proteolytic enzymes from calf rennet, starter cells and starter cell fractions. *Neth. Milk Dairy J.*, v.37, p.169-180, 1983a.
- VISSER,S.; SLANGEN,K.J.; HUP,G. Some bitter peptides from rennet-treated casein. A method for their purification, utilizing chromatographic separation on silica gel. *Neth. Milk Dairy J.*, v.29, p.319-334, 1975.
- VISSER,S.; SLANGEN,K.J.; HUP,G.; EXTERKATE,F.A.; STADHOUDERS,J. The bitter flavour defect in cheese: some chemical and microbiological aspects. *Neth. Milk Dairy J.*, v.37, p.250-251, 1983b.
- VISSER,S.; SLANGEN,K.J.; HUP,G.; STADHOUDERS,J. Bitter flavour in cheese. 3. Comparative gel-chromatographic analysis of hidrophobic peptide fractions from twelve Gouda-type cheeses and identification of bitter peptides isolated from a cheese made with *Streptococcus cremoris* strain HP. *Neth. Milk Dairy J.*, v.37, p.181-182, 1983c.
- WALSTRA,P.; NOOMEN,A.; GEURTS,T.J. Dutch types varieties. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology 2*, London and New York: Elsevier, 1987, p.45-92.
- WOLFSCHOON-P.,A.F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. *Boletim do leite*, v.55, n.661, p.1-8, 1983.
- . Sobre a determinação da força do coalho. *Revista do Inst. de Latic. Candido Tostes*, v.35, n.207/212, p.33-34, 1980.