

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**COMPORTAMENTO DA FASE AQUOSA E EFEITO DO pH SOBRE A  
PROTEÓLISE E PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO QUEIJO PRATO**

**VIVIANE SOCCIO MONTEIRO HENRIQUE**

Engenheira de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. **Mirna Lúcia Gigante**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

**CAMPINAS – SP**

2004

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

H395c Henrique, Viviane Soccio Monteiro  
Comportamento da fase aquosa e efeito do pH sobre a  
proteólise e propriedades funcionais do queijo prato / Viviane  
Soccio Monteiro Henrique. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Queijo prato. 2.Proteólise. 3.Maturação. I.Gigante, Mirna  
Lúcia. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. III.Título.

ckn

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mirna Lúcia Gigante**

Universidade Estadual de Campinas  
Orientadora

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Paula Ribeiro**

Instituto Mauá de Tecnologia  
Membro da Banca

**Dr<sup>a</sup> Leila Maria Spadoti**

Instituto de Tecnologia de Alimentos  
Membro da Banca

**Dr<sup>a</sup> Vera Lúcia Signoreli Baldini**

Instituto de Tecnologia de Alimentos  
Membro da Banca

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Walkíria Hanada Viotto**

Universidade Estadual de Campinas  
Membro da Banca

**Dr José Leonardo Eto do Valle**

Instituto de Tecnologia de Alimentos  
Membro da Banca

**Prof Dr Salvador Massaguer Roig**

Universidade Estadual de Campinas  
Membro da Banca

À minha mãe Maria Cecília guerreira incansável.  
Ao Renato pelo amor, incentivo e compreensão.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mirna Lúcia Gigante, amizade, orientação e incentivo durante todo o trabalho;

À Fundação Educacional de Votuporanga, por ter concedido o meu afastamento para a realização deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Professores Doutores Walkíria Hanada Viotto, Salvador Massaguer Roig, Eliana Paula Ribeiro e os Doutores Vera Lúcia Signoreli Baldini, Leila Maria Spadoti e José Leonardo Eto do Valle, pelas sugestões na conclusão deste trabalho;

À Bete pelas eletroforeses, ensinamentos e ajuda durante a parte prática deste trabalho;

À Ana Lourdes pela ajuda durante a parte prática;

Aos estagiários Alexandre, Beati, Josi e Renata pelo grande carinho e dedicação;

Às alunas de iniciação científica e amigas Carina e Raquel pela ajuda, disposição e responsabilidade durante a realização de todo o trabalho, sem as quais, tudo seria mais difícil e demorado;

Aos amigos Raquel Rossi, Salles, Jorge, Leila, Marina, Luciano e Guillaume pela amizade e ajuda durante a realização deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Leite e Derivados pelo apoio;

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos pelo apoio;

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE GERAL

<b>Resumo Geral</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xi</b>
<b>Introdução Geral</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>1</b>
1. Características queijo Prato e do seu processamento .....	3
2. Maturação do queijo Prato. ....	5
3. Equilíbrio físico-químico entre a matriz protéica e a fase aquosa do queijo .....	8
4. Importância do pH em queijos.....	9
5. Alteração do pH pós-processamento .....	13
6. Derretimento.....	15
7. Referências Bibliográficas. ....	18
<b>Capítulo 2 – Estudo da fase aquosa do queijo Prato</b> .....	<b>27</b>
Resumo .....	29
Abstract .....	30
1. Introdução .....	31
2. Materiais e Métodos .....	32
2.1. Fabricação do queijo Prato .....	32
2.2. Composição do leite e do queijo. ....	33
2.3. Obtenção e caracterização da fase aquosa do queijo Prato .....	33
2.4. Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	34
3. Resultados. ....	34
3.1. Composição físico-química do leite e dos queijos.....	34
3.2. Fase aquosa do queijo Prato .....	35
3.3. Discussão.....	41
4. Conclusão .....	43
5. Referências Bibliográficas. ....	45

<b>Capítulo 3 - Estudo do efeito do pH sobre a proteólise do queijo Prato durante a maturação</b> .....	<b>49</b>
Resumo .....	51
Abstract .....	52
1. Introdução .....	53
2. Materiais e Métodos .....	54
2.1. Fabricação do queijo Prato .....	54
2.2. Composição físico-química do leite e do queijo .....	54
2.3. Alteração do pH dos queijos .....	55
2.4. Proteólise .....	55
2.5. Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	56
3. Resultados e discussão.....	57
3.1. Composição físico-química do leite e dos queijos.....	57
3.2. Efeito do pH sobre a proteólise do queijo Prato .....	58
4. Conclusões.....	66
5. Referências Bibliográficas .....	67
<b>Capítulo 4 - Metodologia para avaliar a capacidade de derretimento de queijo Prato</b> .....	<b>71</b>
Resumo .....	73
Abstract .....	73
1. Introdução .....	74
2. Materiais e Métodos .....	75
2.1. Fabricação do queijo Prato .....	75
2.2. Composição do queijo Prato. ....	76
2.3. Padronização da condição do teste de derretimento do queijo Prato. ....	76
2.4. Planejamento experimental.....	77
3. Resultados e discussão.....	77
3.1. Padronização da condição do teste de derretimento do queijo Prato. ....	77
3.2. Avaliação da condição de teste definida para acompanhar o derretimento do queijo Prato durante a maturação .....	89

4. Conclusão .....	91
5. Referências Bibliográficas .....	93
<b>Capítulo 5- Efeito do pH sobre o derretimento e a firmeza do queijo Prato...97</b>	
Resumo .....	99
Abstract .....	99
1. Introdução .....	100
2. Materiais e Métodos .....	102
2.1. Fabricação do queijo Prato .....	102
2.2. Composição do leite e do queijo. ....	103
2.3. Alteração do pH dos queijos .....	103
2.3.1. Experimentos exploratórios. ....	103
2.3.2. Alteração do pH do queijo para avaliação de firmeza e derretimento .....	107
2.4. Avaliação da capacidade de derretimento dos queijos .....	107
2.5. Avaliação da firmeza. ....	108
2.6. Delineamento experimental.....	108
3. Resultados e discussão.....	108
3.1. Experimentos exploratórios.....	108
3.2. Composição físico-química do leite e do queijo para a avaliação de firmeza e derretimento.....	110
3.3. Efeito da alteração do pH.....	110
3.4. Efeito do pH sobre a firmeza e derretimento.....	111
4. Referências bibliográficas .....	115
ANEXO I.....	121
<b>Conclusão Geral.....</b>	<b>133</b>

## RESUMO GERAL

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o comportamento da fase aquosa do queijo Prato durante sua maturação e o efeito do pH sobre a proteólise, a firmeza e a capacidade de derretimento do queijo. Para avaliar o efeito do tempo de maturação sobre a fase aquosa do queijo, após a fabricação, amostras foram aleatoriamente escolhidas diariamente, até o quinto dia de maturação, e avaliadas quanto à quantidade de fase aquosa liberada por centrifugação. A fase aquosa foi avaliada quanto aos teores de sólidos totais, nitrogênio total, frações nitrogenadas e perfil eletroforético. Os resultados indicaram que a fase aquosa liberada por centrifugação diminuiu significativamente durante os primeiros 5 dias de maturação evidenciando um rápido aumento da capacidade de retenção de água da matriz protéica. Através do perfil eletroforético evidenciou-se o aumento de frações caseicas ( $\alpha_{s1}$ -I-caseína e  $\gamma$ -caseína) e de proteínas intactas ( $\beta$ -caseína e  $\alpha_{s1}$ -caseína) na fase aquosa do queijo com 5 dias de maturação. Estes resultados sugerem que, além da proteólise, o comportamento da fase aquosa do queijo no período inicial da maturação pode ser também responsável pela melhoria da funcionalidade do queijo, uma vez que afeta a hidratação da matriz protéica.

Para estudar o efeito do pH sobre a proteólise, a firmeza e a capacidade de derretimento do queijo Prato durante a maturação utilizou-se um método de alteração do pH pós-fabricação. Os queijos utilizados para a troca de pH e posterior avaliação da proteólise foram ralados e os utilizados para a avaliação da firmeza e da capacidade de derretimento foram fatiados (6,5 x 5,0 x 3,0 cm). Em ambos os casos, as amostras foram divididas em 3 porções que foram submetidas aos tratamentos de alteração do pH utilizando-se um dessecador com prateleiras. A primeira porção foi exposta a atmosfera de amônio para aumentar o pH; a segunda porção foi exposta ao vapor de ácido acético para abaixar o pH; a terceira porção serviu de controle. Após a alteração do pH as amostras foram imediatamente embaladas a vácuo e armazenadas a 12 °C. Para avaliar a proteólise amostras foram aleatoriamente escolhidas após 1, 8, 15, 22, 29, 44 e 58 dias de maturação e avaliadas quanto ao pH, sólidos totais, nitrogênio total,

nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 12% e perfil eletroforético. A avaliação do efeito do pH sobre a firmeza e a capacidade de derretimento foi realizada após 8 dias de maturação. A melhor condição do teste de derretimento para o queijo Prato foi previamente definida como sendo 130 °C/ 10 minutos. Os resultados indicaram que os índices de extensão e profundidade de maturação aumentaram significativamente ao longo do tempo, porém, aumentaram menos para o pH mais baixo, quando, comparado aos demais tratamentos. O perfil eletroforético evidenciou que nos queijos de menor pH a degradação da  $\alpha_{S1}$  e da  $\beta$ -caseínas ocorreu mais lentamente e menos extensivamente do que nos queijos controle e de mais alto pH. Além disso, observou-se que existe uma correlação linear positiva entre pH e a firmeza dos queijos. Não se observou associação significativa entre o pH e a capacidade de derretimento dos queijos.

## ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the evolution of the aqueous phase of Prato cheese in the initial stages of ripening and the independent effect of pH on proteolysis, firmness and melting ability of the cheese. To evaluate the effect of ripening time on the aqueous phase of the cheese after manufacture, samples were randomly taken every day up to the fifth day of ripening and subsequently evaluated for the amount of aqueous phase separated by centrifugation. The aqueous phase was evaluated for the level of total solids, total nitrogen, nitrogen fractions and electrophoretic profile. The results indicated that the aqueous phase separated by centrifugation significantly decreased over the first five days of ripening, thereby evidencing a rapid increase of the water binding capacity of the protein matrix. The electrophoretic profile evidenced an increase of the levels of casein fractions ( $\alpha_{s1}$ -I-casein and  $\gamma$ -casein) and intact proteins ( $\beta$ -casein and  $\alpha_{s1}$ -casein) in the aqueous phase of cheese after 5 days ripening. These results suggest that, in addition to proteolysis, the evolution of the aqueous phase of cheese in the initial stages of ripening may also contribute to improving the functionality of cheese, as a result of the effect the aqueous phase has on the degree of hydration of the protein matrix.

A post-manufacture pH change methods was used to study the independent effect of pH on proteolysis, firmness and melting ability of Prato cheese during ripening. The cheeses submitted to post-manufacture pH change and subsequent evaluation of proteolysis were grated, whereas those used for evaluation of firmness and melting ability were sliced (6,5 x 5,0 x 3,0cm). In both cases, the cheese samples were divided into 3 equal portions and submitted to pH change treatments in a desiccator with shelves. The first portion was exposed to ammonium hydroxide to raise the pH; the second portion was exposed to acetic acid to lower the pH; the third portion was used as control (no treatment). Immediately after the pH change procedure was completed, the samples were vacuum packed and stored at 12°C. To evaluate the effect on proteolysis, randomly selected samples were submitted to analysis after 1, 8, 15, 22, 29, 44

and 58 days ripening and evaluated for pH, total solids, total nitrogen, nitrogen soluble at pH 4,6, nitrogen soluble in 12% trichloroacetic acid (TCA) and electrophoretic profile. Evaluation of the effect of pH on firmness and melting capacity was performed after 8 days ripening. 130°C/10 minutes had previously been determined as the optimal temperature/time test condition for the melting test of Prato cheese. The results indicated that both the ripening extension index and the ripening depth index significantly increased with time, but the increase was less intense in the case of the low pH cheeses. The electrophoretic profile showed that degradation of  $\alpha_{S1}$  and  $\beta$ -caseins occurred at a slower rate and less extensively in the low pH cheeses as compared to the cheese samples of the control and high pH groups. Furthermore, statistical analysis showed that there is a positive linear correlation between pH and the degree of firmness of the cheeses investigated. No significant association was found between pH and the melting ability of the cheeses.

## INTRODUÇÃO GERAL

O queijo Prato é obtido por coagulação enzimática, de massa lavada e semicozida. É o segundo queijo mais consumido do Brasil, após um período de maturação de no mínimo 25 dias. Seu processo de fabricação é bem definido tecnologicamente e originou-se dos queijos Gouda holandês e Danbo dinamarquês. A composição média do queijo Prato maturado é 42–44% de umidade, 26–29% de gordura, 1,6–1,9% de sal e pH variando entre 5,2 e 5,4 (Furtado & Lourenço Neto, 1994).

Embora a composição básica e a estrutura do queijo sejam determinadas durante o processo de fabricação, é na maturação, caracterizada pela glicólise, proteólise e lipólise, que a identidade e as características únicas de cada variedade são desenvolvidas (Lawrence et al., 1984 e Fox et al., 1993).

A proteólise e seu papel no desenvolvimento das propriedades funcionais, tais como textura, capacidade de derretimento e fatiamento dos queijos são amplamente descritas na literatura (Fox, 1989; Lawrence et al., 1987 e Fox et al., 1993). Entretanto, outros autores (Kiely et al., 1993 e Kindstedt, 1993) têm sugerido que as mudanças nas propriedades funcionais dos queijos podem estar também relacionadas com a mudança de equilíbrio físico-químico entre a matriz protéica e fase aquosa do queijo nos estágios iniciais de maturação.

O pH pode ser visto como um parâmetro definitivo que forma a identidade e a qualidade de todos os queijos, uma vez que afeta diretamente a sua estrutura e suas propriedades reológicas, possivelmente porque é o parâmetro mais importante que governa a relação entre a matriz protéica e a fase aquosa do queijo. Embora várias pesquisas relatem a influência do pH sobre as propriedades físico-químicas e funcionais dos queijos durante a fabricação e maturação (Sheehan & Guinee, 2004; Guinee et al., 2002 e Watkinson et al., 2001), até recentemente era difícil estudar o efeito independente do pH sobre os atributos de qualidade dos queijos, pois ao mudar o pH durante o processo de fabricação, outros parâmetros químicos e enzimáticos são alterados, produzindo resultados que se confundem com o efeito do pH. O desenvolvimento de métodos de

alteração do pH pós-processo (Kindstedt et al., 2001 e Pastorino et al., 2003) possibilitou estudar o efeito independente do pH sobre as características dos queijos.

Dada a importância do queijo Prato no mercado brasileiro, diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de caracterizar a microbiota do queijo Prato (Valle et al., 1992), monitorar o desenvolvimento de proteólise (Baldini, 1998), avaliar o efeito de diferentes coagulantes sobre o rendimento, a maturação e as características sensoriais (Augusto, 2003), acelerar o processo de maturação (Silva, 1998; Minussi, et al., 1995 e Schulz, 2003) e adaptar novas tecnologias, tais como a ultrafiltração para a sua fabricação (Ribeiro, 1996; Spadoti, 2003 e Dornellas, 2003). Apesar disso, nada se conhece sobre a fase aquosa do queijo Prato e sobre o efeito independente do pH sobre suas características.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento da fase aquosa do queijo no início da maturação e o efeito do pH sobre a proteólise e as características funcionais do produto.

Para tanto, o trabalho foi dividido em 5 capítulos. No primeiro capítulo apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre as características do queijo Prato. O segundo capítulo teve por objetivo estudar o equilíbrio físico-químico entre a matriz protéica e a fase aquosa do queijo Prato no estágio inicial da maturação. No terceiro capítulo avaliou-se o efeito independente do pH sobre a proteólise do queijo Prato durante a maturação utilizando-se um método de alteração do pH pós-fabricação.

Para avaliar o efeito do pH sobre a capacidade de derretimento, padronizou-se primeiramente as condições de tempo e temperatura ideais para o teste, isto é apresentado no quarto capítulo. Utilizou-se análise de superfície de resposta e o método de Schreiber's para definir a melhor condição de teste de derretimento do queijo Prato. No quinto capítulo, utilizando-se o método de alteração de pH pós-processo adaptado para fatias de queijo, avaliou-se o efeito independente do pH sobre a capacidade de derretimento e a firmeza do queijo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUGUSTO, M.M.M. **Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo Prato.** 2003. 190p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BALDINI, V. L. S. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação.** 1998. 208p. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

DORNELLAS, J.R.F. **Contribuição ao estudo do queijo Prato a partir de retentados obtidos por ultrafiltração de leite com ou sem pré-fermentação.** 2003. 201p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F.; LAW, J.; McSWEENEY, P. L.; WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P. F., ed. **Cheese: chemistry physics and microbiology.** General aspects. London: Elsevier Applied Science, 1993, v. 1, cap.10, p. 389-438.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. **Tecnologia de queijos:** Manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.

GUINEE, T. P.; FEENEY, E. P.; AUTY, M. A. E.; FOX, P. F. Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p. 1655-1669, 2002.

KIELY, L. J.; KINDSTEDT, P. S.; HENDRICKS, G. M.; LEVIS, J. E.; YUN, J. J.; BARBANO, D. M. Effect of draw pH on the development of curd structure during the manufacture of Mozzarella cheese. **Food Structure**, v.11, n.3, p. 217-224, 1993.

KINDSTEDT, P. S. Effect of manufacturing factors, composition, and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 33, n.2, p. 167-187, 1993.

KINDSTEDT, P.S.; ZIELINSKI, A.; ALMENA-ALISTE, M.; GE, C. A post-manufacture method to evaluate the effect of pH mozzarella cheese characteristics. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.56, n. 3, p. 14-19, 2001.

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

LAWRENCE, R. C.; HEAP, H. A.; GILLES, J. A controlled approach to cheese technology. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 8, p. 1632-1645, 1984.

MINUSSI, R. C.; FURTADO, M. M.; MOSQUIM, M. A. C. V. Avaliação de métodos para aceleração da maturação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.50, n. 291, p. 31-42, 1995.

PASTORINO, A. J.; HANSEN, C. L.; McMAHON, D.J. Effect of pH on the chemical composition and structure-functional relationships of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v.86, n. 9, p.2751-2760. 2003

RIBEIRO, E. P. **Aplicação de ultrafiltração de leite no processo de fabricação de queijo prato.** 1996. 144p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

SILVA, A. T. **Maturação do queijo tipo Prato: influência da adição de enzimas proteolíticas no processo.** 1998. 119p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SHEEHAN, J. J.; GUINEE, T. P. Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional properties of reduced-fat Mozzarella cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, n.2, p. 161-172, 2004.

SCHULZ, J.G. **Efeito da utilização de *slurry* sobre a maturação de queijo Prato.** 2003. 102p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SPADOTI, L.M. **Avaliação de propriedades de queijo tipo Prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação.** 2003. 229p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

VALLE, J.L.E do.; MORENO, I.; VAN DENDER, A. G. F.; SOUZA, G. Evolução da microbiota láctica do queijo Prato conservado a temperaturas de subcongelamento. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.22, n. 1, 83-91, 1992.

WATKINSON, P.; COKER, C.; CRAWFORD, R.; DODDS, C.; JOHNSTON, K.; MCKENNA, A.; WHITE, N. Effect of cheese pH and ripening time on model

cheese textural properties and proteolysis. **International Dairy Journal**, v.11, n.4-7, p. 455-464, 2001.

## **CAPÍTULO I**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO PRATO E DO SEU PROCESSAMENTO

O queijo Prato é um dos mais populares do Brasil e foi introduzido no país na década de 20, na região sul de Minas Gerais, através de imigrantes dinamarqueses. Devido ao fato do Prato ser um queijo semiduro, de massa lavada, acredita-se que sua tecnologia tenha se baseado principalmente na de queijos como o Danbo dinamarquês e o Gouda holandês. No Brasil, a tecnologia foi adaptada às condições locais, o que explica as diferenças de sabor e textura em relação aos que lhe deram origem (Furtado & Lourenço Neto, 1994; Furtado & Amorim, 2000).

O queijo Prato pode ser encontrado em quatro variedades: Lanche, Estepe, Bola ou Esférico e Cobocó. Os pesos variam de 0,4 a 5kg, de acordo com a variedade correspondente (BRASIL, 1997). A variedade Lanche é a dominante no mercado, apresentando-se em vários tamanhos, pesando geralmente entre 0,5 a 3 kg (Oliveira, 1986). O rendimento da fabricação é de 9,0 – 9,5 litros/ kg e a fatiabilidade é uma de suas principais características (Furtado & Lourenço Neto, 1994).

De acordo com a Portaria N<sup>o</sup> 358/1997, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA entende-se por queijo Prato o queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. É obtido, de uma massa semicozida, com remoção parcial do soro, lavagem da massa com adição de água quente, pré-prensagem, moldagem sob soro, prensagem, salga e maturação por pelo menos 25 dias. Este é o tempo considerado necessário para o queijo Prato desenvolver suas características específicas. É classificado como queijo gordo e de umidade média, devendo apresentar consistência semidura e elástica, cor amarelada, sabor e odor característicos, não possuir crosta ou, se possuir, esta deve ser fina e lisa. A textura é compacta, lisa e fechada, podendo apresentar pequenos olhos em algumas variedades.

De acordo com Oliveira (1986) o fermento láctico utilizado na fabricação do queijo Prato é composto basicamente de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (tipo “O”), microrganismos que degradam a lactose do leite unicamente em ácido láctico, produzindo queijo de massa fechada e aroma mais suave, adequado ao fatiamento para consumo indireto em lanches, sanduíches e outros pratos culinários. Para a produção de queijo com sabor mais pronunciado indica-se a utilização de fermento tipo “LD”, o qual é composto por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, microrganismos que produzem ácido láctico, aroma e gás carbônico, conferindo ao queijo sabor e olhaduras típicas (Furtado & Amorim, 2000).

O queijo Prato é fabricado com leite pasteurizado, admitindo-se a pasteurização lenta (63°C/30minutos) e a rápida (72-75 °C/ 15-20 segundos). Na temperatura de coagulação do leite (32–35 °C) adiciona-se a cultura láctica, o cloreto de cálcio, o corante urucum e o coalho. Após a coagulação, a massa é cortada e agitada por aproximadamente 20 minutos, com a finalidade de promover a dessoragem dos grãos. Em seguida, retira-se 30% do soro e inicia-se o aquecimento gradativo da mistura soro/massa (semi-cozimento), com adição de água a 80 °C, até que a mistura alcance 40 °C. A mistura é mantida nesta temperatura, sob agitação, até obtenção do ponto de massa. As etapas seguintes são dessoragem, enformagem, prensagem, salga em salmoura e maturação (Oliveira,1986; Furtado & Lourenço Neto, 1994). Furtado et al. (1979) sugerem a adoção de banho em água gelada, por 24 horas, antes da salga em salmoura, para minimizar a perda de peso que ocorre durante a salga úmida.

Segundo Furtado & Lourenço Neto (1994), a composição média do queijo Prato curado é de 42-44% de umidade, 26-29% de gordura, pH 5,2-5,4 e 1,6-1,9% de sal. Schiffan & Komatsu (1980) estudaram a composição de 50 marcas de queijo Prato consumidas na cidade de São Paulo e obtiveram a seguinte composição média: 40% de umidade (mínimo 25% e máximo 49%); 47,5% de gordura no extrato seco (mínimo 31% e máximo 58%); 1,7 % de sal (0,7% mínimo e máximo 3,6%); 3,5% de cinzas (2,1% mínimo e máximo 5,3%); e 0,86% de ácido

lático (0,27% mínimo e máximo 2,15%). Em relação à porcentagem de proteínas, os teores variam de 18 a 24% (Silva, 1998; Baldini, 1998; Spadoti et al., 2003; Dornellas, 2003; Schulz, 2003). Estes dados demonstram uma grande variedade na composição do queijo disponível no mercado.

A estrutura do queijo Prato, que é basicamente definida pelo processo de fabricação, é constituída de uma malha protéica densa, similar a uma esponja, sendo que o soro e as gotículas de gordura são distribuídos uniformemente pela matriz protéica (Spadoti et al., 2004).

## **2. MATURAÇÃO DO QUEIJO PRATO**

Três eventos ocorrem durante a maturação dos queijos: glicólise, proteólise e lipólise. Estas reações são responsáveis pela mudança de textura que ocorre no coágulo do queijo durante a maturação e são também grandemente responsáveis pelo aroma do queijo, embora numerosas mudanças secundárias ocorram concomitantemente (Fox et al., 1993).

Queijos obtidos por coagulação enzimática são maturados por períodos que variam de 2 semanas, por exemplo Mussarela, a 2 ou mais anos, por exemplo Parmegiano-Reggiano e Cheddar extra maturado. O processo de maturação é complexo, envolvendo mudanças microbiológicas e bioquímicas na massa que resultam em sabor, aroma e textura características de cada variedade (McSweeney, 2004). Na maturação do queijo Prato, a proteólise é sem dúvida o evento mais importante.

A proteólise contribui para o desenvolvimento de aromas desejáveis e indesejáveis, os quais são formados pela liberação de aminoácidos e peptídeos, através da hidrólise, ou via catabolismo de aminoácidos transformando-os em aminas, ácidos, tióis, tioésteres. Estes compostos responsáveis pelo sabor são liberados durante a mastigação. Contribui também para mudanças na textura pela quebra da cadeia de proteínas, aumento do pH (via formação de  $\text{NH}_3$ ) e aumento na capacidade de ligar água pela formação de novos grupos amínicos e carboxílicos (Fox, 1989).

As principais fontes de enzimas responsáveis pela proteólise incluem o coalho residual, as enzimas naturais do leite, especialmente a plasmina, as enzimas produzidas pelos microrganismos do fermento e as produzidas por microrganismos contaminantes, não presentes no fermento (Fox, 1989).

Em queijos de massa lavada, a proteólise ocorre inicialmente pela ação da atividade residual do coalho, especialmente a quimosina, responsável pela formação da maior parte das substâncias nitrogenadas solúveis, com a liberação de peptídeos de alto e médio peso molecular e baixa quantidade de aminoácidos. A  $\alpha_{s1}$ -caseína é a fração caseica degradada mais rapidamente durante a maturação. Sua degradação é favorecida pelo pH do queijo e pela proximidade do pH ótimo de atuação do coalho, bem como pelo conteúdo de sal. A  $\beta$ -caseína é hidrolisada mais lentamente e aproximadamente 50% desta fração caseica permanece intacta após 6 meses de maturação (Walstra et al., 1999).

O pH, conteúdo de sal e umidade influenciam a proteólise do queijo. Além disso, a estrutura e o acesso aos vários sítios de clivagem da caseína na matriz do queijo, bem como o tipo e a atividade das enzimas proteolíticas, determinam a velocidade e a extensão da proteólise (Farkye, 1995).

A textura desejável em queijos é desenvolvida durante a maturação e pode ser dividida em duas fases. A primeira fase acontece entre os dias 7 e 14 após a fabricação do queijo, quando a textura borrachenta do queijo jovem é transformada em macia e homogênea. O enfraquecimento da matriz caseica acontece quando 20% das ligações Phe<sub>24</sub>-Val<sub>25</sub>, das  $\alpha_{s1}$ -caseínas, são hidrolisadas formando o peptídeo  $\alpha_{s1}$ -I-caseína, o qual está presente no estágio inicial de maturação em todos os tipos de queijos. A segunda fase envolve mudança mais gradual na textura, a qual envolve a hidrólise das  $\alpha_{s1}$ -caseínas restantes e de outras caseínas, levando meses ou semanas para acontecer. Esta é controlada principalmente pela proporção residual de quimosina e plasmina, pelas proteinases bacterianas, pela relação sal e umidade e temperatura de estocagem (Lawrence et al., 1987).

Através do perfil eletroforético dos queijos durante a maturação, Schulz (2003) demonstrou que a redução da firmeza do queijo Prato nos primeiros 14 dias

de maturação foi acompanhada de visível degradação da  $\alpha_{s1}$ -caseína e concomitante aumento da fração  $\alpha_{s1}$ -I-caseína. A diminuição da firmeza do produto obtido por ultrafiltração após 25 dias de maturação também foi observada por Spadoti (2003) e Dornellas (2003).

A proteólise, como índice de maturação, envolve a caracterização, separação e quantificação dos compostos nitrogenados do queijo durante a maturação. O índice de extensão de maturação é caracterizado pela proporção de moléculas de proteínas que são decompostas, predominantemente em peptídeos grandes. O índice de profundidade de maturação refere-se ao grau destes produtos quebrados em componentes menores, entre os quais estão os aminoácidos. A determinação analítica do índice de extensão baseia-se na precipitação isoelétrica da caseína a pH 4,6 em uma amostra diluída de queijo, seguida pela quantificação do nitrogênio solúvel pelo método de Kjeldahl. A profundidade é quantificada pelo nitrogênio não protéico, medido pelo nitrogênio solúvel em TCA 12% (Walstra et al., 1999).

Schulz (2003) estudou a aceleração de maturação do queijo Prato pela adição de *slurry* ao leite e na massa, e observou que o índice de extensão de maturação aumentou de 10 para 19, entre o 1º e 40º dia de maturação. O índice de profundidade aumentou de 3,4 para 11 do 1º ao 40º dia de maturação. Baldini (1998) acompanhou a proteólise na maturação do queijo Prato, obtendo valores para o índice de extensão de maturação que variaram de 6,84 a 13,89, após 1 e 40 dias de maturação, respectivamente.

Gorostiza et al. (2004), acompanhando a proteólise em queijo Prato, fabricado com leite cru e adição de coalho bovino, observaram que a hidrólise da  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ -caseína foram similares em todos os queijos e que a  $\alpha_{s1}$ -caseína foi hidrolisada mais extensivamente (65%) que a  $\beta$ -caseína (20%). Os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (como porcentagem do nitrogênio total) aumentaram de 7,23 para 21,4% e em TCA 12% (como porcentagem do nitrogênio total) de 2,80 para 12,53% do 1º ao 60º dia de maturação.

Para o queijo Prato fabricado por ultrafiltração, Spadoti (2003) encontrou índices de extensão de maturação variando entre 13 e 18% com 10 dias de

maturação e entre 20 e 27% com 45 dias de maturação. Para o índice de profundidade de maturação os valores variaram de 3 a 5% com 10 dias e de 6 a 8,3% com 45 dias de maturação.

### **3. EQUILÍBRIO FÍSICO-QUÍMICO ENTRE A MATRIZ PROTÉICA E A FASE AQUOSA DO QUEIJO**

A proteólise e seu papel no desenvolvimento das propriedades funcionais, tais como textura, capacidade de derretimento e fatiamento dos queijos são amplamente descritas, na literatura (Fox, 1989; Lawrence et al., 1987; Fox et al. 1993). Entretanto, outros estudos (Kiely et al., 1993; Kindstedt, 1993) têm sugerido que as mudanças nas propriedades funcionais dos queijos podem estar também relacionadas com a mudança de equilíbrio físico-químico entre a matriz protéica e a fase aquosa do queijo nos estágios iniciais de maturação.

Utilizando a avaliação da fase aquosa, obtida por centrifugação do queijo, para estudar a interação da matriz protéica com a fase soro do queijo Mussarela, Guo & Kindstedt (1995) observaram que 30% do conteúdo total de umidade do queijo foi expelido durante os primeiros dias de fabricação; porém este conteúdo decresceu para zero após duas semanas a 4 °C, devido ao aumento da capacidade da matriz protéica ligar água. A análise da fase aquosa mostrou caseínas intactas e minerais associados à caseína (Ca, Mg e Zn), tornando-se mais solúveis durante a maturação. Em contraste, concentrações de Na e K permaneceram constantes na fase aquosa do queijo porque estes minerais são completamente solúveis. Os autores concluíram que existe um equilíbrio dinâmico entre a matriz protéica e a fase aquosa, por meio do qual a caseína intacta migra da matriz para a fase aquosa até que um equilíbrio seja estabelecido.

Guo et al. (1997) compararam mudanças na fase aquosa de mussarela salgada em salmoura e mussarela sem sal. Os autores observaram que a quantidade de fase aquosa diminuiu durante o armazenamento para ambos queijos. Entretanto, a quantidade de fase aquosa foi maior no queijo sem sal e diminuiu mais lentamente do que a fase aquosa do queijo salgado, indicando a

importância do sal na capacidade de retenção de água do queijo e, conseqüentemente, suas características funcionais.

Paulson et al. (1998) avaliaram a capacidade de retenção de água do queijo Mussarela fabricado a partir de leite desnatado com diferentes teores de sal. Os autores observaram que a capacidade de retenção de água aumentou com o aumento da concentração de sal. O queijo sem sal apresentou menor capacidade de derretimento do que o queijo salgado, possivelmente porque apresentou menor capacidade de retenção de água.

Boutrou et al. (1999) estudaram as mudanças na composição da fase aquosa do queijo Camembert durante a maturação. Os autores observaram que a quantidade de fase aquosa do queijo decresceu durante a maturação de 67 a 19% da umidade total do queijo após 16 dias de armazenamento. Na fase aquosa houve um aumento de nitrogênio total, nitrogênio solúvel e nitrogênio não protéico. A avaliação do perfil eletroforético da fase aquosa indicou a ausência de proteólise até o 4º dia de maturação. Entre o 6º e 8º dias de maturação observou-se menor nível de caseína intacta e numerosas bandas obtidas pela degradação de caseína. Segundo os autores, o estudo da fase aquosa pode ser um bom indicador dos mecanismos que ocorrem durante a proteólise do queijo Camembert.

Nenhum estudo foi conduzido até o momento para verificar o comportamento da fase aquosa do queijo Prato e suas implicações sobre sua funcionalidade.

#### **4. IMPORTÂNCIA DO pH EM QUEIJOS**

A fermentação da lactose e a conseqüente produção de ácido láctico é essencial para o processamento de todas as variedades de queijos. O pH da massa do queijo, o qual pode variar de 4,5 a 5,2, dependendo da variedade, afeta as características da massa e, conseqüentemente, o produto final. O pH afeta a sinérese da massa e, desta forma a umidade do queijo. Quanto menor o pH, maior a sinérese. Sua variação é também responsável pelo teor de minerais no queijo. Quanto mais baixo o pH, mais desmineralizado é o produto. O pH no tanque de

fabricação também afeta a retenção de coalho e plasmina na massa, afetando, conseqüentemente, o desenvolvimento da proteólise posterior. Além das conseqüências para a estrutura do queijo, a redução do pH também contribui para a segurança do produto, uma vez que inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis. As bactérias ácido-láticas constituintes do fermento são mais ácido-tolerantes do que os microrganismos contaminantes (Fox et al., 1990).

Patel et al. (1972) estudaram o efeito do pH do leite na sinérese. Para alteração do pH do leite os autores utilizaram HCl e os pH alcançados foram 5,2, 5,4, 5,6 e 5,8. Os resultados indicaram que a umidade da massa aumentou linearmente de 69,27 para 74,95% com o aumento do pH de coagulação de 5,2 para 5,8.

Diminuindo o pH de dessoragem há um aumento da perda de minerais da massa. Por exemplo, o queijo Cheddar, o qual é normalmente dessorado com pH 6,1, tem menor conteúdo de minerais que o queijo Emmental, o qual é dessorado com pH de 6,5 (Lucey & Fox, 1993).

No pH natural do leite (6,7), ambas, quimosina e micelas de caseína são negativamente carregadas. Com o abaixamento do pH as cargas negativas diminuem para ambas, resultando em menor possibilidade de repulsão entre elas, o que pode ser importante para a ligação entre quimosina e caseína (Larsson et al., 1997). Holmes et al. (1977) mostraram que a quantidade de coalho bovino retido na massa depois da sinérese aumentou com o decréscimo do pH.

A produção de ácido, com correspondente diminuição do pH, é crítica no processamento de queijo e necessária para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis durante o processamento. A falta de fermento láctico, ou a produção insuficiente de ácido para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis, é um fator contribuinte para ocasionar doença de origem alimentar por contaminantes do queijo (Zottola & Smith, 1999). Tatini et al. (1971) observaram que quando a cultura acidificante era inibida, *Staphylococcus aureus* cresciam e produziam quantidade detectável de enterotoxina nos queijos Cheddar e Colby. Ibraim et al. (1981) e Reiter et al. (1964) também demonstraram que quando a cultura acidificante era inibida os *Staphylococcus* se multiplicavam.

O pH de drenagem também determina a proporção de plasmina no queijo. Plasmina é uma proteinase nativa do leite formalmente conhecida como protease alcalina. Em leite fresco a plasmina está associada à micela de caseína, mas é dissociada com o decréscimo do pH. Por esta razão, a proporção de plasmina é grande em queijo Suíço, o qual é dessorado num alto pH e pequena em queijo ácido como o Cheshire (Lawrence et al, 1987). Segundo Farkey & Fox (1990) no queijo Emmental a atividade da plasmina é de 2,69 AMC unidades / grama e no queijo Cheshire é de 0,76 AMC unidades / grama. Sendo que AMC (7 amido – 4 metil cumarina) é um composto fluorescente utilizado na quantificação desta enzima.

Sheehan & Guinee (2004) estudaram o efeito do pH e do teor de cálcio na bioquímica, textura e propriedades funcionais do queijo Mussarela com teor reduzido de gordura. Os autores encontraram menor teor de cálcio e proteína nos queijos que sofreram acidificação direta, os quais apresentaram menor pH na drenagem do soro do que aquele que foi apenas adicionado de fermento láctico (controle). Houve aumento da capacidade de ligar água durante o armazenamento para todos os queijos, porém os queijos que apresentaram menor teor de cálcio apresentaram maior capacidade de ligar água e maior teor de umidade. Os queijos que foram processados com acidificação direta tiveram maior hidrólise da  $\alpha_{s1}$ -caseína do que o queijo controle. Segundo os autores, pode ser devido à menor atividade residual da quimosina no queijo controle, a qual diminui com o aumento do pH no momento da adição da renina e na drenagem. A maior firmeza e menor derretimento foram obtidas no queijo controle, segundo os autores, devido a uma menor proteólise primária, a um maior teor de cálcio e um menor conteúdo de proteína hidratada.

Watkinson et al. (2001) fabricaram queijo com processo semelhante ao Cheddar, para estudar o efeito da variação do pH sobre a textura e a proteólise. Os autores observaram aumento da firmeza, do nitrogênio solúvel em água e do nitrogênio não protéico quando o pH aumentou de 5,20 para 6,22. Os autores concluíram que o aumento do nitrogênio não protéico deveu-se, provavelmente, à maior hidrólise de  $\beta$ -caseína, devido a maior atividade da plasmina no mais alto

pH (6,2). Por outro lado, a menor hidrólise da  $\alpha$ -caseína pode estar relacionada à diminuição da atividade do coalho no pH mais alto (6,2).

Yun et al. (1993 a, b) estudaram o efeito do pH na proteólise e nas propriedades funcionais do queijo Mussarela. Os pesquisadores observaram a diminuição do teor de cálcio com o abaixamento do pH, porém essa diferença não foi significativa. O pH não afetou a proteólise, o perfil de textura e a capacidade de derretimento do queijo. Durante os 50 dias de armazenamento observaram que a firmeza diminuiu e o derretimento aumentou, porém estas alterações foram atribuídas exclusivamente à proteólise.

Guinee et al. (2002) estudaram o efeito do pH sobre as propriedades funcionais da Mussarela. Observaram que o queijo fabricado por acidificação direta, apresentou maior pH e menor firmeza, quando comparado ao queijo controle. Com apenas 1 dia de fabricação, o queijo fabricado por acidificação direta apresentou derretimento e microestrutura iguais ao do queijo controle com 20 dias. Os pesquisadores concluíram que alterando-se o pH e a concentração de cálcio, pode-se modificar as propriedades funcionais desenvolvidas no queijo durante o período de armazenamento.

Feeney et al. (2002) fabricaram 4 diferentes queijos Mussarela a partir do mesmo leite: acidificado com cultura láctica; adição de ácido láctico (5 g/100 mL leite) e adição de uma mistura de ácido láctico e gluco-delta-lactona nos níveis de 1,6 ou 3,6 g/100 g de massa coagulada. Avaliaram o efeito do pH e da concentração de cálcio sobre a proteólise do queijo Mussarela. Os pesquisadores verificaram que o teor de umidade e a extensão da proteólise foram significativamente afetadas, tanto pelo pH quanto pelo conteúdo de cálcio. Quando o pH foi aumentado de 5,5 para 5,9, mantendo-se a razão cálcio/caseína relativamente constante a 29 mg/g, resultou num aumento da proteólise primária, porém sem efeito sobre a secundária. O queijo controle feito com cultura láctica apresentou os maiores níveis de nitrogênio solúvel a pH 4,6 e degradação da  $\alpha_{s1}$ -caseína. Os autores concluíram que a cultura foi o principal agente responsável pela formação de pequenos peptídeos e aminoácidos.

Yazici & Dervisoglu (2003) estudaram o efeito do ajuste do pH durante a etapa de fabricação do queijo Civil. Os queijos com pH de 5,45 e 5,40 tiveram os maiores valores de sal na umidade, porém menores teores de matéria seca e nitrogênio total. O teor de nitrogênio solúvel aumentou significativamente para todos os queijos, porém, foi maior para os queijos com pH 4,45 e 5,40. Os autores verificaram que os queijos fabricados com pH de 5,30 e 5,35 mantiveram suas propriedades químicas, bioquímicas e sensoriais constantes durante o armazenamento e concluíram que estes valores de pH devem ser utilizados para a fabricação deste queijo.

Marchesseau et al. (1997) avaliaram o efeito do pH durante a fabricação de queijos processados. Os autores sugeriram que a redução do pH, durante o processamento do queijo poderia aumentar as interações entre as proteínas, pois houve aumento da quantidade de proteína sedimentada por centrifugação, seguido pela diminuição da capacidade de retenção de água dessas proteínas. No pH 5,7 foi obtida a maior firmeza, a qual foi reduzida quando o pH foi elevado para 6,7 ou reduzido para 5,2. Através de micrografias, os autores verificaram que pequenas variações de pH provocaram mudanças significativas na organização da matriz protéica.

O efeito do pH sobre as propriedades de queijo Cheddar foi estudado por Ramkumar et al. (1997). Os autores verificaram que diminuindo o pH a quantidade de fase aquosa centrifugada também diminuiu. Observaram também o aumento da quantidade de cálcio na fase aquosa com a diminuição do pH.

Em conclusão, a variação do pH durante o processamento provoca alterações na composição do queijo e na retenção de enzimas. Desta forma, os efeitos dessas variações se confundem com o efeito independente do pH sobre as características do queijo.

## **5. ALTERAÇÃO DO pH PÓS-PROCESSAMENTO**

Uma alternativa para se estudar o efeito independente do pH sobre as características dos queijos é alterar seu pH após a fabricação. Esta técnica foi

primeiramente descrita por Noomen (1983), que aumentou o pH do queijo Meshanger expondo o coágulo ao vapor de amônio. Foi posteriormente modificada por Vassal et al. (1986) para estimular um gradiente de pH em queijo Camembert e foi adaptada e expandida por Kindstedt et al. (2001), o qual utilizaram hidróxido de amônio e ácido acético para aumentar ou diminuir o pH do queijo Mussarela, respectivamente. Recentemente, Pastorino et al. (2003) descreveram uma técnica de modificação do pH do queijo Cheddar através da injeção, à alta pressão, de uma solução de gluco-delta-lactona no queijo. O desenvolvimento destes métodos possibilitou a alteração do pH dos queijos pós-fabricação, em uma ampla faixa de variação, viabilizando o isolamento desta variável para que seu efeito sobre as diferentes características dos queijos pudesse ser explorado.

Kindstedt et al. (2001) estudaram o efeito do pH no derretimento e na distribuição de cálcio no queijo Mussarela. A alteração do pH foi realizada mediante exposição do queijo ralado às atmosferas de hidróxido de amônio e ácido acético respectivamente, para aumentar e diminuir o pH do queijo. Segundo os autores, o pH tem forte influência na distribuição de cálcio entre a fase aquosa e a matriz protéica. Quando o pH aumentou de 5,0 para 7,0, observaram diminuição de cálcio solúvel e conseqüentemente redução do derretimento. Com o decréscimo do pH de 5,0 para 4,7 também ocorreu diminuição do derretimento, uma vez que a aproximação do ponto isoelétrico favoreceu a interação proteína-proteína, suplantando o efeito da solubilização do cálcio.

Pastorino et al. (2003) alteraram o pH do queijo Cheddar pós-fabricação para estudar o efeito do pH na química, na estrutura e nas propriedades funcionais do queijo. Os autores mudaram o pH do queijo pela injeção a alta pressão de gluco-delta-lactona. Depois da injeção os queijos foram embalados a vácuo e armazenados. Segundo os autores, a habilidade da matriz protéica de ligar água diminui abaixo do pH 5,0, resultando em aumento da sinérese e decréscimo da umidade. Os autores verificaram que houve solubilização de cálcio com a diminuição do pH. A diminuição do pH de 5,3 para 5,0 resultou em aumento do conteúdo de nitrogênio solúvel em TCA durante o armazenamento. Entretanto,

quando o pH foi reduzido de 5,0 para 4,7 resultou em menor proteólise durante o mesmo período. A dureza diminuiu e o derretimento aumentou quando o pH baixou de 5,3 para 5,0, o que foi atribuído à solubilização do cálcio presente nos agregados de caseína, diminuindo a interação entre estas proteínas.

Monteiro (2004) estudou o efeito do pH sobre a capacidade de derretimento, firmeza e equilíbrio físico-químico e a matriz protéica do *Cream cheese*. A alteração do pH foi feita pós-processamento, através da exposição das amostras em atmosfera de hidróxido de amônio ou ácido acético para aumentar ou diminuir o pH, respectivamente. Os resultados indicaram que existe uma correlação linear positiva entre o pH e a capacidade de derretimento e uma correlação negativa entre o pH e a firmeza do *Cream cheese*. A proteólise do *Cream cheese* não foi significativamente afetada pelo pH dos queijos. A capacidade de retenção de água não foi afetada pelo pH, sendo, entretanto, afetada pela interação entre o pH e o tempo de armazenamento.

## **6. DERRETIMENTO**

A capacidade de derretimento é influenciada pelos teores de proteína, gordura, umidade, sal e pH do queijo, mas também pelo conteúdo de cálcio, grau de proteólise e, principalmente, hidratação da matriz protéica (Guinee et al., 2000).

O primeiro teste para avaliar a capacidade de derretimento de queijo foi aplicado no Cheddar por Arnott et al. (1957). Os autores utilizaram cilindros de 17 mm de diâmetro e 17 mm de altura, os quais foram colocados, em forno a 100 °C por 15 minutos e a determinação da altura do cilindro foi feita antes e depois do derretimento, com ajuda de um micrômetro. A capacidade de derretimento foi relacionada com o decréscimo da altura do cilindro.

Olson e Price (1958) avaliaram a capacidade de derretimento de queijo processado. Pesaram 15 gramas de queijo diretamente dentro dos tubos de derretimento. Os tubos de derretimento eram de vidro, de forma cilíndrica, com 250 mm de comprimento e 30 mm de diâmetro, com duas linhas de referência gravadas no tubo, nos sentidos longitudinal e transversal. Os tubos eram levados para a estufa na posição horizontal apoiados em suportes, por 8 minutos a 100 °C.

Após este período de aquecimento, a distância total percorrida pela amostra, em milímetros, era denominada de fluxo de queijo e usada como critério de derretimento da amostra.

O método de Schreiber's, descrito por Kosikowski (1982), consiste em aquecer no forno a 232 °C por 5 minutos discos de queijo com 5 mm de espessura e 40 mm de diâmetro. O aumento do diâmetro dos discos do queijo após o aquecimento é utilizado para expressar a capacidade de derretimento do mesmo.

A capacidade de derretimento de diferentes tipos de queijos foi avaliada por Park et al. (1984) através dos métodos de Arnott (Arnott et al., 1957) e Shereiber's (Kosikowski, 1982). Os pesquisadores observaram que o aquecimento afetou diferentemente os diversos queijos, provavelmente, devido às propriedades estruturais de cada um. Os autores concluíram que os testes aplicados não avaliam os mesmos atributos reológicos, pois não apresentaram boa correlação.

Wang e Sung (2001) compararam a capacidade de derretimento de queijos Cheddar e Mussarela comerciais, utilizando metodologia de processamento de imagem e testes de Arnott (Arnott et al., 1957) e Shereiber (Kosikowski, 1982). Os resultados demonstraram que a capacidade de derretimento determinada com o auxílio do recurso computacional foi significativamente inter-relacionada ( $p < 0,0001$ ) com os testes de Arnott ( $R^2 = 0,69$ ) e Shereiber ( $R^2 = 0,88$ ).

Gigante et al. (2001) avaliaram a adição de concentrado protéico de soro e de sais emulsificantes e o efeito do pH da ultrafiltração (5,2 e 5,7) na característica de derretimento do requeijão cremoso. Foi observado pelos autores que a adição de concentrado protéico de soro diminui a capacidade de derretimento do requeijão cremoso, porém, esse efeito foi mais pronunciado no pH de 5,2.

Durante o período de maturação, devido ao enfraquecimento da rede protéica, provocado pela proteólise, principalmente da  $\alpha s_1$ -caseína, a capacidade de derretimento do queijo aumenta significativamente (Kindstedt, 1991; Tunick et al., 1993; Rowney et al., 1999).

Paulson et al. (1998) estudaram a influencia do sal na funcionalidade e no arranjo das proteínas do queijo Mussarela sem gordura. Os autores observaram

melhor derretimento nos queijos salgados nos quais os agregados de proteínas são menores e a matriz protéica é mais hidratada.

McMahon et al. (1999) estudaram o comportamento da fase aquosa na Mussarela durante o armazenamento e mudanças na funcionalidade. Fabricaram queijos com diferentes teores de gordura. O queijo controle apresentou maior derretimento que o queijo com teor reduzido de gordura; entretanto, esta diferença diminuiu com o tempo de armazenamento. O aumento do derretimento do queijo durante os primeiros 21 dias pode ser explicado pelas mudanças na fase aquosa, a qual, é absorvida pela matriz aumentando a hidratação das proteínas, promovendo um fácil derretimento do queijo quando aquecido.

Guinee et al. (2000) avaliaram a capacidade de derretimento de queijos comerciais (Cheddar, Mussarela e análogo de Mussarela). Os autores detectaram que o queijo Cheddar apresentou maior capacidade de derretimento que os outros, provavelmente devido ao seu maior grau de proteólise e possivelmente, pelo aumento da capacidade de retenção de água.

Os efeitos do teor de gordura (1 e 3,5%), a homogeneização (leite não homogeneizado e homogeneizado a 10,3 ou 17,2 kPa) e o aquecimento da mistura massa/soro durante a dessoragem (32,4 e 45,9 °C) sobre a capacidade de derretimento do queijo Mussarela foram estudados por Tunick et al. (1993). A capacidade de derretimento diminuiu com o aumento da pressão de homogeneização, provavelmente pela incorporação da caseína na membrana do glóbulo de gordura, aumentando o número de ligações cruzadas, ao mesmo tempo prevenido que a gordura derretida fluísse para fora da matriz. A massa aquecida a 32 °C, proveniente do leite com teor de gordura de 1% e homogeneizada 10 kPa, resultou num queijo com propriedades semelhantes às dos queijos com altos teores de gordura. Os autores verificaram que o derretimento aumentou com a elevação do teor de gordura, tempo de estocagem e proteólise.

A capacidade de derretimento do queijo Mussarela com baixos teores de gordura (variando de 2 a 5%) e parcialmente desengordurado (19%) foi estudada por Fife et al. (1996). A capacidade de derretimento foi menor para os queijos com

menor teor de gordura em relação ao parcialmente desengordurado, porém essa diferença não foi significativa a partir do 28<sup>º</sup> dia de armazenamento. O derretimento aumentou durante o tempo de estocagem para todos os produtos. Os pesquisadores concluíram que, embora tenha ocorrido proteólise e que esta possivelmente tenha contribuído para aumentar o derretimento dos queijos, a hidrólise da caseína não foi o principal fator de aumento do derretimento durante a estocagem dos queijos. Os pesquisadores sugeriram que o aumento da retenção de água em queijos com baixo teor de gordura pode ter levado à melhoria de suas características de derretimento.

Rudan e Barbano (1998) avaliaram o derretimento de queijos Mussarela com teores variados de gordura. Observaram que durante o aquecimento do queijo com maior teor de gordura esta torna-se líquida com expansão relativa maior do que a da matriz protéica. Assim, parte da gordura se move para a superfície do queijo, fazendo com que este não resseque por evaporação da água, pois forma-se uma camada de gordura líquida na superfície do queijo. Nos outros queijos não há gordura para proteger a evaporação da água, ocorrendo a desidratação da superfície com formação de película escura, antes que o queijo atinja a temperatura que lhe permita fluir, limitando seu derretimento.

Spadoti et al. (2003) avaliaram o derretimento de queijo Prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação, através da aplicação da ultrafiltração. Estatisticamente não houve diferença entre os tratamentos com relação à capacidade de derretimento, porém, houve uma tendência de maior capacidade de derretimento para os queijos com maior relação da quantidade de água/proteína total e maior valor de pH.

## **7. Referências Bibliográficas**

ARNOTT, D.R.; MORRIS, H. A.; COMBS, W. B. Effect of certain chemical factors on the melting quality of process cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 40, n.8, p. 957-963, 1957.

BALDINI, V. L. S. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação**. 1998. 208p. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BOUTROU, R.; GAUCHERON, F.; PIOT, M.; MICHEL, F.; MAUBOIS, J.L.; LÉONIL, J. Changes in the composition of juice expressed from Camembert cheese during ripening. **Lait**, v. 79,n.5, p.503-513, 1999.

BRASIL. **Ministério do Estado da Agricultura e do Abastecimento**. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Prato. Portaria nº 358, de 4 de setembro de 1997. In: Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais diet, light e enriquecido. São Paulo: Fonte Comunicações. 1998, p.87-89.

DORNELLAS, J.R.F. **Contribuição ao estudo do queijo Prato a partir de retentados obtidos por ultrafiltração de leite com ou sem pré-fermentação**. 2003. 201p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FARKYE, N. Contribution of milk – clotting enzymes and plasmin to cheese ripening. In: MALIN, E. M. e TUNICK, M. H. **Chemistry of Structure – Function Relationships in Cheese**. New York: Plenum Press. 1995. p. 195-207.

FARKEY,N. Y.; FOX, P. F. Observations on plasmin activity in cheese. **Journal of Dairy Research**, v.57, n. 3, p. 413-418, 1990.

FEENEY, E. P.; GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.7, p. 1646-1654, 2002.

FIFE, R. L.; McMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Functionality of low fat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n.11, p. 1903-1910, 1996.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F.; LAW, J.; McSWEENEY, P. L. H.; WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P.F., ed. **Cheese**: Chemistry, physics and microbiology. General aspects. London: Elsevier Applied Science, 1993, v.1, p. 389-438.

FOX, P. F.; LUCEY, J. A.; COGAN, T. M. Glycolysis and related reactions during manufacture and ripening. **Critical Reviews in Food in Science and Nutrition**, v.29, n.4,p.237-253, 1990.

FURTADO, M.M.; AMORIM, A.C.B. Os pioneiros laticinistas dinamarqueses e a história do queijo Prato – Parte 1. **Indústria de laticínios, São Paulo**, v.4, n.25, p.18-22, 2000.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. **Tecnologia de queijos**: Manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.

FURTADO, M.M.; SOUZA, H.M.; MUNCK, A.V. Controle de salga e umidade do queijo Prato pelo banho de água gelada. **Revista do Instituto de Laticínios de Cândido Tostes**, v. 34, n.204, p. 9-14, 1979.

GIGANTE, M. L.; ANTUNES, A. J.; PETENATE, A. J.; ROIG, S. M. Firmeness and melting properties of Requeijao Cheese. **Milchwissenschaft**, v. 56, n. 10, p. 560-562, 2001.

GOROSTIZA, A.; CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, A. T.; VALDUGA, E.; BERNARDO, A.; FRESNO, J. M. Changes in soluble nitrogenous compound,

caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. **Food Chemistry**, v. 85, n.3 p. 407-414, 2004.

GUINEE, T. P.; FEENEY, E. P.; AUTY, M. A. E. ; FOX, P. F. Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.7, p. p.1655-1669, 2002.

GUINEE, T. P.; HARRINGTON, D.; CORCORAN, M. O.; MULHOLLAND, E. O.; MULLINS, C. The compositional and functional properties of commercial Mozzarella, Cheddar and analogue pizza cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 2, p.51-56, 2000.

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

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

HOLMES, D. G.; DUERSCH, J. W.; ERNSTROM, C. A. Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during Cheddar cheese making. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n.6, p. 862-869, 1977.

IBRAHIM, G. F.; RADFORD, D. R.; BALDOCK, A. K.; IRELAND, L. B. Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin A production in Cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, v. 44, n.3, p. 189-193, 1981.

KIELY, L. J. KINDSTEDT, P. S.; HENDRICKS, G. M.; LEVIS, J. E.; YUN, J. J.; BARBANO, D. M. Effect of draw pH on the development of curd structure during the manufacture of Mozzarella cheese. **Food Structure**, v.11, n.3, p. 217-224, 1993.

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

KINDSTEDT, P. S. Effect of manufacturing factors, composition, and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 33, n.2, p. 167-187, 1993.

KINDSTEDT, P. S.; ZIELINSKI, A.; ALMENA-ALISTE, M.; GE, C. A post-manufacture method to evaluate the effect of pH on Mozzarella cheese characteristics. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 3, p.14-19, 2001.

KOSIKOWSKI, F. V. **Cheese and fermented milk foods**, 3<sup>rd</sup> ed. Ann Arbor MI: Edwards Bros., 1982. 620p.

LARSSON, K. I.; ANDRÉN, A.; GEURTS, T. J.; ROOS, A. L.; WALSTRA, P. Association of chymosin with artificial casein micelles as influenced by micelle composition and pH. **International Dairy Journal**, v.7,n.1, p, 43-46, 1997.

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

LUCEY, J. A.; FOX, P. F. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n.6, p. 1714-1724, 1993.

MARCHESSEAU, S.; GASTALDI, E.; LAGAUDE, A.; CUQ, J. L. Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1483-1489, 1997.

McMAHON, D. J.; FIFE, R. L.; OBERG, C. J. Water partitioning in Mozzarella cheese and its relationship to cheese meltability. **Journal Dairy Science**, v. 82, n.7, p. 1361-1369, 1999.

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

MONTEIRO, R. R. **Efeito do pH sobre as características físico químicas do Cream cheese**. 2004.126p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

NOOMEN, A. The role of the surface flora in the softening of cheeses with a low initial pH. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, v. 37, n.4, p. 229-232, 1983.

OLIVEIRA, J.S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Ícone, 1986. 146p.

OLSON, N. F.; PRICE, W. V. A melting-test for pasteurized process cheese spreads. **Journal of Dairy Science**, v. 41, n. 7, p. 999-1000, 1958.

PARK, J.; ROSENAU, R.; PELEG, M. Comparison of four procedures of cheese meltability evaluation. **Journal of Food Science**, v. 49, n.4, p. 1158-1162, 1984.

PASTORINO, A. J.; HANSEN, C. L.; McMAHON, D.J. Effect of pH on the chemical composition and structure-functional relationships of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v.86, n. 9, p.2751-2760, 2003.

PATEL, M. C.; LUND, D. B.; OLSON, N. F. Factors affecting syneresis of renneted milk gels. **Journal of Dairy Science**. v. 55, n.7, p. 913-918, 1972.

PAULSON, B. M.; McMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Influence of sodium chloride on appearance, functionality, and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. **Journal Dairy Science**, v. 81, n.8, p. 2053-2064, 1998.

RAMKUMAR, C.; CREAMER, L. K.; JOHSTON, K. A.; BENNETT, R. J. Effect of pH and time on the quantity of readily available water within fresh cheese curd. **Journal of Dairy Research**, v. 64, n.1, p. 123-134, 1997.

REITER, B.; FEWINS, B. G.; FRYER, T. F.; SHARPE, M.E. Factors affecting multiplication + survival of coagulase positive staphylococci in Cheddar cheese. **Journal Dairy Research**, v. 31, n.3, p. 261, 1964.

ROWNEY, M.; ROUPAS, P.; HICKEY, M. N.; EVERETT, D. W. Factors affecting the functionality of mozzarella cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 2, p.94-102, 1999.

RUDAN, M. A.; BARBANO, D. M. A model of Mozzarella cheese melting and browning during pizza baking. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 8, p. 2312-2319, 1998.

SCHIFTAN, T.Z.; KOMATSU, I. Estudos sobre a composição de queijo Prato consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios de Cândido Tostes**, v. 35, n.207, p. 36-38, 1980.

SCHULZ, J.G. **Efeito da utilização de *slurry* sobre a maturação de queijo Prato**. 2003. 102p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SHEEHAN, J. J.; GUINEE, T. P. Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional properties of reduced-fat Mozzarella cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, n.2, p. 161-172, 2004.

SILVA, A. T. **Maturação do queijo tipo Prato: influência da adição de enzimas proteolíticas no processo.** 1998. 119p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SPADOTI, L. M.; DORNELAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the melting of Prato cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Le Lait**, v. 83, n.5, p. 397 – 408, 2003.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the microstructure of Prato type cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Milchwissenschaft**, v. 59, n. 3/4, p. 151-155, 2004.

SPADOTI, L.M. **Avaliação de propriedades de queijo tipo Prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação.** 2003. 229p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

TATINI, S. R.; JEZESKI, J. J.; MORRIS, H. A.; OLSON, J. R.; CASMAN, E. P. Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. **Journal of Dairy Science**, v.54, n.6 , p. 815-825, 1971.

TUNICK, M. H.; MALIN, E. L.; SMITH, P. W.; SHIEH, J. J. Proteolysis and rheology of low fat and full fat Mozzarella cheeses prepared from homogenized milk. **Journal of Dairy Science**. v. 76, n.12, p. 3621-3628, 1993.

VASSAL, L.; MONNET, V.; LE BARS, D.; ROUX, C.; GRIPON, I. J. Relation entre le pH, la composition chimique et la texture des fromages de type camembert. **Lait**, v.66, n.4, p. 341-351, 1986.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A. ; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy Technology: principles of milk properties and processes**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999, 726 p.

WANG, H. H.; SUN, D. W. Evaluation of the functional properties of Cheddar cheese using a computer vision method. **Journal of Food Engineering**, v. 49, n.1, p. 49-53, 2001.

WATKINSON, P.; COKER, C.; CRAWFORD, R.; CRAIG, D.; JOHNSTON, K.; MCKENNA, A.; WHITE, N. Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. **International Dairy Journal**, v.11, n.4-7, p. 455-469, 2001.

YAZICI, F.; DERVISOGLU, M. Effect of pH adjustment on some chemical, biochemical, and sensory properties of Civil cheese during storage. **Journal of Food Engineering**, v.56, n.4, p. 361-369, 2003.

YUN, J. J.; BARBANO, D. M.; KINDSTEDT, P. S. Mozzarella cheese: impact of milling pH on chemical composition and proteolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3629-3638, 1993a.

YUN, J. J.; KIELY, L.J.; KINDSTEDT, P.S. Mozzarella cheese: impact of milling pH on functional properties. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p.3639-3647, 1993b.

ZOTOLLA, E. A.; SMITH, L. Growth and Survival of Undesirable Bacteria in Cheese. In: FOX, P. F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, 2<sup>a</sup> Edição, Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 1999. v. 1, cap. 12., p. 471-492.

## **CAPÍTULO II**

### **ESTUDO DA FASE AQUOSA DO QUEIJO PRATO**

## ESTUDO DA FASE AQUOSA DO QUEIJO PRATO

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o equilíbrio físico-químico entre a matriz protéica e a fase aquosa do queijo Prato no estágio inicial da maturação. Os queijos foram fabricados pelo processo tradicional e caracterizados quanto à composição centesimal. Para avaliar o efeito do tempo de maturação sobre a fase aquosa do queijo, amostras foram aleatoriamente escolhidas diariamente, até o 5º dia de maturação, e avaliadas quanto à quantidade de fase aquosa liberada por centrifugação. A fase aquosa foi avaliada quanto aos teores de sólidos totais, nitrogênio total, frações nitrogenadas e perfil eletroforético. Utilizou-se um delineamento experimental completamente casualizado com um fator principal e um fator de blocagem. Foram realizados 3 experimentos completos e os dados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e teste de correlação de Pearson. Os queijos obtidos apresentaram composição característica e a quantidade de fase aquosa liberada por centrifugação diminuiu significativamente durante os primeiros 5 dias de maturação, evidenciando um rápido aumento da capacidade de retenção de água da matriz protéica. Além disso, observou-se uma associação negativa significativa entre a quantidade de fase aquosa e os teores de sólidos totais, de proteína total e proteína solúvel em pH 4,6. Através do perfil eletroforético evidenciou-se o aumento de frações caseicas ( $\alpha_{s1}$ -I-caseína e  $\gamma$ -caseína) e de proteínas intactas ( $\beta$ -caseína e  $\alpha_{s1}$ -caseína) na fase aquosa do queijo com 5 dias de maturação. Os resultados sugerem que a alteração do equilíbrio físico-químico entre a matriz protéica e a fase aquosa do queijo, observada nos primeiros dias de maturação, possa contribuir para a melhoria das características funcionais do queijo Prato, uma vez que afetam a hidratação da matriz protéica.

**Palavras-chave:** queijo Prato, fase aquosa, proteólise.

## ABSTRACT

The objective of this study was to study the physical-chemical balance between the protein matrix and the aqueous phase of *Prato* cheese in the early stages of the ripening process. The cheeses were manufactured by the traditional method and characterized as to percentage composition. To evaluate the effect of ripening time on the aqueous phase of the cheese, samples were randomly taken every day up to the fifth day of ageing and evaluated for the amount of aqueous phase separated by centrifugation. The aqueous phase was evaluated for the levels of total solids, total nitrogen, nitrogen fractions and electrophoretic profile. The experiment design was a completely randomized design with one primary factor and one blocking factor. A total of 3 complete experiments were performed and the results analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Pearson's correlation test. The cheeses manufactured for the purpose of this study exhibited typical *Prato* cheese composition values and the amount of water in the aqueous phase separated by centrifugation decreased significantly over the first 5 days of the ripening process, thereby evidencing a rapid increase of the water binding capacity of the protein matrix. In addition, a significant negative association was found between the amount of water in the aqueous phase and the levels of total solids, total protein and protein soluble at pH 4,6. The electrophoretic profile showed an increase in the levels of casein fractions ( $\alpha_{s1}$ -I-casein and  $\gamma$ -casein) and intact proteins ( $\beta$ -casein and  $\alpha_{s1}$ -casein) in the aqueous phase of the cheese after 5 days ripening. The results suggest that the changes in the chemical-physical balance between the protein matrix and the aqueous phase that occur during the first days of ripening may contribute to improving the functionality of *Prato* cheese as a result of the effect of the aqueous phase on the degree of hydration of the protein matrix.

**Key words:** *Prato* cheese, aqueous phase, proteolysis.

## 1. INTRODUÇÃO

No mercado brasileiro encontra-se, entre outros, uma ampla variedade de queijos holandeses, italianos e suíços. Isto indica que nossa indústria é fortemente influenciada pela indústria européia. Ao longo do tempo, as diferentes variedades sofreram modificações no processamento e maturação, dando origem a outros tipos de queijos, sendo que o queijo Prato está incluído entre estes (Cichoschi et al., 2002).

O queijo Prato é obtido por coagulação enzimática, de massa lavada e semicozida. Sua composição média é 42 – 44% de umidade, 26 – 29% de gordura, 1,6 – 1,9% de sal e pH variando entre 5,2 e 5,4 (Furtado & Lourenço Neto, 1994).

Embora a composição básica e a estrutura do queijo sejam determinadas pela coalhada durante a fabricação, é durante a maturação, caracterizada pela glicólise, proteólise e lipólise, que a individualidade e as características únicas de cada variedade são desenvolvidas (Lawrence et al., 1984; Fox et al., 1993).

A proteólise da matriz caseica e seu papel no desenvolvimento das propriedades funcionais, tais como textura capacidade de derretimento e fatiamento dos queijos são amplamente descritas na literatura (Fox, 1989; Lawrence et al., 1987; Fox et al., 1993). Entretanto, estudos têm sugerido que as mudanças nas propriedades funcionais dos queijos podem estar também relacionadas com a mudança de equilíbrio entre a matriz protéica e a fase aquosa nos estágios iniciais de maturação (Kindstedt, 1993).

O primeiro estudo da interação entre a matriz protéica e a fase aquosa do queijo mussarela demonstrou que 30% do conteúdo total de umidade do queijo pode ser retirada por centrifugação no primeiro dia de fabricação; porém, este conteúdo decresceu para zero após 2 semanas de armazenamento, indicando que o aumento da capacidade de retenção de água da matriz protéica pode influenciar a funcionalidade do queijo no estágio inicial da maturação, apesar da reduzida proteólise observada (Guo & Kindstedt, 1995).

Outros estudos com queijo Mussarela (Guo et al., 1997, Ramkumar et al.,

1997; Kindstedt & Guo, 1998; Paulson et al., 1998; McMahon et al., 1999; Chaves et al., 1999; Guinee et al. 2002), Cheddar (Dixon et al., 1995; Guinee et al., 2000), Camembert (Boutrou et al., 1999) e Emmental (Thierry et al., 1998) têm corroborado com a hipótese de que a proteólise pode não ser o único fator que influencia as mudanças funcionais durante a maturação dos queijos. Atributos como textura, propriedades de fatiamento e de derretimento podem ser parcialmente governados pelo equilíbrio físico-químico entre a matriz protéica e a fase aquosa dos queijos.

O objetivo deste trabalho foi estudar o equilíbrio físico-químico entre a matriz protéica e a fase aquosa do queijo Prato no estágio inicial da maturação, buscando um melhor entendimento sobre suas propriedades funcionais.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Fabricação do queijo Prato**

O queijo Prato foi fabricado de acordo com o processo tradicional (Oliveira, 1986) utilizando-se leite tratado termicamente (68 °C/2 minutos), resfriado a 32 °C, adicionado de cultura láctica tipo “O” (Wisby-Visbyvac® LC-MIX F0 2 01, composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, Danisco Brasil Ltda), cloreto de cálcio 50% (0,5 mL/kg de leite), corante urucum (0,08 mL/kg de leite) e coalho (Cuajo Marschall – Yellow Label) em quantidade suficiente para coagular em 35 minutos. Após a coagulação o gel foi cortado e a mistura soro/coágulo foi agitada por 20 minutos antes da primeira dessoragem, que consistiu em retirar 30% do soro, em relação ao volume inicial de leite. Para lavagem e cozimento da massa adicionou-se lentamente 15% de água (80 °C). A temperatura da mistura soro/coágulo foi aumentada em 1 °C a cada 3 minutos até que se atingisse 40 °C. Após se atingir o ponto de massa, procedeu-se a segunda dessoragem, a enformagem, e a prensagem progressiva dos queijos por aproximadamente 5 horas. Os queijos foram salgados por 3 horas em salmoura

com 20% de sal a temperatura entre 18 a 20 °C, foram secos por 10 horas ( $4 \pm 1$ ) °C, embalados a vácuo e armazenados a 12 °C.

## **2.2. Composição do leite e do queijo**

Todas as análises foram realizadas em triplicata. O leite utilizado em cada processamento foi avaliado quanto ao pH, sólidos totais, acidez, cinzas e nitrogênio total pelo método micro-Kjeldahl conforme metodologias descritas pela AOAC (1997). O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber (British Standard Institution, 1989).

No dia seguinte à fabricação, os queijos foram avaliados quanto ao pH, sólidos totais, acidez, cinzas e nitrogênio total conforme metodologias descritas pela AOAC (1997). O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber (British Standard Institution, 1989) e o teor de sal foi determinado pelo método de Volhard (Richardson, 1985).

## **2.3. Obtenção e caracterização da fase aquosa do queijo Prato**

O queijo utilizado para determinação da quantidade de fase aquosa liberada foi inicialmente avaliado quanto ao pH, sólidos totais conforme AOAC (1997) e perfil eletroforético (Andrews, 1983; Blakesley & Boezi, 1977).

A extração da fase aquosa foi conduzida até que a quantidade do soro tendesse a zero, o que implicou em amostras sendo aleatoriamente escolhidas e avaliadas nos primeiros 5 dias de maturação.

A fase aquosa do queijo Prato foi obtida conforme metodologia descrita por Guo e Kindstedt (1995). Porções de 160 g de amostra de queijo ralado foram centrifugadas (Centrífuga Beckman, modelo J2-21, utilizando-se o rotor J-14) a  $12.500 \times g$  por 75 minutos, a 25 °C. A fase aquosa separada foi retirada do tubo de centrifugação com o auxílio de seringa e agulha e transferida para um recipiente com tampa e foi pesada. A quantidade de fase aquosa foi expressa como porcentagem da umidade do queijo.

A fase aquosa foi avaliada quanto aos teores de sólidos totais, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e em TCA 12% conforme metodologias descritas pela AOAC (1997) e perfil eletroforético. O teor de proteína foi obtido multiplicando-se o teor de nitrogênio por 6,38. A eletroforese em gel poliacrilamida (UREIA-PAGE), foi executada com géis de separação de 9% e de concentração de 4%, em uma unidade vertical Mini Protean III xi (Bio-Rad), de acordo com o método modificado de Andrews (1983). A coloração dos géis foi feita por imersão em Brilliant Blue Coloidal G, seguindo metodologia descrita por Blakesley & Boezi (1977).

#### **2.4. Delineamento experimental e análise estatística dos dados**

O delineamento adotado foi completamente casualizado com um fator principal (tempo) e um fator de blocagem (processo). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar o efeito do tempo de maturação sobre o volume, o extrato seco total, os teores de nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH4,6) e em TCA 12% (NS TCA 12%) da fase aquosa. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a associação do volume de fase aquosa, com os teores de sólidos totais, proteína total e proteína solúvel em pH 4,6 da fase aquosa (Sincich, 1996). Adotou-se 5% de significância para todos os testes realizados.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Composição físico-química do leite e dos queijos**

A composição média dos leites utilizados nos três processamentos foi de  $12,2 \pm 0,2\%$  de sólidos totais,  $3,7 \pm 0,1\%$  de gordura,  $3,3 \pm 0,2\%$  de proteína e  $0,66 \pm 0,06\%$  de cinzas. O pH e a acidez foram respectivamente  $6,80 \pm 0,04$  e  $17,95 \pm 0,08^\circ\text{D}$ . Os queijos obtidos apresentaram composição característica de

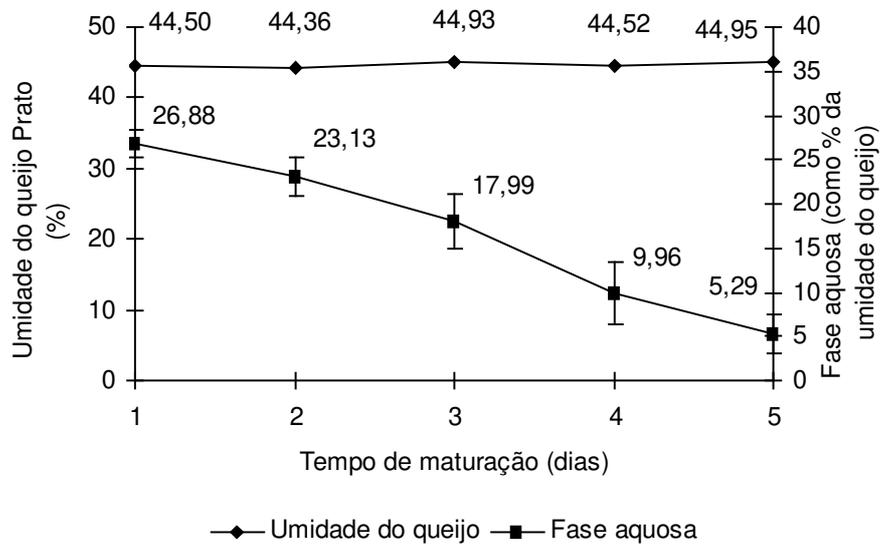
queijo Prato (Tabela 1) e semelhante à obtida por Spadoti et al. (2004) e Chicoski et al. (2002).

**Tabela 1.** Composição média (n=3) do queijo Prato.

<b>Determinações</b>	<b>Valor mais provável</b>
pH	5,05 ± 0,02
Umidade (%)	44,5 ± 0,3
Gordura (%)	29,0 ± 0,6
Proteína total (%)	22,5 ± 0,9
Cinzas (%)	3,15 ± 0,08
Sal (%)	1,10 ± 0,02
Sal na Umidade (%)	2,6 ± 0,3

### **3.2. Fase aquosa do queijo Prato**

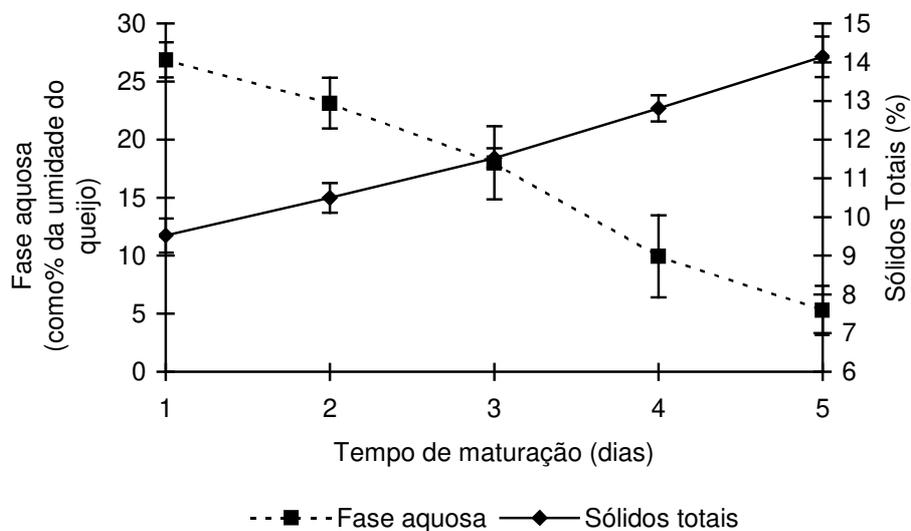
O tempo de maturação afetou significativamente a umidade ( $p = 0,014$ ) e a quantidade de fase aquosa ( $p < 0,001$ ) liberada do queijo Prato por centrifugação. Embora estatisticamente significativa, do ponto de vista prático, a umidade do queijo manteve-se praticamente constante (Figura 1) e em torno de 44%, valor característico de queijo Prato. A quantidade de fase aquosa do queijo Prato diminuiu durante o período de maturação e variou de aproximadamente 27 para 5% da umidade do queijo nos primeiros 5 dias, o que representou uma redução de 81% na quantidade de fase aquosa liberada do queijo. A redução da quantidade de fase aquosa liberada do queijo por centrifugação foi também observada para os queijos Mussarela (Guo et al., 1997; Ramkumar et al., 1997; Kindstedt & Guo, 1998; Paulson et al., 1998; McMahon et al., 1999; Chaves et al., 1999; Guinee et al., 2002), Cheddar (Dixon et al., 1995; Guinee et al., 2000), Camembert (Boutrou et al., 1999) e Emmental (Thierry et al., 1998).



**Figura 1.** Umidade média e quantidade de fase aquosa do queijo (n=3) durante a maturação.

O tempo de maturação afetou significativamente os teores de sólidos totais ( $p < 0,001$ ), nitrogênio total ( $p < 0,001$ ) e nitrogênio solúvel em pH 4,6 ( $p = 0,013$ ) da fase aquosa. O nitrogênio solúvel em TCA 12% não foi significativamente afetado ( $p = 0,122$ ) pelo tempo de maturação durante o período em que foi possível extrair a fase aquosa do queijo (5 dias de maturação).

O aumento da concentração de sólidos (Figura 2) não foi decorrente exclusivamente da redução da quantidade de fase aquosa, pois observou-se o aumento do fração nitrogenada da fase aquosa (Tabela 2). Através da correlação de Pearson (Tabela 3) verificou-se que existe associação negativa significativa entre a quantidade de fase aquosa e os teores de sólidos totais, de proteína total e proteína solúvel em pH 4,6.



**Figura 2.** Mudança na quantidade média de fase aquosa e sólidos totais da fase aquosa durante o armazenamento.

**Tabela 2.** Fração nitrogenada da fase aquosa (n=3) obtida por centrifugação.

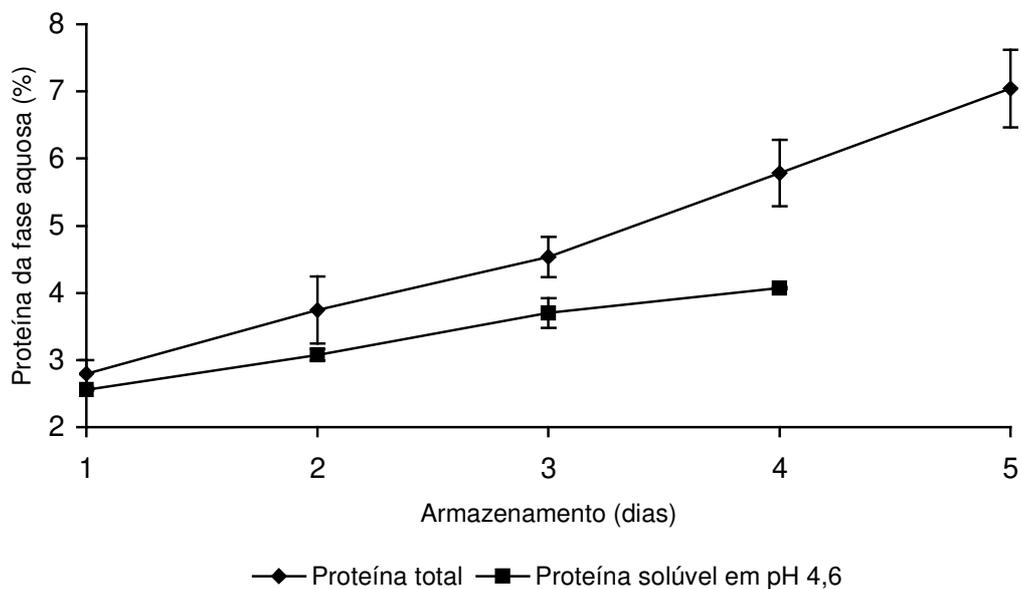
Tempo de maturação	Nitrogenio Total (% em base seca)	NS pH 4,6 (% em base seca)	NS TCA 12% (% em base seca)
1	4,62	4,21	1,40
2	5,62	4,60	1,60
3	6,68	5,03	1,71
4	6,95	4,98	1,75
5	7,27	nd	nd

nd = não determinado por falta de amostra suficiente

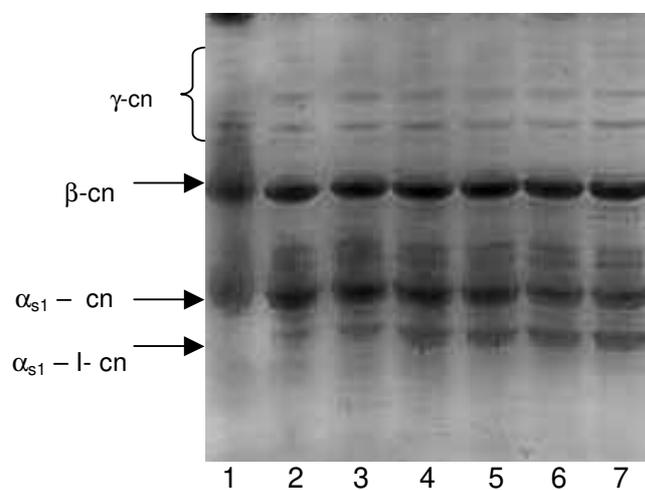
**Tabela 3.** Correlação de Pearson entre quantidade de fase aquosa e os teores de sólidos totais, proteína total e proteína solúvel em pH 4,6.

		Sólidos Totais	Proteína total	Proteína solúvel em pH 4,6
Quantidade de fase aquosa	Coeficiente de correlação	- 0,888	- 0,935	- 0,792
	Valores de p	< 0,001	< 0,001	< 0,006

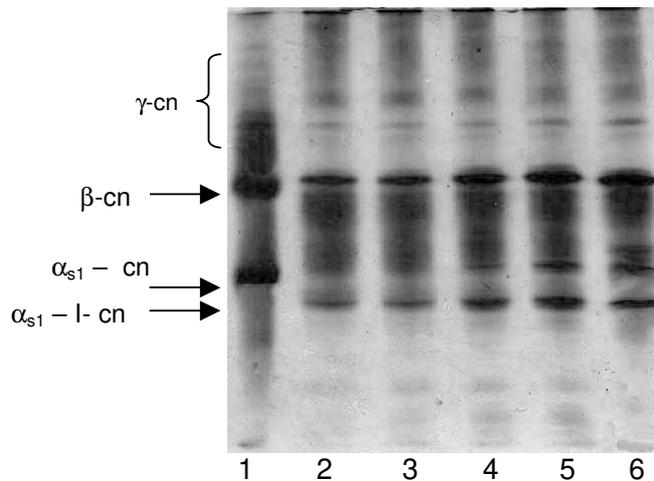
O aumento do teor de proteína total e proteína solúvel em pH 4,6 na fase aquosa é apresentado na Figura 3. A concentração de proteína total aumentou aproximadamente 60% em apenas cinco dias de maturação, enquanto a concentração de proteína solúvel em pH 4,6 aumentou 37% nos primeiros 4 dias de maturação. Através do perfil eletroforético (Figura 5) pôde-se evidenciar o aumento de frações caseicas ( $\alpha_{s1}$ -I-caseína e  $\gamma$ -caseína) e de proteínas intactas ( $\beta$ -caseína e  $\alpha_{s1}$ -caseína) na fase aquosa do queijo com cinco dias de maturação. Concomitantemente, no queijo, observou-se a hidrólise da fração  $\alpha_{s1}$ -caseína, mais evidenciada a partir do terceiro dia de maturação (Figura 4).



**Figura 3.** Conteúdo médio (n=3) de proteína total e proteína solúvel em pH 4,6 da fase aquosa liberada por durante a maturação do queijo prato.



**Figura 4.** Perfil eletroforético do queijo obtido durante o armazenamento. Banda 1 padrão de caseinato. Bandas 2, 3, 4, 5, 6 e 7, obtidas durante o armazenamento do queijo nos dias 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente.



**Figura 5.** Perfil eletroforético da fase aquosa obtida durante o armazenamento. Banda 1 padrão de caseinato. Bandas 2, 3, 4, 5 e 6, obtidas durante o armazenamento do queijo nos dias 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

### 3.3. Discussão

A quantidade de fase aquosa do queijo Prato diminui drasticamente nos primeiros 5 dias de maturação (Figura 1), evidenciando o aumento da capacidade de retenção de água da matriz protéica durante este período. Outros autores também observaram redução da quantidade de fase aquosa liberada do queijo durante a maturação para os queijos Mussarela (Guo et al., 1997; Ramkumar et al., 1997; Kindstedt & Guo, 1998; Paulson et al., 1998; McMahon et al., 1999; Chaves et al., 1999; Guinee et al., 2002), Cheddar (Dixon et al., 1995; Guinee et al., 2000), Camembert (Boutrou et al., 1999) e Emmental (Thierry et al., 1998).

No queijo Prato a fase aquosa reduziu de 26 para 5% nos primeiros 5 dias de maturação (Figura 1). No queijo Mussarela, de 32 para 4% após 16 dias de armazenamento (Guo e Kindstedt, 1995). Paralelamente, no queijo Prato observou-se nitidamente a hidrólise da matriz protéica do queijo durante os 5 dias (Figura 4), enquanto praticamente não se observou proteólise no queijo Mussarela durante os 16 dias (Guo e Kindstedt, 1995). É possível é que a diferença observada quanto a capacidade de retenção de água da matriz protéica destes

dois queijos possa estar relacionada com a microestrutura e o grau de proteólise dos queijos.

No que diz respeito a microestrutura, o queijo Prato é constituído de uma malha protéica densa, similar a uma esponja, apresentando espaços vazios de diferentes diâmetros, que eram ocupados por soro e gotículas de gordura, distribuídos uniformemente pela matriz protéica (Spadoti et al., 2004). O queijo Mussarela, em consequência da filagem, apresenta uma estrutura com fibras de proteínas paralelas e orientadas (Oberg et al., 1993). Ao longo das fibras formam-se bolsões que são supostamente ocupados por soro e gotas de gordura (Kindstedt e Guo, 1997). Possivelmente, a distribuição mais uniforme da fase aquosa na estrutura do queijo Prato favoreceu a mais rápida hidratação da matriz protéica quando comparada com o queijo Mussarela, resultando na maior capacidade de retenção de água num menor tempo, como foi observado para o queijo Prato.

Em relação ao grau de proteólise dos queijos, os resultados obtidos neste trabalho indicaram que o aumento da capacidade de retenção de água foi acompanhado do aumento do conteúdo de proteína e de frações protéicas na fase aquosa (Figuras 4 e 5), devido a degradação da matriz de para-caseína. Desta forma, possivelmente, a maior capacidade de retenção de água do queijo Prato, quando comparado ao queijo Mussarela, seja decorrente da mais intensa proteólise observada queijo Prato, uma vez que a clivagem de ligações peptídicas gera novos grupos iônicos aumentando a capacidade de retenção de água do sistema como um todo (Lawrence et al., 1987).

#### **4. Conclusão**

É bem conhecido que a proteólise tem um papel importante na modificação da funcionalidade dos queijos e para o queijo Prato diversos autores (Spadoti, 2003; Spadoti et al., 2003; Schulz, 2003; Baldini, 1998) demonstraram que a evolução da proteólise foi acompanhada da diminuição de firmeza e do aumento da capacidade de derretimento do queijo. Entretanto, os resultados deste trabalho

sugerem que, além a proteólise, o comportamento da fase aquosa do queijo no período inicial da maturação pode ser também responsável pela modificação da funcionalidade do queijo uma vez que afeta a hidratação da matriz protéica.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, A. T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **Journal of Dairy Research**, London, v. 50, n.1, p. 45-55, 1983.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16. Ed. 3, revision. Maryland: AOAC International, v1-2, 1997.

BALDINI, V. L. S. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação**. 1998. 208p. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BLAKESLEY, R.W.; BOEZI, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, v. 82, n.2, p. 580-582, 1977.

BOUTROU, R.; GAUCHERON, F.; PIOT, M.; MICHEL, F.; MAUBOIS, J.L.; LÉONIL, J. Changes in the composition of juice expressed from Camembert cheese during ripening. **Lait**, v. 79, n.5, p.503-513, 1999.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). **Methods**. London: British Standards Institution, 1989. 12p.

CHAVES, C.; VIOTTO, W. H.; GROSSO, C. R. F. Proteolysis and functional properties of mozzarella cheese affected by refrigerated storage. **Journal of Food Science**, v. 64, n.2, p. 202-205,1999.

CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, E.; VALDUGA, A. T.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M. Characterization of Prato cheese, a brasilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, v. 13, n.4/5, p. 329-336, 2002.

DIXON, P.; GUO, M. R.; KINDSTEDT, P. S. Age-related changes in the water phase of Cheddar cheese made from late lactation milk. **Journal of Dairy Science**, v. 78, suppl.1, p.121, 1995.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F.; LAW, J.; McSWEENEY, P. L.; WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P. F., ed. **Cheese: chemistry physics and microbiology**. General aspects. London: Elsevier Applied Science, 1993, v. 1, p. 389-438.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. **Tecnologia de queijos**: Manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.

GUINEE, T. P.; AUTY, M. A. E.; FENELON, M. A. The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v.10 ,n.4, p.277-288, 2000.

GUINEE, T. P.; FEENEY, E. P.; AUTY, M. A. E.; FOX, P. F. Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p.1655-1669, 2002.

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

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

KINDSTEDT, P. S. Effect of manufacturing factors, composition, and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 33, n.2, p. 167-187, 1993.

KINDSTEDT, P.S; GUO, M. R. A physico-chemical approach to the structure and function of Mozzarella cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, n.2, p. 70-73, 1998.

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

LAWRENCE, R. C.; HEAP, H. A.; GILLES, J. A controlled approach to cheese technology. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n.8, p. 1632-1645, 1984.

LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Symposium: Cheese Ripening Technology – Texture development during cheese ripening. **Journal of dairy Science**, v. 70, n.8, p. 1748-1760, 1987.

McMAHON, D. J.; FIFE, R. L.; OBERG, C. J. Water partitioning in Mozzarella cheese and its relationship to cheese meltability. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 7, p.1361-1369, 1999.

OBERG, C. J.; McMANUS, W. R.; McMAHON, D.J. Microstructure of Mozzarella cheese during manufacture. **Food Structure**, v. 12, n.2, p. 251-258, 1993.

OLIVEIRA, J.S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Ícone, 1986. 146p.

PAULSON, B.M.; MCMANUS, D. J.; OBERG, C. J. Influence of sodium chloride on appearance, functionality, and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 8, p.2053-2064, 1998.

RAMKUMAR, C; CREAMER, L. K.; JOHNSTON, K.; BENNETT, R. J. Effect of pH and time on the quantity of readily available water within fresh cheese curd. **Journal of Dairy Research**, v.64, n.1, p.123-134, 1997.

RICHARDSON, G. H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products**. Washington: American Publ. Health Assoc, 1985. 412p.

SCHULZ, J.G. **Efeito da utilização de *slurry* sobre a maturação de queijo Prato**. 2003. 102p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SINCICH, T. **Business statistics by example**, 4th ed.,Upper Saddle River: Prentice-Hall. 1259 p. 1996.

SPADOTI, L.M. **Avaliação de propriedades de queijo tipo Prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação**. 2003. 229p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the melting of Prato cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Le Lait**, v. 83, n.5, p.397-408, 2003.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the microstructure of Prato type cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Milchwissenschaft**, v. 59, n. 3/4, p. 151-155, 2004.

THIERRY, A.; SALVAT-BRUNAUD, D.; MADEC, M.N.; MICHEL, F.; MAUBOIS, J. L. Affinage de l'emmental: dynamique des populations bactériennes et evolution de la composition de la phase aqueuse. **Lait**, v. 78, p.521-542, 1998.

## **CAPÍTULO III**

### **ESTUDO DO EFEITO DO pH SOBRE A PROTEÓLISE DO QUEIJO PRATO DURANTE A MATURAÇÃO**

Artigo enviado à revista Milckwissenschaft para publicação.

## ESTUDO DO EFEITO DO pH SOBRE A PROTEÓLISE DO QUEIJO PRATO DURANTE A MATURAÇÃO

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito independente do pH sobre a proteólise do queijo Prato durante a maturação utilizando-se um método de alteração do pH pós-fabricação. Um dia após a fabricação os queijos foram ralados e misturados para constituírem uma amostra homogênea, que foi dividida em 3 porções. A primeira porção foi exposta ao hidróxido de amônio para aumentar o pH; a segunda porção foi exposta ao ácido acético para baixar o pH; a terceira porção serviu de controle (sem tratamento). Imediatamente após a alteração do pH, porções de 100 gramas de queijo foram embaladas a vácuo e armazenadas a  $12 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 58 dias. Amostras foram aleatoriamente escolhidas após 1, 8, 15, 22, 29, 44 e 58 dias de armazenamento e avaliadas quanto ao pH, sólidos totais, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 12% e perfil eletroforético. O delineamento experimental utilizado foi split-plot em blocos com três repetições. Os tratamentos, ou seja, a exposição ao hidróxido de amônio ou ao ácido acético, afetaram significativamente o pH dos queijos criando três grupos distintos de pH: controle ( $4,99 \pm 0,05$ ), alto pH ( $5,7 \pm 0,1$ ) e baixo pH ( $4,79 \pm 0,08$ ). Os índices de extensão e profundidade de maturação foram significativamente afetados pela interação entre os tratamentos e o tempo de maturação. Ambos aumentaram ao longo do tempo, porém, aumentaram menos para os queijos de mais baixo pH quando comparados aos demais tratamentos. O perfil eletroforético evidenciou que nos queijos de menor pH a degradação da  $\alpha_{S1}$  e da  $\beta$ -caseínas ocorreu mais lentamente e menos extensivamente do que nos queijos controle e de mais alto pH. Através da correlação de Pearson foi notado que não houve associação significativa entre pH e proteólise. Portanto, o efeito do pH sobre a proteólise depende do tempo de armazenamento.

**Palavras-chave:** queijo Prato, alteração do pH pós-processamento, proteólise, pH, queijo de massa semi-cozida.

## **ABSTRACT**

The objective of this research was to evaluate the independent effect of pH on the proteolysis of Prato cheese during ripening using a post-manufacture pH change method. One day after manufacture, the cheeses were grated and mixed into a homogeneous sample, which was subsequently divided into 3 equal portions. The first portion was exposed to ammonium hydroxide to increase pH; the second portion was exposed to acetic acid to lower pH; whereas the third portion was used as control (no treatment). Immediately upon changing pH, portions of 100g each were vacuum packed and stored at  $12 \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 58 days. Samples were randomly selected after 1, 8, 15, 22, 29, 44 and 58 days storage and evaluated for pH, total solids, total nitrogen, nitrogen soluble at pH 4,6, nitrogen soluble in 12% trichloroacetic acid (TCA 12%) and electrophoretic profile. The experiment design was a split-plot arrangement of treatments in a randomized complete block of three replications. The treatments, i.e. exposure to either ammonium hydroxide or acetic acid, had a significant impact on the pH of the cheese samples investigated and generated three distinct pH groups: control ( $4,99 \pm 0,05$ ), high pH ( $5,7 \pm 0,1$ ) and low pH ( $4,79 \pm 0,08$ ). The interaction between treatments and ripening time had a significant effect on both the ripening extension index and the ripening depth index. Both indexes increased with time, but this increase was less intense in the case of the low pH group. The electrophoretic profile showed that degradation of  $\alpha_{s1}$  and  $\beta$ -caseins occurred at a slower rate and less extensively in the low pH cheeses as compared to the cheese samples of the control and high pH groups. Analysis by Pearson's correlation showed that there was no significant association between pH and proteolysis. This finding leads to the conclusion that the effect of pH on proteolysis depends on storage time.

**Key words:** *Prato* cheese, pH change, proteolysis, pH, semi-cooked cheese.

## 1. INTRODUÇÃO

O queijo Prato é obtido por coagulação enzimática, de massa lavada e semicozida. É o segundo queijo mais consumido do Brasil, após um período de maturação de no mínimo 25 dias. Seu processo de fabricação é bem definido tecnologicamente e originou-se dos queijos Gouda holandês e Danbo dinamarquês. A composição média do queijo Prato maturado é 42 – 44% de umidade, 26 – 29% de gordura, 1,6 – 1,9% de sal e pH variando entre 5,2 e 5,4 (Furtado & Lourenço Neto, 1994).

O pH é um parâmetro definitivo que caracteriza a identidade e a qualidade dos queijos, pois afeta diretamente sua estrutura e suas propriedades reológicas. Possivelmente porque afeta as interações protéicas. Vários estudos (Kiely et al., 1992; Lawrence et al., 1987 e 1984; Ramkumar et al., 1997; Watkinson et al., 2001; Feeney et al., 2002; Guinee et al., 2002; Yazici & Dervisoglu, 2003) avaliaram o efeito do pH sobre as propriedades físico-químicas e funcionais dos queijos durante a fabricação e maturação. Entretanto, a alteração do pH durante a fabricação dos queijos afeta outros parâmetros químicos e enzimáticos produzindo resultados que se confundem com o efeito do pH.

Uma alternativa para se estudar o efeito independente do pH sobre as características dos queijos é alterar seu pH após a fabricação. Esta técnica foi primeiramente descrita por Noomen (1983), que aumentou o pH do queijo Meshanger expondo o coágulo ao vapor de amônio. Foi posteriormente modificada por Vassal et al. (1986) para estimular um gradiente de pH em queijo Camembert e foi adaptada e expandida por Kindstedt et al. (2001), o qual utilizou hidróxido de amônio e ácido acético para aumentar ou diminuir o pH do queijo Mussarela, respectivamente. Recentemente, Pastorino et al. (2003) descreveram uma técnica de modificação do pH do queijo Cheddar através da injeção a alta pressão de uma solução de gluco-delta-lactona no queijo. O desenvolvimento desses métodos possibilitou a alteração do pH dos queijos pós-fabricação, em uma ampla faixa de variação, viabilizando o isolamento desta variável para que seu efeito sobre diferentes características dos queijos pudesse ser explorado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito independente do pH sobre a proteólise do queijo Prato durante a maturação.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Fabricação do queijo Prato**

O queijo Prato foi fabricado de acordo com o processo tradicional (Oliveira, 1986) utilizando-se leite tratado termicamente (68 °C/2 minutos), resfriado a 32 °C, adicionado de cultura láctica tipo “O” (Wisby-Visbyvac® LC-MIX F0 2 01, composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, Danisco Brasil Ltda), cloreto de cálcio 50% (0,5 mL/kg de leite), corante urucum (0,08 mL/kg de leite) e coalho (Cuajo Marschall – Yellow Label) em quantidade suficiente para se obter a coagulação em 45 minutos. Após a coagulação, o gel foi cortado e a mistura soro/coágulo foi agitada por 20 minutos antes da primeira dessoragem, que consistiu em retirar 30% do soro em relação ao volume inicial de leite. Para lavagem e cozimento da massa adicionou-se lentamente 15% de água (80 °C) em relação ao volume inicial do leite. A temperatura da mistura soro/coágulo foi aumentada 1 °C a cada 3 minutos até que se atingisse 40°C. Após se atingir o ponto de massa, procedeu-se à segunda dessoragem, a enformagem e a prensagem progressiva dos queijos por 4 horas e 40 minutos. Os queijos foram salgados por 12 horas em salmoura com 20% de sal a  $4 \pm 1$  °C, foram secos por 24 horas ( $4 \pm 1$ ) °C. Em seguida foram utilizados para a alteração de pH.

### **2.2. Composição físico química do leite e do queijo**

Todas as análises foram realizadas em triplicata. O leite utilizado em cada processamento foi avaliado quanto ao pH, sólidos totais, acidez, cinzas e nitrogênio total, pelo método micro-Kjeldahl, conforme metodologias descritas pela AOAC (1997). O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber (British Standards Institution, 1989).

Os queijos foram avaliados quanto ao pH, sólidos totais, acidez, cinzas, nitrogênio total e solúvel em TCA 12% (NS em TCA 12%) conforme metodologias descritas pela AOAC (1997). A determinação de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS em pH 4,6) foi feita segundo Barbano et al. (1991). O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber (British Standards Institution, 1989) e o teor de sal foi determinado pelo método de Volhard (Richardson, 1985).

### **2.3. Alteração do pH dos queijos**

A alteração do pH dos queijos foi realizada segundo metodologia descrita por Kindsted et al. (2001), com modificações. Experimentos exploratórios foram conduzidos visando adaptação da metodologia em termos de tempo e temperatura de exposição ao hidróxido de amônio e ao ácido acético para a alteração do pH no queijo Prato.

No dia seguinte à fabricação, os queijos foram ralados e misturados para constituírem uma amostra homogênea que foi posteriormente dividida em 3 porções. A primeira porção foi exposta ao hidróxido de amônio por 5 minutos, a temperatura ambiente, para aumentar o pH; a segunda porção foi exposta ao ácido acético por 45 minutos, a  $8 \pm 1$  °C, para baixar o pH; a terceira porção serviu de controle (sem tratamento).

A alteração do pH foi feita em dessecadores com 3 prateleiras. Em cada prateleira colocou-se aproximadamente 700 gramas de queijo ralado. Para aumentar ou diminuir o pH utilizou-se, respectivamente, 80 mL de hidróxido de amônio e 400 mL de ácido acético, colocados em placas de Petri no fundo dos dessecadores.

Imediatamente após a alteração do pH, porções de 100 gramas de queijo foram embaladas à vácuo e armazenadas a  $12 \pm 1$  °C por 58 dias.

### **2.4. Proteólise**

Para avaliar o efeito do pH sobre a proteólise, amostras foram aleatoriamente escolhidas após 1, 8, 15, 22, 29, 44 e 58 dias de armazenamento a  $12 \pm 1$  °C. Foram determinados os teores de nitrogênio total (NT), solúvel em TCA

12% (NS TCA 12%) conforme metodologias descritas pela AOAC (1997), os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH4,6) segundo Barbano et al. (1991) e perfil eletroforético. A eletroforese em gel poliacrilamida PAGE foi executada com géis de separação de 9% e de concentração de 4%, em uma unidade vertical Mini Protean III xi (Bio-Rad), conforme descrito por Andrews (1983). A coloração dos géis foi feita por imersão em Brilliant Blue Coloidal G, seguindo metodologia descrita por Blakesley & Boezi (1977).

Os índices de extensão (IEM) e profundidade de maturação (IPM) foram calculados, respectivamente, pelas seguintes fórmulas:  $IEM = (NS \text{ pH}4,6/NT) \times 100$  e  $IPM = (NS \text{ TCA } 12\%/NT) \times 100$ . A extensão reflete a proporção de moléculas de proteínas que foram decompostas predominantemente em grandes peptídeos. A profundidade refere-se à extensão na qual estes peptídeos foram degradados em componentes menores, entre os quais estão os aminoácidos (Walstra et al., 1999).

As amostras foram também avaliadas quanto ao pH, acidez e sólidos totais, em cada um dos pontos de amostragem.

## **2.5. Delineamento experimental e análise estatística dos dados**

O delineamento experimental adotado foi o split-plot em blocos com três repetições. O bloco foi a batelada de leite a ser processado, as parcelas foram os tratamentos aplicados (exposição ao hidróxido de amônio, exposição ao ácido acético e controle) e a sub-parcela foi o tempo de armazenamento. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de acordo com esse delineamento. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a associação do pH com as demais variáveis (Sincich, 1996). Foi adotado 5% de significância para todos os testes realizados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Composição físico química do leite e dos queijos

O leite utilizado nos três processamentos apresentou a seguinte composição média:  $12,28 \pm 0,07\%$  de sólidos totais,  $3,6 \pm 0,1\%$  de gordura,  $3,4 \pm 0,3\%$  de proteína e  $0,79 \pm 0,03\%$  de cinzas. O pH e a acidez foram, respectivamente,  $6,77 \pm 0,06$  e  $0,17\%$  de ácido láctico.

Comparando-se a composição dos queijos obtidos nos experimentos com os obtidos por outros pesquisadores (Tabela 1), observa-se que o produto apresentou composição característica de queijo Prato.

**Tabela 1.** Composição média e desvios padrões (n=3) do Queijo Prato fabricado no presente trabalho e composição obtida por outros autores.

Determinações	Valor mais provável	Spadoti et al. (2004)	Chicoscki et al. (2002)
pH	$5,14 \pm 0,05$	5,72	5,49
Acidez (% de ácido láctico)	$0,88 \pm 0,03$	0,84	1,04
Sólidos Totais (%)	$56,4 \pm 0,4$	54,89	52,99
Gordura (%)	$30 \pm 1$	25,30	25,56
Cinzas (%)	$4,1 \pm 0,1$	-----	5,88
Proteína Total (%)	$22,2 \pm 0,5$	18,02	22,54
NS pH 4,6 (%NT <sup>1</sup> )	$4,8 \pm 0,4$	-----	-----
NS TCA 12% (%NT <sup>1</sup> )	$1,6 \pm 0,4$	-----	-----
GES <sup>2</sup> (%)	$53 \pm 2$	-----	48,23
Umidade (%)	$43,6 \pm 0,4$	45,11	-----
Sal (%)	$1,9 \pm 0,1$	1,85	0,86
S/U <sup>3</sup> (%)	$4,2 \pm 0,2$	-----	1,84

<sup>1</sup>nitrogênio total; <sup>2</sup>gordura no extrato seco; <sup>3</sup>sal na umidade

A avaliação estatística indicou que os tratamentos, ou seja, a exposição ao hidróxido de amônio ou ao ácido acético, afetaram significativamente o pH dos

queijos (Tabela 2), criando três grupos distintos de pH: controle ( $4,99 \pm 0,05$ ), alto pH ( $5,7 \pm 0,1$ ) e baixo pH ( $4,79 \pm 0,08$ ). No dia seguinte aos tratamentos observou-se uma variação de 0,15 unidades de pH para o queijo controle. Os queijos expostos à atmosfera de hidróxido de amônio e ácido acético apresentaram aumento e redução de 0,56 e 0,35 unidades de pH, respectivamente, em relação ao queijo original (pH 5,15). A interação entre os tratamentos e o tempo de maturação afetou significativamente o pH (Tabela 2). Entretanto, observa-se na Figura 1 que as diferentes faixas estabelecidas pelos tratamentos foram mantidas, durante todo o período de maturação.

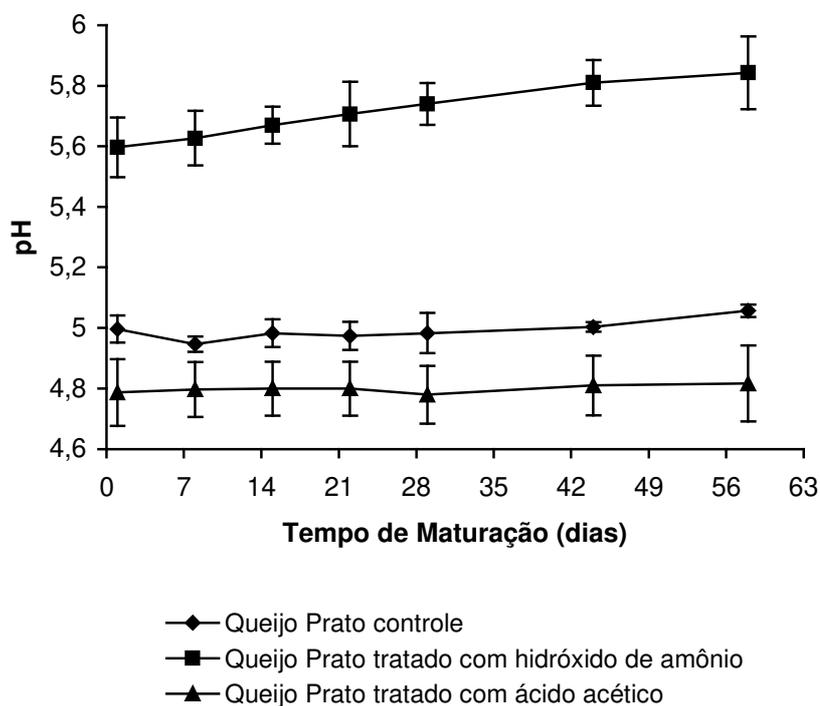
**Tabela 2.** Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre pH, sólidos totais, índice de extensão (IEM) e índice de profundidade (IPM) de maturação.

Fator	GL	Valores de p			
		pH	Sólidos Totais	IEM	IPM
Tratamento*	2	< 0,0001	0,00162	0,0721	0,2082
Tempo	6	0,0011	0,2099	< 0,0001	< 0,0001
Tratamento x Tempo	12	< 0,0001	0,0954	0,0006	0,0125

\*Exposição do queijo ao hidróxido de amônio e ao ácido acético, para aumentar ou diminuir o pH, respectivamente.

### 3.2 Efeito do pH sobre a proteólise do queijo Prato

Os resultados indicaram que os tratamentos não afetaram significativamente os índices de extensão e profundidade de maturação (Tabela 2), o que equivale a afirmar que o pH não afetou significativamente a proteólise dos queijos. Além disso, através da correlação de Pearson (Tabela 3) verificou-se que não existe associação significativa entre pH e índice de extensão e profundidade de maturação.



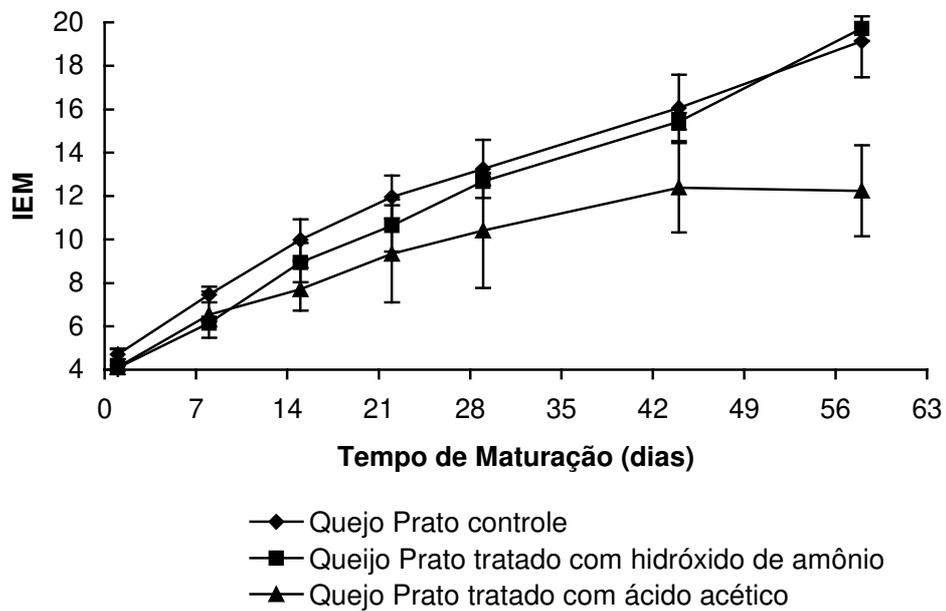
**Figura 1.** pH do queijo Prato (n=3) durante o tempo de maturação.

**Tabela 3.** Correlação de Pearson entre pH e demais variáveis.

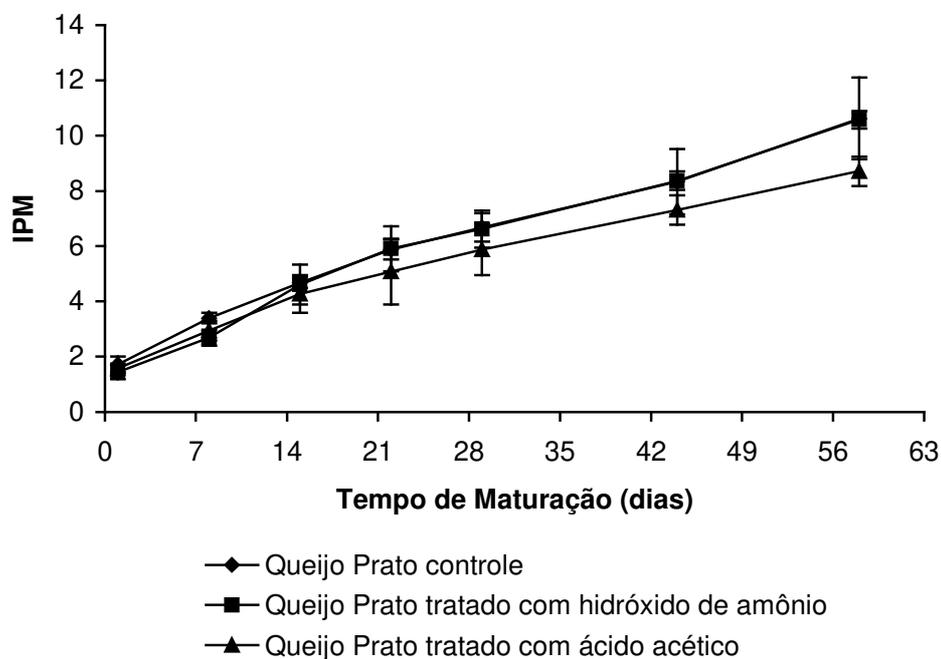
		Sólidos totais	IEM	IPM	Nitrogênio total
pH	Correlação	-0,441	0,219	0,173	-0,050
	Valores de p	<0,0001	0,085	0,176	0,698

IPM=índice de profundidade de maturação; IEM=índice de extensão de maturação.

Por outro lado, a interação entre tratamento e tempo afetou significativamente a proteólise dos queijos (Tabela 3). Pode-se observar nas Figuras 2 e 3 que os índices de extensão e profundidade de maturação aumentaram ao longo do tempo, porém aumentaram menos para os queijos de mais baixo pH quando comparados aos demais tratamentos.



**Figura 2:** Efeito do tempo de maturação sobre o índice de extensão de maturação.



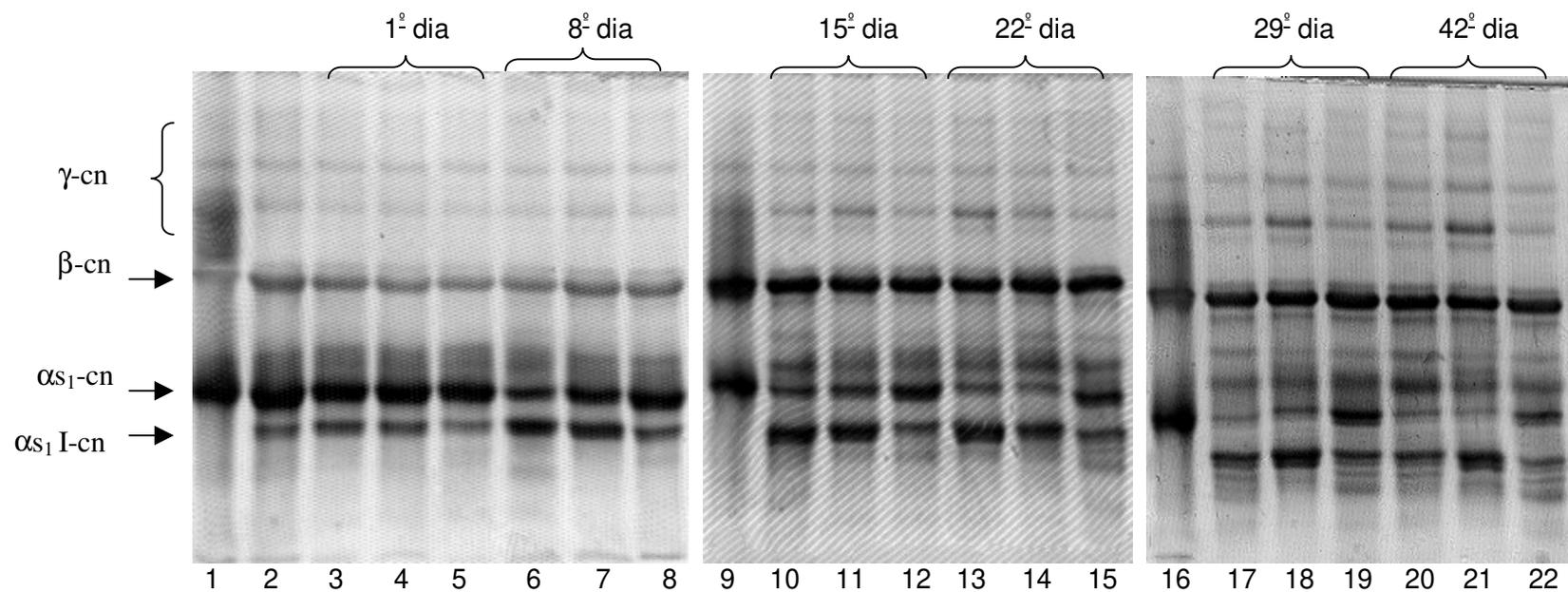
**Figura 3:** Efeito do tempo de maturação sobre o índice de profundidade de maturação.

O perfil eletroforético (Figura 4) mostrou claramente que para todos os queijos houve, durante a maturação, a degradação da  $\alpha_{S1}$  e da  $\beta$ -caseína, com o concomitante aumento das frações  $\alpha_{S1}$ -I caseína e  $\gamma$ -caseína. Observou-se ainda que a taxa de hidrólise foi dependente do tempo de maturação. Nos queijos de menor pH ( $4,79 \pm 0,08$ ) a degradação de  $\alpha_{S1}$  e  $\beta$ -caseínas ocorreu mais lentamente e menos extensivamente do que nos queijos controle ( $4,99 \pm 0,05$ ) e de mais alto pH ( $5,7 \pm 0,1$ ). O efeito do pH ao longo do tempo sobre a proteólise da  $\alpha_{S1}$  e da  $\beta$ -caseína pode ser mais claramente notado após 15 e 22 dias de maturação, respectivamente (bandas 10, 11 e 12 para  $\alpha_{S1}$ -caseína e bandas 13, 14 e 15 para  $\beta$ -caseína). Após 42 dias de maturação (bandas 20, 21 e 22), observou-se uma maior degradação da  $\alpha_{S1}$  e  $\beta$ -caseína no queijo com mais alto pH, tanto quando comparado ao queijo controle como ao queijo de menor pH.

Considerando-se que a alteração do pH se deu pós-processamento do queijo Prato, e que portanto a retenção de quimosina e enzimas naturais do leite foi a mesma, acredita-se que as diferenças observadas na proteólise foram decorrentes da alteração do pH do produto, que favoreceu ou dificultou o acesso e a atividade das enzimas proteolíticas naturais do leite e advindas da adição da cultura láctica.

A menor taxa de proteólise verificada ao se reduzir o pH do queijo Prato de  $4,99 \pm 0,05$  para  $4,79 \pm 0,08$  foi também observada para queijo Cheddar por Pastorino et al. (2003), quando o pH foi reduzido de 5,0 para 4,7 utilizando método de alteração de pH pós-processamento. O mesmo foi observado por Yazici & Dervisoglu (2003) e Watkinson et al. (2001) que alteraram o pH dos queijos Civil e Cheddar durante o processo de fabricação.

O abaixamento do pH de  $4,99 \pm 0,05$  para  $4,79 \pm 0,08$  diminuiu a taxa de hidrólise da  $\alpha_{S1}$ -caseína devido, possivelmente, ao aumento da interação eletrostática entre as moléculas de caseína mantendo-as mais fortemente ligadas (Walstra, 1990), diminuindo a acessibilidade aos sítios de hidrólise. Outro fator que pode ter favorecido a menor proteólise no mais baixo pH foi a atividade da plasmina, proteinase nativa do leite.

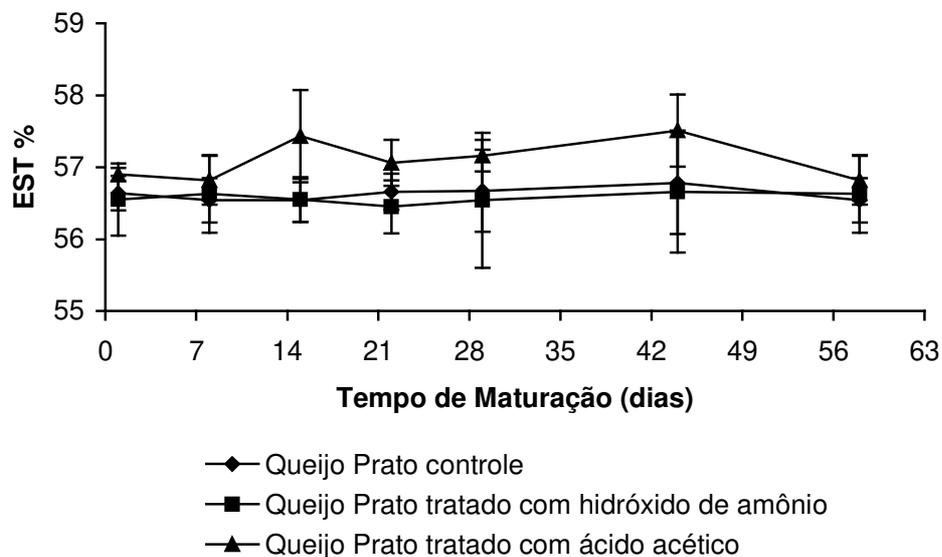


**Figura 4.** Perfil eletroforético dos queijos obtidos após tratamento de alteração de pH. Bandas 1, 9 e 16: padrão de caseinato. Banda 2: Queijo Prato com um dia de fabricação. Bandas 3, 6, 10, 13, 17 e 20 dos queijos controle (sem tratamento). Bandas 4, 7, 11, 14, 18 e 21 dos queijos submetidos à exposição ao hidróxido de amônio. Bandas 5, 8, 12, 15, 19 e 22 dos queijos submetidos à exposição ao ácido acético.

É possível que no queijo, assim como no leite, a redução do pH seja acompanhada pela dissociação da plasmina (Lawrence et al., 1984), desfavorecendo assim a proteólise do queijo.

Com o aumento do pH (de  $4,99 \pm 0,05$  para  $5,7 \pm 0,1$ ) praticamente não se observou diferença nos índices de extensão e profundidade de maturação ao longo do tempo (Figuras 2 e 3). Estes resultados sugerem que no queijo, assim como no paracaseinato de cálcio, a taxa de proteólise da  $\alpha_{S1}$ -caseína é praticamente a mesma nestes pH (Walstra, 1990).

Observa-se na Figura 5 que o queijo de menor pH apresentou maior teor de sólidos totais que o queijo controle e de mais alto pH, ao longo do armazenamento. Os tratamentos afetaram significativamente o teor de sólidos totais (Tabela 2) e a correlação de Pearson mostrou que existe uma associação negativa entre pH e teor de sólidos totais dos queijos (Tabela 3). O maior teor de sólidos totais no queijo com menor pH ( $4,79 \pm 0,08$ ) também foi observado por Pastorino et al. (2003), que alteraram o pH do queijo Cheddar após o processamento. A diminuição do pH de  $4,99 \pm 0,05$  para  $4,79 \pm 0,08$  pode favorecer a interação entre as proteínas da matriz protéica devido à proximidade do ponto isoelétrico e à diminuição da repulsão eletrostática (Visser et al., 1986; Marchesseau et al., 1997). Assim, a capacidade de retenção de água da matriz protéica é diminuída no pH abaixo de 5,0, resultando em aumento da sinérese e aumento do extrato seco do queijo.



**Figura 5:** Extrato seco do queijo Prato dos três tratamentos durante o tempo de maturação.

#### 4 – CONCLUSÕES

Os índices de extensão e profundidade de maturação aumentaram ao longo do tempo e aumentaram menos para os queijos de mais baixo pH quando comparados aos demais tratamentos, o que foi confirmado pelo perfil eletroforético. Ao longo do tempo de maturação, nos queijos de menor pH a degradação da  $\alpha_{S1}$  e da  $\beta$ -caseínas ocorreu mais lentamente e menos extensivamente do que nos queijos controle e de mais alto pH. O conhecimento do efeito do pH ao longo do tempo de maturação pode contribuir para direcionar o processamento de fabricação do queijo com pH mais alto ou mais baixo visando acelerar ou retardar a maturação do produto.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, A. T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **Journal of Dairy Research**, v. 50, n.1, p. 45-55, 1983.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16. Ed. 3, revision. Maryland: AOAC International, v1-2, 1997.

BARBANO, D. M.; LYNCH, J. M.; FLEMING, J. R. Direct and indirect determination of true protein content of milk by Kjeldahl analysis: collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v.74, p.281, 1991.

BLAKESLEY, R.W.; BOEZI, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 82, n.2, p. 580-582, 1977.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). **Methods**. London: British Standards Institution, 1989. 12p.

CICHOSKI, A. J.; VALDUGA, E.; VALDUGA, A. T.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, v. 13, n.4/5, p.329-336, 2002.

FEENEY, E. P.; GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.7, p. 1646-1654, 2002.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. **Tecnologia de queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.

GUINEE, T. P.; FEENEY, E. P.; AUTY, M. A. E.; FOX, P. F. Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p. 1655-1669, 2002.

KIELY, L. J. KINDSTEDT, P. S.; HENDRICKS, G. M.; LEVIS, J. E.; YUN, J. J.; BARBANO, D. M. Effect of draw pH on the development of curd structure during the manufacture of Mozzarella cheese. **Food Structure**, v.11, n.3, p. 217-224, 1992.

KINDSTEDT, P.S.; ZIELINSKI, A.; ALMENA-ALISTE, M.; GE, C. A post-manufacture method to evaluate the effect of pH mozzarella cheese characteristics. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.56, n. 3, p. 14-19, 2001.

LAWRENCE, R. C.; HEAP, H. A.; GILLES, J. A controlled approach to cheese technology. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 8, p. 1632-1645. 1984.

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

MARCHESSEAU, S.; GASTALDI, E.; LAGAUDE, A.; CUQ, J. L. Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1483-1489, 1997.

NOOMEN, A. The role of the surface flora in the softening of cheeses with a low initial pH. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, v. 3, n.4, p. 229-232, 1983.

OLIVEIRA, J.S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Ícone, 1986. 146p.

PASTORINO, A. J.; HANSEN, C. L.; McMAHON, D.J. Effect of pH on the chemical composition and structure-functional relationships of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v.86, n. 9, p.2751-2760, 2003.

RAMKUMAR, C.; CREAMER, L. K.; JOHSTON, K. A.; BENNETT, R. J. Effect of pH and time on the quantity of readily available water within fresh cheese curd. **Journal of Dairy Research**, v. 64, n.1, p. 123-134, 1997.

RICHARDSON, G. H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products**. Washington: American Publ. Health Assoc, 1985. 412p.

SINCICH, T. **Business statistics by example**, 4th ed., Upper Saddle River: Prentice-Hall. 1259 p. 1996.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the microstructure of Prato type cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Milchwissenschaft**, v. 59, n. 3/4, p. 151-155, 2004.

VASSAL, L.; MONNET, V.; LE BARS, D.; ROUX, C.; GRIPON, I. J. Relation entre le pH, la composition chimique et la texture des fromages de type camembert. **Lait**, v.66, n.4, p.341-351, 1986.

VISSER, J.; MINIHAN, A.; SMITS, P.; TJAN, S. B.; HEERTJE, I. Effects of pH and temperature on the milk salt system. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 40, n.4, p.351-368, 1986.

WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. **Dairy technology: principles of milk properties and processes**. New York: Marcel Dekker, 1999. 727p.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, Mendota, v.73, n. 8, p.1965-1979, 1990.

WATKINSON, P.; COKER, C.; CRAWFORD, R.; DODDS, C.; JOHNSTON, K.; MCKENNA, A.; WHITE, N. Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. **International Dairy Journal**, v.11, n.4-7, p. 455-464, 2001.

YAZICI, F.; DERVISOGLU, M. Effect of pH adjustment on some chemical, biochemical, and sensory properties of Civil cheese during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n.4, p. 361-369, 2003.

## **CAPÍTULO IV**

### **METODOLOGIA PARA AVALIAR A CAPACIDADE DERRETIMENTO DE QUEIJO PRATO**

Artigo enviado à revista Brazilian Journal of Food Technology para publicação.

## **METODOLOGIA PARA AVALIAR A CAPACIDADE DE DERRETIMENTO DE QUEIJO PRATO**

### **RESUMO**

A capacidade de derretimento do queijo é indicadora de sua qualidade e vem se tornando uma característica importante para o queijo Prato devido ao seu crescente uso culinário. O objetivo deste trabalho foi padronizar uma condição única de tempo/temperatura para avaliar o derretimento do queijo Prato, durante todo o período de maturação. Os queijos foram fabricados segundo metodologia tradicional e avaliados em relação à capacidade de derretimento após 1, 15, 30 e 45 dias de maturação, utilizando-se o método de Schreiber e diferentes combinações de tempo e temperatura através da análise de superfície de resposta. A condição determinada foi utilizada para acompanhar a capacidade de derretimento do queijo Prato por 42 dias. Os resultados demonstraram que a melhor condição para avaliar o derretimento do queijo Prato durante todo o período de maturação foi 130 °C/10 min. Esta condição mostrou-se adequada para acompanhar a capacidade de derretimento do queijo, que aumentou significativamente após sete dias de maturação.

**Palavras-chave:** maturação, queijo Prato, derretimento.

### **ABSTRACT**

Prato cheese meltability is an important parameter of its quality and it has been coming an important characteristic due to its increasing use in recipes. The objective of this work was standardize one condition of time/temperature to evaluate Prato cheese melting, during its ripening. The cheeses was made according to traditional methodology and the cheese melting was evaluated after 1, 15, 30 and 45 days of ripening, using the Schreiber test in different combinations of time and temperature and response surface analysis. The determined condition

was used to follow the meltability of Prato cheese for 42 days. The results had demonstrated that the best condition for the melting of Prato cheese for all ripening period was 130°C/10min. This condition revealed ad equate to follow the meltability of the Prato cheese, that significantly increased after seven days of ripening.

**Key words:** ripening, *Prato* cheese, melting.

## 1. INTRODUÇÃO

O queijo Prato tem origem nos queijos Gouda holandês e Danbo dinamarquês. É um produto com grande expressão comercial no Brasil, com produção média de 70.000 toneladas ao ano (Cichoscki et al., 2002), bem padronizado tecnologicamente e o melhor caracterizado comercialmente (Sanchez, 2000). Atualmente, devido à sua utilização no preparo de pizzas, sanduíches quentes e em outros tipos de alimentos preparados, o bom derretimento tornou-se uma propriedade importante na determinação da qualidade do queijo Prato. As propriedades de derretimento do queijo são controladas pela sua composição química no momento do aquecimento. Isto inclui parâmetros como teor protéico, gordura, umidade, sal e pH, além de outros, como conteúdo de cálcio, hidrólise protéica e principalmente a extensão da hidratação da proteína, ou seja, a capacidade de retenção de água da matriz caseica, a qual varia com o avanço da maturação (Guinee et al., 2000; MacMahon & Oberg, 1998). Considerando a peculiaridade da cada queijo, diversos métodos são utilizados para avaliar a capacidade de derretimento de queijos: variação do diâmetro de discos de queijos antes e depois do aquecimento (Kosikowski, 1982), variação da altura de cilindros antes e depois do aquecimento (Arnott et al., 1957) e distância do escoamento do queijo em tubos cilíndricos de dimensões características após o aquecimentos (Olson & Price, 1958). Mais recentemente tem-se utilizado técnicas de imagem computacional para avaliar a capacidade de derretimento dos queijos (Wang & Sun, 2001). De qualquer forma, o princípio da avaliação baseia-se na modificação sofrida pela amostra quando esta é submetida a uma fonte de calor, a uma dada temperatura, por um tempo determinado. Para tanto, equipamentos

como estufa (Arnott et al., 1957) e forno convencional (Fife et al., 1996) podem ser utilizados. As condições de temperatura variam de 70 °C (Wang & Sun, 2001) a 280 °C (Guinee *et al.*, 2000), e os tempos de exposição de 4 (Guinee et al., 2000) a 60 minutos (Obergh et al., 1991).

Considerando-se que a capacidade de derretimento do queijo Prato aumenta durante a maturação (Spadoti et al., 2003), o objetivo do trabalho foi padronizar uma condição única de tempo/temperatura para avaliar o comportamento da capacidade de derretimento do queijo durante todo o período de maturação e aplicar a condição definida para acompanhar o desenvolvimento da capacidade de derretimento do produto.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Fabricação do queijo Prato**

O queijo Prato foi fabricado segundo metodologia tradicional (Oliveira, 1986). Após a recepção, o leite foi tratado termicamente (68 °C/2 min) e resfriado a 32 °C. Adicionou-se fermento láctico tipo "O" (1%) constituído de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, cloreto de cálcio 50% (0,5 mL/kg de leite), corante urucum (0,08 mL/kg de leite) e coalho na proporção adequada para obter coagulação em 45 minutos. Após o corte da massa promoveu-se agitação lenta por 20 minutos e a primeira dessoragem. Em seguida, a mistura soro/massa foi aquecida através da adição de água quente até 40 °C. Atingido o ponto de massa, fez-se a dessoragem e enformagem do produto. Procedeu-se a prensagem em 4 etapas, e a pressão foi aumentada gradativamente em cada uma delas. Os queijos foram salgados em salmoura, sendo posteriormente secos, embalados a vácuo e armazenados a 12 °C para maturação. Realizou-se um processamento de fabricação do queijo para a etapa de padronização das condições de teste. Para avaliar a condição estabelecida, foram realizados três processamentos e a capacidade de derretimento foi avaliada até 42 dias de maturação.

## **2.2. Composição do queijo Prato**

Os queijos foram avaliados um dia após a fabricação quanto ao pH, através da introdução direta do eletrodo na amostra. Os teores de sólidos totais, proteína e cinzas foram determinados conforme metodologias descritas pela AOAC (1997). A porcentagem de gordura foi determinada pelo método de Gerber de acordo com metodologia descrita pela British Standard Institution (1989) e o teor de sal foi obtido segundo metodologia de Volhard (Richardson, 1985).

## **2.3. Padronização da condição do teste de derretimento do queijo Prato**

Para padronizar a condição de tempo e temperatura adequada para avaliar o derretimento do queijo Prato, amostras foram aleatoriamente escolhidas após 1, 15, 30 e 45 dias de maturação, e avaliadas quanto à capacidade de derretimento através do método de Schreiber (Kosikowski, 1982), variando-se as condições de tempo e temperatura do teste. A capacidade de derretimento foi expressa pelo aumento do diâmetro do queijo após a aplicação do teste.

Para o preparo das amostras, os queijos armazenados a 12 °C foram cortados com auxílio de uma sonda cilíndrica de 34 mm de diâmetro e fatiados para obtenção de discos de 5mm de espessura. Os discos de queijo foram colocados em placas de Petri previamente preparadas, divididas ao longo dos diâmetros em 8 áreas iguais. As placas foram levadas à estufa com circulação de ar, sob temperatura controlada (5 níveis de variação), onde permaneceram pelo tempo necessário para o teste (5 níveis de variação). Após o derretimento e o resfriamento das amostras por 30 minutos os diâmetros foram medidos. Todas as determinações foram feitas em quadruplicata.

Para avaliação da capacidade de derretimento do produto durante a maturação, aplicou-se a condição de teste previamente definida, após 1, 7, 14, 28, 35 e 42 dias de maturação. Neste caso, a capacidade de derretimento foi expressa como a porcentagem de aumento do diâmetro do queijo após a aplicação do teste.

## 2.4. Planejamento experimental

Para padronizar a condição do teste, foi utilizado o método Box-Wilson (Cochan e Cox, 1992) para o planejamento experimental  $2^2$ , com três pontos centrais e quatro axiais (Tabela 1), resultando num total de 11 experimentos para cada um dos pontos avaliados (1, 15, 30 e 45 dias de maturação) e no modelo matemático apresentado na Equação 1.

$$\text{Derretimento} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{22}x_2^2 \quad (1)$$

**Tabela 1.** Variáveis para determinação das condições de derretimento.

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura (°C) – $x_1$	80	102	156	210	232
Tempo (min) – $x_2$	5	7,2	12,5	17,8	20

Pontos axiais:  $\pm \alpha = \pm (2^n)^{1/4}$ , onde n é o número de variáveis independentes, ou seja, 2.

Para validação do modelo foram feitas análise de regressão dos coeficientes do modelo matemático, análise de variância (ANOVA) e teste – F. Para avaliar o efeito do tempo de maturação sobre a capacidade de derretimento utilizou-se delineamento experimental com único fator em blocos completamente aleatorizados (Cochan e Cox, 1992). O fator principal foi o tempo de maturação (5 níveis) e os blocos foram os processamentos (3 níveis). Os dados foram analisados utilizando-se o software Statistica (Statsoft, v. 5.5). Foi adotado 5% de significância para todos os testes realizados.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Padronização da condição do teste de derretimento do queijo Prato

Os queijos fabricados para definição da condição de teste apresentaram composição típica de queijo Prato, com 43,71% de umidade, 22,76% de proteína, 29,25% de gordura, 3,98% de cinzas, 1,88% de sal e pH de 5,12. Segundo

Furtado e Lourenço Neto (1994) a composição média do queijo Prato é de 42-44% de umidade, 26-29% de gordura, 1,6-1,9% de sal e pH entre 5,2-5,4. Em relação às proteínas, os teores podem variar de 18 a 24% (Baldini, 1998).

Baseando-se nos de diâmetros obtidos após o teste de derretimento para 1, 15, 30 e 45 dias de maturação (Tabela 2) analisou-se os dados por regressão não-linear múltipla e, através do modelo polinomial de segunda ordem (Equação 1), foi possível desenvolver os modelos polinomiais quadráticos que descrevem o derretimento (Dt) em cada fase da maturação (Equação 2 a 5).

$$Dt_{1d} = -4,29 + 0,08T - 2,0 \cdot 10^{-4}T^2 + 0,38t - 0,01t^2 - 3,8 \cdot 10^{-4}Tt \quad (2)$$

$$Dt_{15d} = -2,96 + 0,08T - 1,6 \cdot 10^{-4}T^2 + 0,28t - 5,5 \cdot 10^{-5}t^2 - 1,64 \cdot 10^{-3}Tt \quad (3)$$

$$Dt_{30d} = 0,59 + 0,05T - 1,1 \cdot 10^{-4}T^2 + 0,166t - 2,42 \cdot 10^{-3}t^2 - 6,4 \cdot 10^{-4}Tt \quad (4)$$

$$Dt_{45d} = 4,15 + 0,02T - 5,3 \cdot 10^{-5}T^2 + 0,09t - 5,41 \cdot 10^{-3}t^2 + 1,76 \cdot 10^{-4}Tt \quad (5)$$

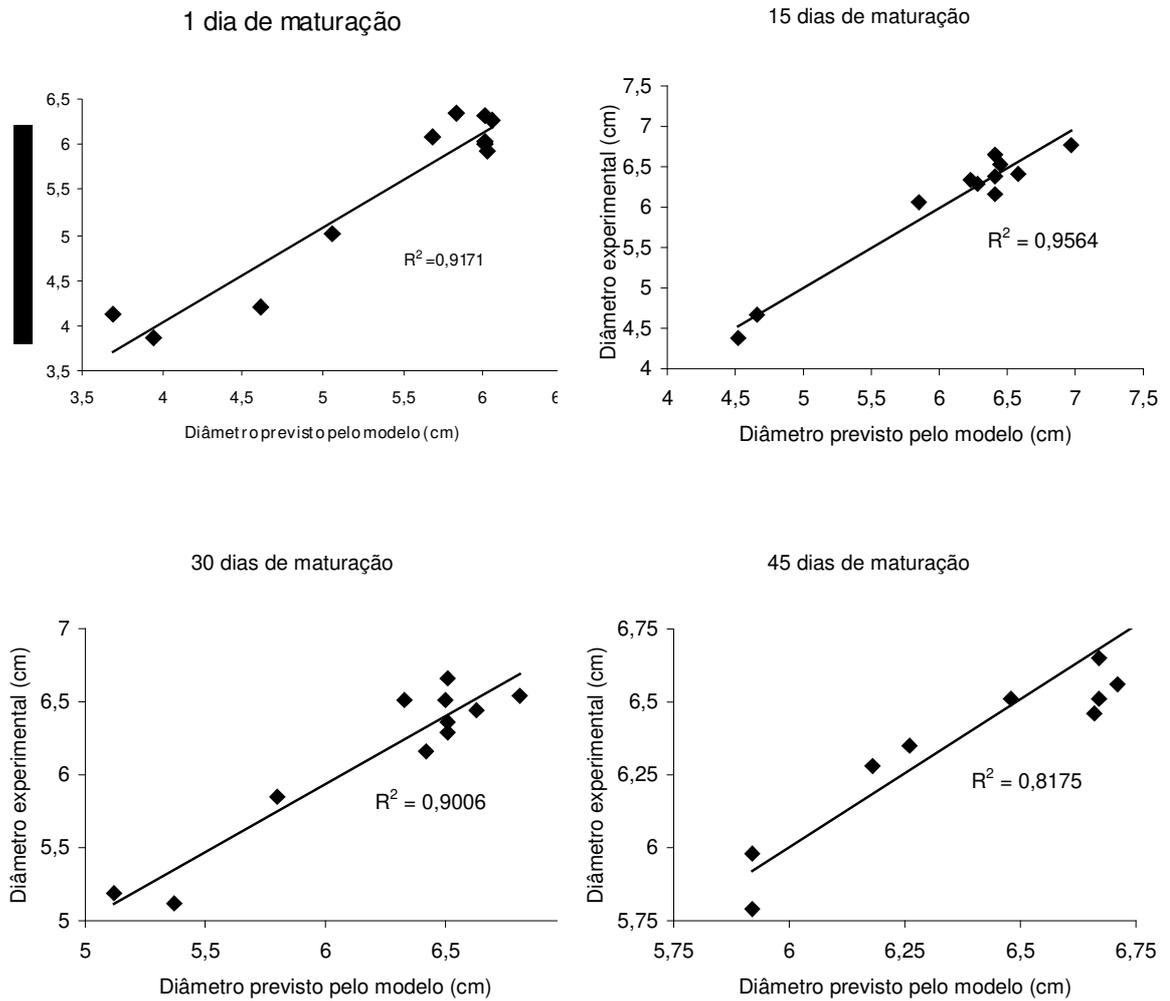
**TABELA 2.** Efeito das condições de tempo e temperatura do teste de derretimento sobre o diâmetro queijo Prato após 1, 15, 30 e 45 dias de maturação.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis Reais		Diâmetros obtidos (cm)			
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	T (°C)	t (min)	Tempo de maturação (dias)			
					1	15	30	45
1	-1	-1	102	7,2	3,9 ± 0,2	4,67 ± 0,04	5,1 ± 0,2	6,3 ± 0,5
2	+1	-1	210	7,2	6,4 ± 0,3	6,77 ± 0,07	6,54 ± 0,08	6,56 ± 0,08
3	-1	+1	102	17,8	4,2 ± 0,2	6,1 ± 0,3	5,9 ± 0,3	6,0 ± 0,2
4	+1	+1	210	17,8	6,3 ± 0,3	6,3 ± 0,4	6,5 ± 0,2	6,5 ± 0,3
5	-1,41	0	80	12,5	4,1 ± 0,1	4,4 ± 0,6	5,2 ± 0,7	5,79 ± 0,08
6	+1,41	0	232	12,5	5,9 ± 0,5	6,5 ± 0,5	6,4 ± 0,2	7,1 ± 0,3
7	0	-1,41	156	5	5,0 ± 0,3	6,3 ± 0,5	6,5 ± 0,4	6,5 ± 0,5
8	0	+1,41	156	20	6,1 ± 0,3	6,4 ± 0,3	6,2 ± 0,5	6,4 ± 0,4
9	0	0	156	12,5	6,0 ± 0,2	6,4 ± 0,4	6,7 ± 0,2	6,5 ± 0,2
10	0	0	156	12,5	6,0 ± 0,2	6,2 ± 0,1	6,3 ± 0,5	6,9 ± 0,2
11	0	0	156	12,5	6,3 ± 0,3	6,7 ± 0,6	6,4 ± 0,1	6,7 ± 0,4

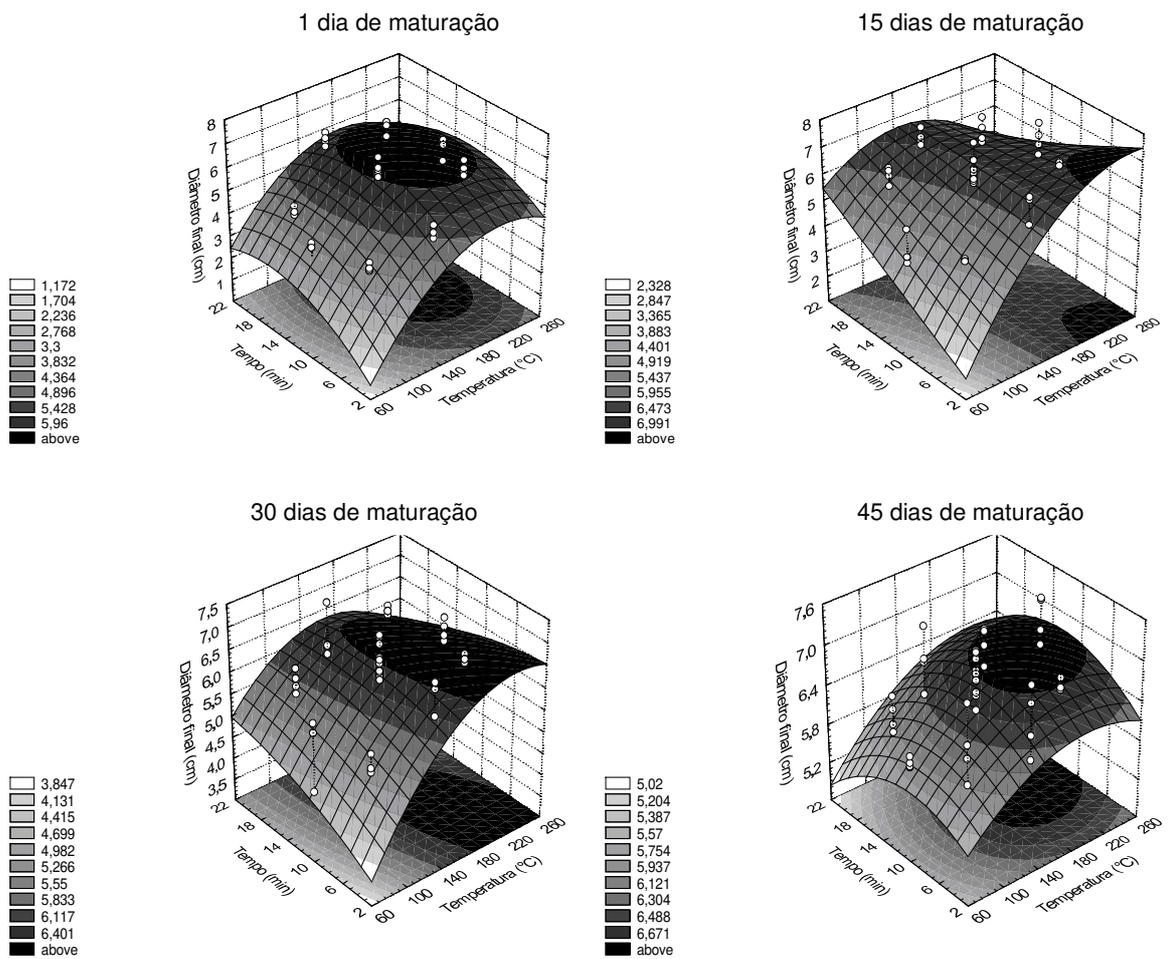
± 1,41 = ± (2<sup>2</sup>)<sup>1/4</sup>.

Através da análise de variância e do teste *-F* verificou-se que o modelo real foi validado, uma vez que o valor de  $F_{\text{tabelado}}$  (2,47) foi menor que os valores de  $F_{\text{calculados}}$  para cada dia avaliado (1 dia = 51,67; 15 dias = 39,50; 30 dias = 15,12 e 45 dias = 7,48), considerando-se o nível de 95% de significância. Pode-se observar através da Figura 1 o bom ajuste entre o modelo matemático utilizado e o método experimental nos diferentes estágios de maturação do queijo Prato

A partir dos modelos polinomiais quadráticos desenvolvidos para cada dia de maturação, foram geradas quatro superfícies de resposta (Figura 2). Através da análise dessas superfícies, observou-se que na região de máxima capacidade de derretimento, representada pela área mais escura e mais alta de cada diagrama, pode-se trabalhar com diferentes combinações de tempo e temperatura para se avaliar o derretimento do queijo.



**Figura 1.** Relação entre os diâmetros previstos pelo modelo matemático e obtidos experimentalmente após o derretimento nos diferentes estágios de maturação.



**Figura 2.** Superfícies de resposta para capacidade de derretimento com 1, 15, 30 e 45 dias de maturação em função do tempo e temperatura de derretimento do queijo.

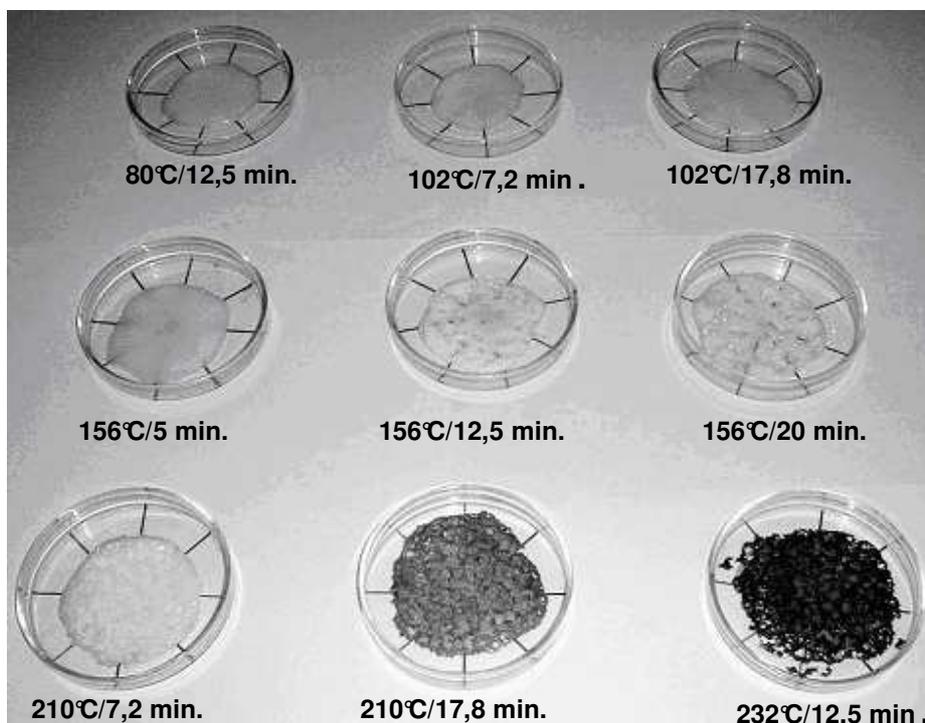
Entretanto, estes dados devem ser considerados juntamente com a aparência dos queijos após o derretimento (Figura 3), a qual indicou que o diâmetro dos queijos aumentou com o aumento da temperatura e/ou do tempo de exposição numa dada temperatura. Porém, nas mais altas temperaturas e nos tempos de exposição mais longos o queijo tendeu a fritar e/ou queimar, demonstrando que a condição ótima de derretimento foi ultrapassada, apesar do maior diâmetro.

Considerando-se a análise das superfícies de resposta ao longo da maturação (Figura 2) e o aspecto visual dos queijos (Figura 3), foram estabelecidos outros sete binômios tempo x temperatura (Tabela 3) para explorar a melhor condição de teste para avaliar o derretimento do queijo Prato. Neste caso, utilizou-se queijos com 30 dias de maturação. Observa-se na Tabela 3 que o maior derretimento, representado pelo maior diâmetro, ocorreu a 140 °C/10 min. Porém, os queijos derretidos nesta condição começaram a fritar na sua própria gordura, não apresentando o aspecto visual desejável (Figura 4), caracterizado pelo derretimento uniforme, plástico e sem abertura na superfície. Da mesma forma, o uso de temperaturas superiores a 140 °C resultou em queijos cujas bordas foram fritas e/ou queimadas.

**TABELA 3.** Condições de teste e resultados para definição da condição de derretimento.

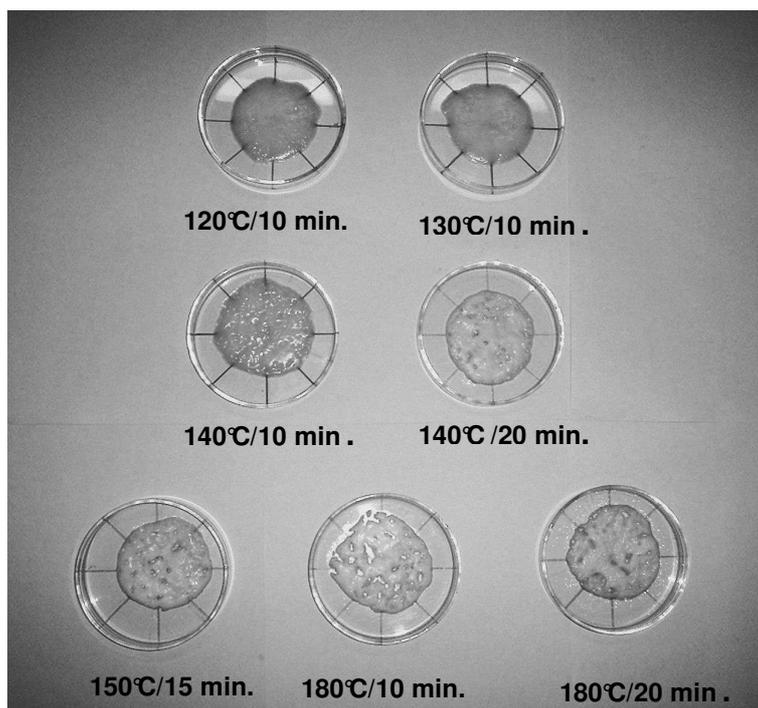
Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Diâmetro experimental (cm)	Diâmetro modelo matemático (cm)	Desvio percentual (%) <sup>*</sup>
1	120	10	6,2 ± 0,3	5,92	4,82
2	130	10	6,2 ± 0,4	6,11	1,18
3	140	10	6,6 ± 0,1	6,27	4,49
4	140	20	6,1 ± 0,2	6,31	-3,00
5	150	15	5,8 ± 0,4	6,46	-9,55
6	180	10	5,9 ± 0,1	6,69	-11,70
7	180	15	6,1 ± 0,3	6,65	-8,81

\* Desvio entre o diâmetro previsto pelo modelo matemático e o obtido experimentalmente.



**Figura 3.** Aspecto visual do queijo Prato derretido em diferentes condições de tempo e temperatura (15 dias de maturação).

Baseados na capacidade de derretimento representada pelo diâmetro alcançado após o teste, no aspecto visual dos queijos (Figura 4) e no desvio dos dados experimentais em relação ao modelo matemático (Tabela 3), sugere-se que a melhor condição de temperatura e tempo para avaliar a capacidade de derretimento do queijo Prato seja 130 °C/10 minutos. Esta condição resultou em derretimento uniforme, um aparência plástica, sem abertura na superfície ou queima do produto.



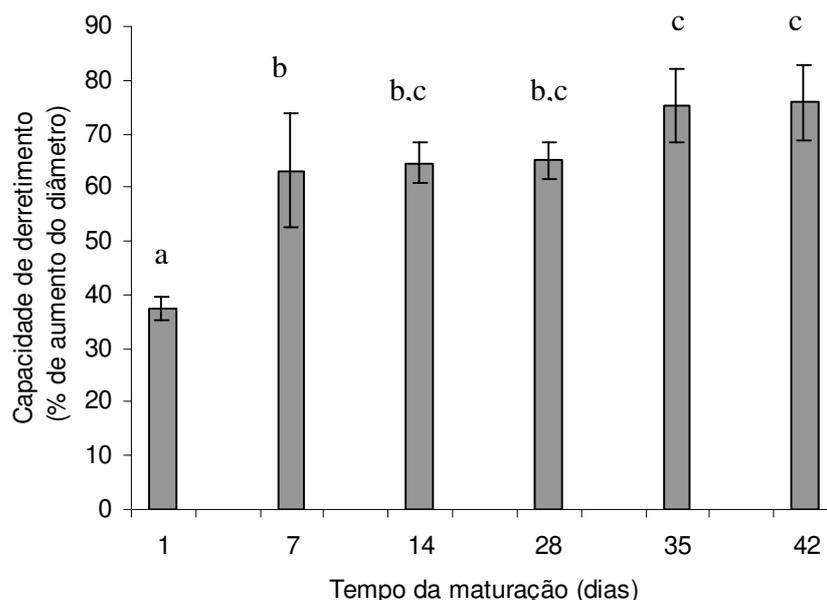
**Figura 4.** Aspecto visual do queijo Prato derretido em diferentes condições de tempo e temperatura (30 dias de maturação).

### **3.2. Avaliação da condição de teste definida para acompanhar o derretimento do queijo Prato durante a maturação**

A composição média ( $n=3$ ) dos queijos utilizados para avaliar a condição de teste definida ( $130\text{ °C}/10$  minutos) para acompanhar seu derretimento durante a maturação foi  $55,0 \pm 0,8\%$  de sólidos totais,  $22 \pm 1\%$  de proteína total,  $26 \pm 1\%$  de gordura,  $3,75 \pm 0,06\%$  de cinzas,  $1,4 \pm 0,1\%$  de sal e pH de  $5,21 \pm 0,06$ .

Os resultados indicaram que o teste de derretimento de Schreiber (Kosikowski, 1982), aplicado nas condições de tempo e temperatura pré-determinados, foi adequado para acompanhar a capacidade de derretimento do queijo Prato durante a maturação, a qual aumentou significativamente ( $p < 0,0001$ ) durante os primeiros sete dias de maturação (Figura 5). Após 28 dias de maturação, que é quando o queijo Prato deve estar sendo disponibilizado para o mercado consumidor após ter cumprido, segundo a legislação, 25 dias de maturação, sua capacidade de derretimento aumentou aproximadamente 42%. A

variação significativa na capacidade de derretimento do queijo Prato no início da maturação pode refletir a intensa proteólise da  $\alpha_{s1}$ -caseína, observada neste período para o queijo Prato (Schulz, 2003). A proteólise favorece a hidratação da matriz caseica (Lawrence *et al.*, 1987), melhorando a capacidade de derretimento do queijo.



**Figura 5.** Capacidade de derretimento do queijo Prato (n=3) durante o período de maturação.

#### 4. CONCLUSÃO

Através da análise de superfície de resposta e a utilização do método de Schreiber estabeleceu-se que a melhor condição de tempo e temperatura para obter o máximo derretimento do queijo Prato sem haver queima do produto foi de 130 °C/10 min. Esta condição mostrou-se adequada para acompanhar o perfil de derretimento do queijo durante todo o período de maturação, sem alterar negativamente a aparência do queijo.

A padronização de metodologia para avaliar o derretimento do queijo Prato favorece o desenvolvimento de estudos comparativos sobre o efeito da composição ou de variáveis do processo de fabricação do queijo sobre sua capacidade de derretimento.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ARNOTT, D. R.; MORRIS, H. A. & COMBS, W. B. Effects of certain chemical factors on the melting quality of process cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 40, n.8, p. 957 – 963, 1957.

ASSOCIATION OF OFFICAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16. Ed. 3, revision. Maryland: AOAC International, v1-2, 1997.

BALDINI, V. L. S. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação**. Dissertação (Doutor em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 1998, 208p.

BRITISH STANDARD INSTITUTION, Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). **Methods**. London:British Standards Institution, 1989. 12p.

CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, E.; VALDUGA A. T.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M. Characterization of Prato Cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: Evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, v. 13, n. 4 – 5, p. 329 – 336, 2002.

COCHAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental Designs**. 2<sup>a</sup> Ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons Inc, 1992. 611p.

FIFE, R. L.; McMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Functionality of low fat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n.11, p. 1903 – 1910, 1996.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. **Tecnologia de queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos.** São Paulo: Dipemar , 1994. 118p.

GUINEE, T. P.; HARRINGTON, D.; CORCORAN, M. O.; MULHOLLAND, E. O.; MULLINS, C. The compositional and functional properties of commercial Mozzarella, Cheddar and analogue pizza cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 2, p. 51 – 56, 2000.

KOSIKOWSKI, F. V. **Cheese and fermented milk foods**, 3<sup>rd</sup> ed. Ann Arbor MI: Edwards Bros., 1982. 620p.

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

McMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Influence of fat, moisture and salt on functional properties of Mozzarella Cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, p. 98-101, 1998.

OBERG, C. J.; WANG, A.; MOYES, L. V.; BROWN, R. J.; RICHARDSON, G. H. Effects of proteolytic activity of thermolactic cultures on physical properties of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 2, p. 389 – 397, 1991.

OLIVEIRA, J.S. **Queijo: fundamentos tecnológicos.** São Paulo: Ícone, 1986. 146p.

OLSON, N. F.; PRICE, W. V. A melting test for pasteurized process cheese spreads. **Journal of Dairy Science**, v. 41, n. 7, p. 999 – 1000, 1958.

RICHARDSON, G. H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products.** Washington: American Public Health Assoc, 1985. 412p.

SANCHEZ, V. A. A. G. **Evolução de ácidos graxos e do perfil da textura durante a maturação de Queijo Prato**. Dissertação (Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, USP, 2000, 116p.

SCHULZ, J. G. **Efeito da utilização de *slurry* sobre a maturação de queijo Prato**. Dissertação (Doutor em Tecnologia dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2003, 102p.

SPADOTI, L. M.; DORNELAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the melting of Prato cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Le Lait**, v. 83, n.5, p. 397 – 408, 2003.

WANG, H. H.; SUN, D. W. Evaluation of the functional properties of Cheddar cheese using a computer vision method. **Journal of Food Engineering**, v. 49, n.1, p. 49 – 53, 2001.

## **CAPÍTULO V**

### **EFEITO DO pH SOBRE O DERRETIMENTO E A FIRMEZA DO QUEIJO PRATO**

## **EFEITO DO pH SOBRE O DERRETIMENTO E A FIRMEZA DO QUEIJO PRATO**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do pH sobre a capacidade de derretimento e a firmeza do queijo Prato utilizando-se um método de alteração de pH pós-processamento. O queijo Prato foi fabricado de acordo com o processo tradicional, fatiado, dividido em três porções. A primeira porção foi exposta ao hidróxido de amônio para aumentar o pH; a segunda porção foi exposta ao ácido acético para baixar o pH; e a terceira porção serviu de controle e foi embalada a vácuo sem nenhum tratamento. Após 8 dias de armazenamento, amostras foram aleatoriamente escolhidas e avaliadas quanto à capacidade de derretimento e à firmeza. O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado com um único fator (pH). Os resultados indicaram que existe correlação linear positiva entre pH e a firmeza dos queijos e que não existe correlação linear entre pH e derretimento. Os resultados sugerem que o efeito do pH sobre a firmeza e o derretimento é dependente do conteúdo de cálcio solúvel e ligado à matriz protéica do queijo.

**Palavras-chave:** queijo Prato, pH, firmeza, capacidade de derretimento.

### **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the effect of pH on the melting properties and firmness of *Prato* cheese using a post-manufacture pH change method. Experimental *Prato* cheese was manufactured by the traditional manufacturing process, sliced and divided into 3 equal portions. The first portion was exposed to ammonium hydroxide to raise the pH; the second portion was exposed to acetic acid to lower the pH; and the third portion was used as control and vacuum packed without having been submitted to any treatment. After 8 days storage (i.e. ripening), randomly selected samples were evaluated for melting capacity and firmness. The experiment design was a completely randomized design with only one primary factor (pH). The results indicated that there is a

positive linear correlation between the pH value and firmness of the cheeses. No linear correlation could be established between pH and melting capacity. The results suggest that the effect of pH on firmness and melting ability depends on the level of soluble calcium bound to the protein matrix of the cheese.

**Key words:** *Prato* cheese, pH, firmness, melting capacity.

## 1. INTRODUÇÃO

As propriedades funcionais de derretimento e firmeza dos queijos são afetadas por fatores interdependentes como teor protéico e grau de hidrólise, relação cálcio total:cálcio solúvel, quantidade de gordura, umidade, sal e pH. Estes fatores variam de acordo com a variedade do queijo, condições de processamento, condições de maturação e ingredientes utilizados (Fox et al., 2000).

O pH pode ser destacado como um parâmetro essencial para a identidade e a qualidade dos queijos, pois afeta diretamente sua estrutura e suas propriedades reológicas, possivelmente, porque afeta as interações protéicas. Vários estudos (Kiely et al., 1992; Lawrence et al., 1987 e 1984; Ramkumar et al., 1997; Watkinson et al., 2001; Feeney et al., 2002; Guinee et al., 2002; Yazici & Dervisoglu, 2003) avaliaram o efeito do pH sobre as propriedades físico-químicas e funcionais dos queijos durante a fabricação e maturação. Entretanto, a alteração do pH durante a fabricação dos queijos afeta outros parâmetros químicos e enzimáticos produzindo resultados que se confundem com o efeito do pH.

Uma alternativa para se estudar o efeito independente do pH sobre as características dos queijos é alterar seu pH após a fabricação. Esta técnica foi primeiramente descrita por Noomen (1983), que aumentou o pH do queijo Meshanger expondo o coágulo ao vapor de amônio. Foi posteriormente modificada por Vassal et al. (1986) para estimular um gradiente de pH em queijo

Camembert e foi adaptada e expandida por Kindstedt et al. (2001), os quais utilizaram hidróxido de amônio e ácido acético para aumentar ou diminuir o pH do queijo Mussarela, respectivamente. Esta técnica de alteração de pH foi adaptada e utilizada por Almena-Aliste et al. (2002) para avaliar o efeito do pH sobre a firmeza do Cream cheese; por Gigante et al. (2001) para avaliar a capacidade de retenção de água de Cream cheese; por Cortez et al. (2003) e Monteiro (2004) para avaliar o efeito do pH sobre a firmeza e o derretimento da Mussarela e do Cream cheese, respectivamente.

Outra técnica de alteração de pH foi recentemente publicada por Pastorino et al. (2003). Neste caso, os autores alteraram o pH do queijo Cheddar através da injeção, sob alta pressão, de solução de gluco-delta-lactona.

Para os queijos Cheddar (Pastorino et al., 2003) e Mussarela (Cortez et al., 2003) a redução do pH foi acompanhada da diminuição da firmeza e do aumento da capacidade de derretimento. Estes comportamentos foram atribuídos pelos autores à solubilização do fosfato de cálcio coloidal dos agregados de caseína, que resultou em diminuição da interação protéica. A diminuição da firmeza e o aumento da capacidade de derretimento foram observadas para os queijos Cheddar com pH variando entre 5,0 e 5,3 e para o queijo Mussarela com pH variando entre 5,2 e 6,1.

No caso do queijo Cheddar o aumento do pH de 5,0 para 5,3 foi também acompanhada do aumento da umidade do produto que pode ter favorecido a redução da firmeza e o aumento do derretimento. No entanto, quando o pH foi reduzido de 5,0 para 4,7 não se observou diferença na firmeza do produto, possivelmente porque a aproximação do ponto isoelétrico favoreceu as interações proteína-proteína suplantando o efeito da solubilização do fosfato de cálcio coloidal sobre a firmeza do queijo (Pastorino et al, 2003).

No caso de *Cream cheese*, queijo obtido por coagulação ácida com pH inicial de 4,8, a variação do pH de 4,2 a 6,8 utilizando-se método de alteração do pH pós-processo, indicou existir uma correlação linear positiva ( $R^2=0,98$ ) entre o pH e a capacidade de derretimento e uma correlação negativa do tipo potência ( $R^2=0,95$ ) entre o pH e a firmeza do produto. Estes resultados sugerem que o

aumento do pH favoreceu as interações proteína-água (Monteiro, 2004). Em leite com o aumento do pH ocorre o aumento das cargas elétricas das proteínas à medida que as caseínas se distanciam do seu ponto isoelétrico, resultando em maior repulsão eletrostática e diminuição das interações proteína-proteína e, ao mesmo tempo, aumentando a hidratação da micela (Walstra, 1990).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do pH sobre a capacidade de derretimento e a firmeza do queijo Prato.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Fabricação do queijo Prato**

O queijo foi fabricado de acordo com o processo tradicional de queijo Prato (OLIVEIRA, 1986) utilizando-se leite tratado termicamente (68 °C/2 minutos), resfriado a 32 °C, adicionado de cultura láctica tipo “O” (GEMACOM, Ferm-Star MO 0,40, composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, produzido por Caglio Star S.p.A - Itália), cloreto de cálcio 50% (0,5 mL/kg de leite), corante urucum (0,08 mL/kg de leite) e coalho (coalho Bela Vista – em pó de vitelo) em quantidade suficiente para coagular em 35 minutos. Após a coagulação, o gel foi cortado e a mistura soro/coágulo foi agitada por 20 minutos antes da primeira dessoragem, que consistiu em retirar 30% do soro, em relação ao volume inicial de leite. Para lavagem e cozimento da massa adicionou-se lentamente 15% de água (80 °C) em relação ao volume inicial de leite. A temperatura da mistura soro/coágulo foi aumentada 1 °C a cada 3 minutos até que se atingisse 40 °C. Após se atingir o ponto de massa, procedeu-se à segunda dessoragem, a enformagem, e à prensagem progressiva dos queijos por aproximadamente 5 horas. Os queijos foram salgados por 12 horas em salmoura com 20% de sal a  $4 \pm 1$  °C, foram secos por 24 horas ( $4 \pm 1$ ) °C, e utilizados para a alteração de pH.

### **2.2. Composição do leite e do queijo**

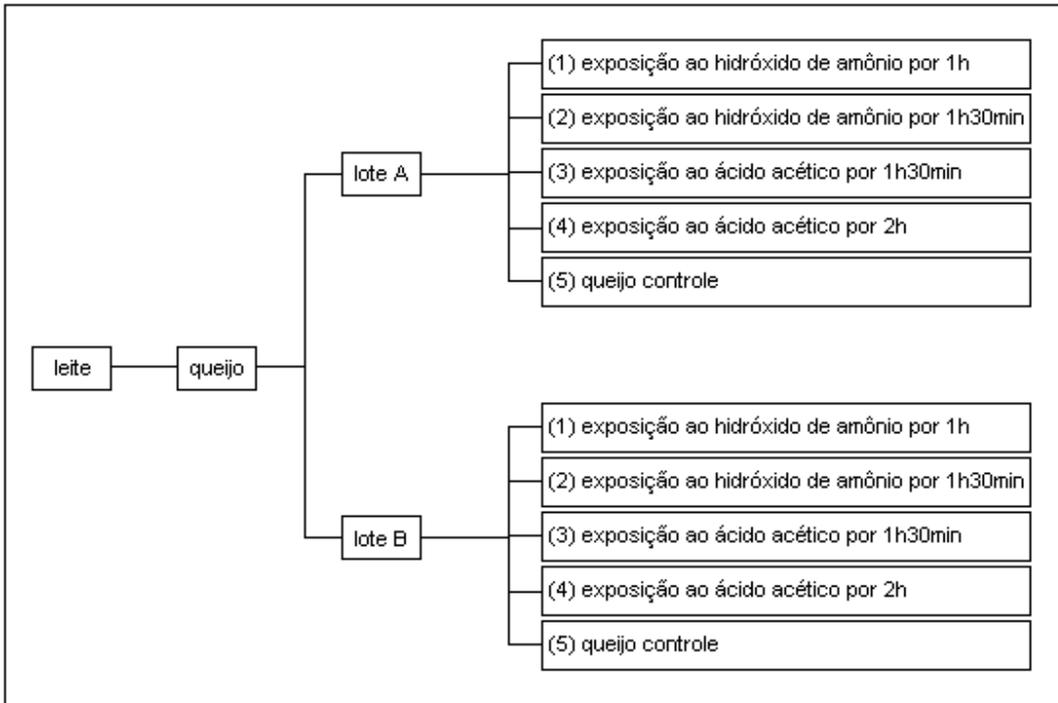
Todas as análises foram realizadas em triplicata. O leite utilizado em cada processamento foi avaliado quanto ao pH, sólidos totais, acidez, cinzas e nitrogênio total pelo método micro-Kjeldahl conforme metodologias descritas pela AOAC (1997). O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber (British Standard Institution, 1989).

No dia seguinte à fabricação os queijos foram avaliados quanto ao pH, acidez, sólidos totais, cinzas e nitrogênio total, conforme metodologias descritas pela AOAC (1997). O teor de proteína foi obtido multiplicando-se o nitrogênio por 6,38. O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber (British Standard Institution, 1989) e sal pelo método de Volhard (Richardson, 1985).

### **2.3. Alteração do pH dos queijos**

#### **2.3.1. Experimentos exploratórios**

Para realização dos experimentos exploratórios fabricou-se o queijo Prato segundo metodologia anteriormente descrita. Os queijos foram divididos em dois lotes (A e B) e a alteração do pH foi realizada seguindo metodologia descrita por Kindstedt et al. (2001), com modificação. No dia seguinte à fabricação, os queijos de cada lote foram cortados transversalmente em 3 fatias de 3 cm de altura, desprezando-se as 2 extremidades. Todas as fatias obtidas constituíram uma amostra homogênea que foi posteriormente dividida em 5 porções, que foram submetidas aos seguintes tratamentos: (1) exposição ao hidróxido de amônio por 1 hora, para aumentar o pH; (2) exposição ao hidróxido de amônio por 1 hora e 30 minutos; (3) exposição ao ácido acético por 1 hora e 30 minutos para diminuir o pH; (4) exposição ao ácido acético por 2 horas; (5) e queijo controle (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema da divisão do lote para realização dos experimentos.

Para a alteração do pH, as fatias de queijos foram dispostas duas a duas, em posições alternadas, nas três prateleiras superiores do dessecador dotado de sistema de ventilação (Figura 2). Na prateleira inferior foram dispostas placas de Petri contendo 400 ml de ácido acético para diminuir o pH ou 100 ml de hidróxido de amônio para aumentá-lo. A troca de pH foi realizada a temperatura ambiente com o dessecador dentro de capela. Decorrido o tempo de exposição estipulado, as fatias foram imediatamente retiradas do dessecador, embaladas individualmente a vácuo e armazenadas a  $(12 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . As amostras controle foram embaladas a vácuo e armazenadas na mesma temperatura após o fatiamento.



**Figura 2.** Dessecador com amostras dispostas para alteração de pH.

A avaliação do pH foi feita após 2, 5, 8, 11 e 14 dias dos queijos terem sido submetidos aos tratamentos. Para cada um dos lotes, uma fatia de cada tratamento foi aleatoriamente escolhida e com o auxílio de uma sonda de 20 mm de diâmetro, retirou-se 3 cilindros de cada fatia, que foram cortados em três partes de tamanho semelhantes. Para a medida do pH, cada uma dessas partes foi protegida por um filme plástico para facilitar a introdução do eletrodo na amostra (Figura 3).



**Figura 3.** Preparo da amostra e medição de pH de uma parte do cilindro.

O pH foi considerado uniforme quando os 3 cilindros retirados de uma mesma fatia apresentaram o menor desvio de pH entre os cilindros e entre as partes do mesmo cilindro.

### **2.3.2. Alteração do pH do queijo para avaliação de firmeza e derretimento**

A alteração do pH do queijo para avaliar a firmeza e o derretimento foi realizada segundo metodologia descrita por Kindstedt et al. (2001), com as condições definidas nos experimentos exploratórios.

No dia seguinte à fabricação (tempo zero), os queijos foram cortados transversalmente em fatias constituindo uma amostra homogênea que foi posteriormente dividida em três porções. A primeira porção foi exposta ao hidróxido de amônio por 1 hora, para aumentar o pH; a segunda porção foi exposta por 1 hora e 30 minutos, ao ácido acético para abaixar o pH; a terceira porção serviu de controle e foi embalada a vácuo sem nenhum tratamento.

As condições para a troca do pH foram as mesmas utilizadas nos experimentos exploratórios.

Imediatamente após os tratamentos as fatias foram embaladas à vácuo individualmente e armazenadas a  $(12 \pm 1)$  °C. Após 8 dias de armazenamento, tempo este avaliado nos experimentos exploratórios como necessário para uniformizar o pH nas fatias, amostras foram aleatoriamente escolhidas e avaliadas quanto à capacidade de derretimento e a firmeza.

### **2.4. Avaliação da capacidade de derretimento dos queijos**

A capacidade de derretimento do queijo Prato foi determinada pelo método de Schreiber's descrito por Kosikowski (1982) e adaptado para queijo Prato.

Foram utilizadas duas fatias de queijo de cada tratamento. De cada fatia foi retirada uma amostra cilíndrica, com o auxílio de uma sonda de 34 mm de diâmetro. Com um cortador de ovo modificado, esse cilindro foi cortado em discos de 5 mm de espessura. De cada amostra foram separados dois discos centrais, eliminando-se as extremidades. Os discos foram colocados no centro de placas de Petri, divididas ao longo dos diâmetros em 8 partes iguais. As placas foram

tampadas, deixadas à temperatura ambiente por 1 hora e levadas à estufa com circulação de ar e mantidas a 130 °C/10 minutos. Após o derretimento, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, os diâmetros finais foram medidos. A partir das médias dos diâmetros finais e considerando-se o valor de 34 mm para o diâmetro inicial, calculou-se a porcentagem de aumento do diâmetro, que expressou a capacidade de derretimento do queijo. As determinações foram feitas em quadruplicata.

## **2.5. Avaliação da firmeza**

A firmeza do queijo Prato foi avaliada utilizando-se o texturômetro TA-XT2 Stable Micro Systems. Foram utilizadas 2 fatias de queijo de cada tratamento. De cada fatia foram retiradas 4 amostras cilíndricas com auxílio de uma sonda de 2,0 cm de diâmetro. Os cilindros foram padronizados, com 2,0 cm de diâmetro e 2,4 cm de altura, eliminando-se as extremidades. As amostras cilíndricas foram envolvidas em filme plástico para evitar a perda de umidade e mantidas a 10 °C em banho-Maria até o momento da determinação. Para avaliar a força máxima necessária para compressão da amostra em 40% utilizou-se probe cilindro metálico de 5,0 cm de diâmetro. Foram feitas 8 determinações para cada amostra.

## **2.6. Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado com um único fator (pH). O experimento completo foi repetido 3 vezes. Os resultados foram avaliados por teste de correlação de Pearson, com 5% de significância, associando-se o pH à firmeza e derretimento (Sincich, 1996).

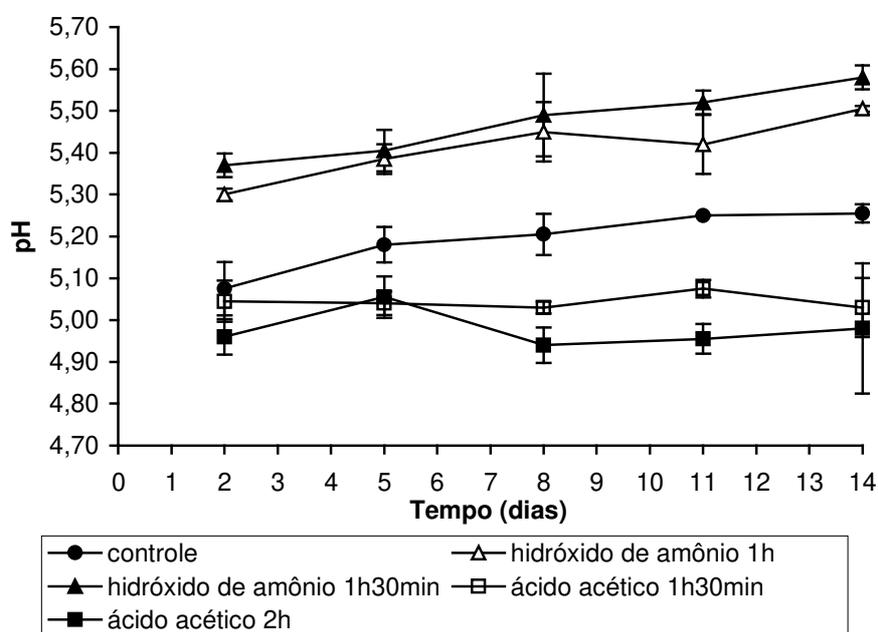
# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1. Experimentos exploratórios**

A composição média dos leites utilizados nos experimentos exploratórios foi de 11,43% de sólidos totais, 3,43% de gordura, 2,98% de proteína e 0,71% de

cinzas. O pH e a acidez foram respectivamente 6,67 e 15,2 °D. Os queijos obtidos apresentaram composição característica de queijo Prato, contendo 56,50% de sólidos totais, 28,30% de gordura, 23,00% de proteína total, 3,62% de cinzas e 1,58% de sal. O pH do queijo foi de 5,13.

Observa-se na Figura 4, que apresenta o comportamento do pH nas fatias para cada tratamento, que após 8 dias houve uma definição de comportamento do pH frente aos diferentes tratamentos. O pH dos queijos expostos ao hidróxido de amônio por 1 h e 1 h e 30 minutos apresentaram variação de 0,20 e 0,28 unidades de pH, respectivamente, quando comparado ao queijo controle. O pH dos queijos expostos ao ácido acético por 1h e 30 minutos e 2 h apresentaram variação de 0,18 e 0,27 unidades de pH, respectivamente. Este comportamento de variação se manteve ao longo do tempo depois do 8º dia de alteração do pH, indicando que se alcançou a estabilidade do pH na fatia. Os resultados completos do acompanhamento do pH ao longo do tempo em cada cilindro e em cada parte dos cilindros, são apresentados no Anexo I, nas Figuras 1 a 10.



**Figura 4.** Comportamento do pH das fatias de queijo ao longo do tempo, para cada tratamento. Média dos lotes A e B.

Com base nos resultados obtidos, os tempos escolhidos para a alteração de pH na próxima fase do trabalho foram de 1 hora de exposição a hidróxido de amônio e 1 hora e 30 minutos de exposição ao ácido acético pra aumentar e diminuir o pH, respectivamente. Utilizando estes tempos, estabeleceu-se uma variação de pH dentro da faixa típica para o queijo Prato.

### 3.2. Composição físico-química do leite e do queijo para avaliação de firmeza e derretimento

A composição média do leite utilizado nos três processamentos foi  $11,7 \pm 0,3\%$  de sólidos totais,  $3,3 \pm 0,3\%$  de gordura,  $3,00 \pm 0,09\%$  de proteína e  $0,74 \pm 0,03\%$  de cinzas. O pH e a acidez foram, respectivamente,  $6,68 \pm 0,04$  e  $18,6 \pm 0,6$  °D. Os queijos obtidos (Tabela 1) apresentaram composição característica para queijo Prato e semelhante à obtida por Spadoti et al. (2004 e 2003) e Chicoscki et al. (2002).

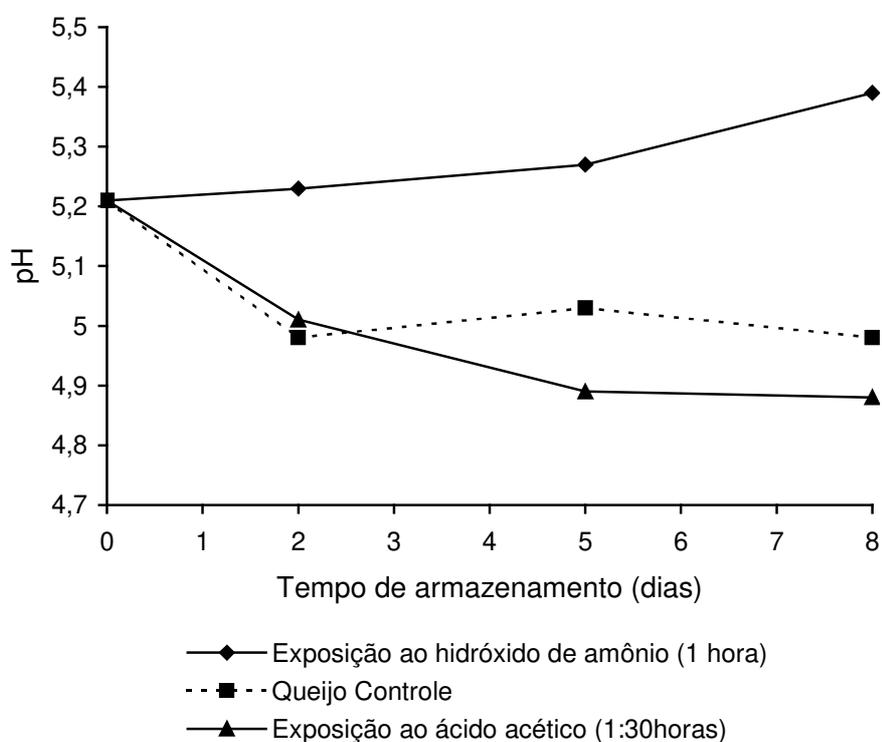
**Tabela 1.** Composição média (n=3) do queijo Prato

Determinações	Valor mais provável
pH	$5,21 \pm 0,06$
Sólidos Totais (%)	$55,0 \pm 0,8$
Gordura (%)	$26 \pm 1$
Proteína total (%)	$22 \pm 1$
Cinzas (%)	$3,75 \pm 0,06$
Sal (%)	$1,4 \pm 0,1$
Sal na Umidade (%)	$3,2 \pm 0,2$

### 3.3. Efeito da alteração do pH

Após a fabricação (tempo zero), os queijos apresentaram pH de  $5,21 \pm 0,06$  (Tabela1). Os tratamentos com hidróxido de amônio ou ácido acético aumentaram e diminuíram o pH, respectivamente. Entretanto, observou-se na Figura 5 que a amostra controle, a despeito de ter sido somente embalada a vácuo, sofreu redução do pH em 24 horas. Esta variação é natural no início da maturação, e é decorrente da ação da cultura láctica adicionada no processo de fabricação sobre a

lactose. Oito dias após os tratamentos, os queijos expostos à atmosfera de hidróxido de amônio e ácido acético apresentaram uma diferença de 0,40 e 0,10 unidades de pH, respectivamente, quando comparados à amostra controle. Embora estes valores representem a média de 3 experimentos, observa-se que a variação do pH se deu numa faixa diferente da observada nos experimentos exploratórios. Entretanto observa-se na Figura 5 que a pequena diferença entre o pH do queijo submetido à exposição ao ácido acético e do queijo controle deveu-se, principalmente, ao contínuo decréscimo do pH do queijo controle e não à falta de variação do pH do queijo submetido ao tratamento.



**Figura 5.** pH do queijo após a fabricação (tempo zero) e ao longo do tempo após os tratamentos.

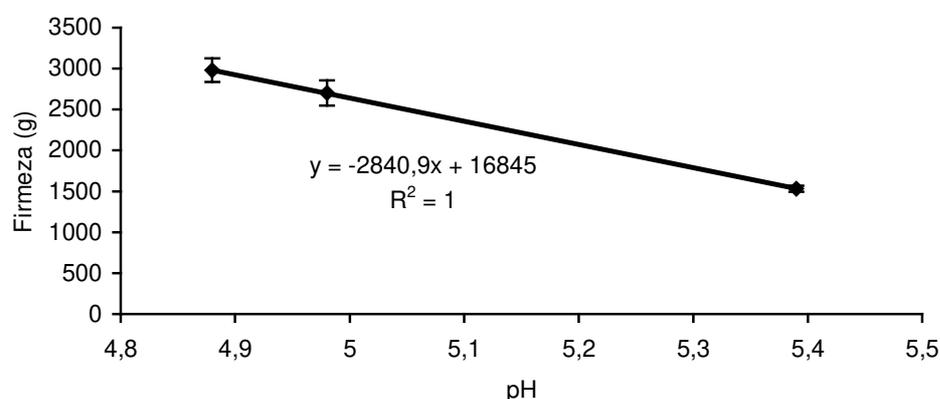
### 3.4. Efeito do pH sobre a firmeza e derretimento.

Os resultados indicaram que existiu associação significativa entre pH e a firmeza (Tabela 2). Observa-se na Figura 6 a existência de correlação linear

positiva ( $R^2 = 1$ ) entre pH e a firmeza dos queijos. Mesmo com a pequena variação do pH, quando se compara a amostra controle (pH 4,98) e a submetida ao tratamento com ácido acético (pH 4,88), o efeito sobre a firmeza pode ser claramente observado.

**TABELA 2.** Correlação de Pearson entre pH e firmeza e derretimento.

		<b>Firmeza</b>	<b>Derretimento</b>
pH	Correlação	-0,818	0,336
	p-valor	0,007	0,376



**Figura 6.** Influência do pH sobre a firmeza do queijo Prato.

No leite, o abaixamento do pH é acompanhado pela dissociação do cálcio da micela de caseína. Assim como no leite, no queijo o cálcio é encontrado nas formas solúvel e insolúvel. O cálcio solúvel não contribui para a estrutura do queijo, enquanto o cálcio coloidal insolúvel, associado à matriz caseica, é seu elemento de ligação e contribui para a estrutura do queijo (Fox et al., 2000). Estudos de alteração do pH do queijo pós-processamento têm demonstrado que a variação do pH altera o equilíbrio do cálcio entre a matriz protéica e a fase aquosa do queijo. Quando o pH do queijo Cheddar variou de 5,3 para 4,7 o teor de cálcio solúvel, como porcentagem do cálcio total, aumentou de 45 para 75% e a firmeza do queijo diminuiu (Pastorino et al., 2003). Quando o pH do queijo Mussarela foi

alterado pós processamento e variou numa faixa de 7,0 para 4,7, o teor de cálcio solúvel, como porcentagem do cálcio total, aumentou de 20 para 80% (Kindstedt et al., 2001). Além disso, o aumento do pH do queijo Mussarela foi acompanhado pelo aumento da firmeza do produto (Cortez et al., 2003).

O efeito da alteração do pH pós-processamento no queijo Prato resultou no comportamento inverso frente à firmeza, quando comparado com os queijos Cheddar e Mussarela. O pH do queijo durante o processo de fabricação influencia as características estrutural e funcional do queijo, uma vez que define grandemente a relação entre caseína e cálcio no produto (Lawrence et al., 1987). No caso dos queijos Cheddar e Mussarela o processo de fabricação inclui o abaixamento do pH da massa, geralmente até 5,2, o que é acompanhado pelo decréscimo do conteúdo de cálcio. No processo de fabricação do queijo Prato o soro é drenado quando o pH encontra-se na faixa de 6,1-6,3. Isto implica num conteúdo do cálcio diferente nestes queijos. Segundo Renner (1999), os queijos Mussarela e Cheddar apresentam 400 e 760 mg de Ca/100 g de queijo, respectivamente, enquanto no queijo Prato este teor é de aproximadamente 1.435 mg Ca/100 g de queijo (Cichoski, 2002). Esta diferença afeta, possivelmente, a forma de organização da matriz protéica e o conteúdo de cálcio na fase aquosa do queijo. A variação da firmeza do queijo frente ao aumento do pH pode ser influenciada por dois fatores principalmente: 1) pela migração do cálcio da fase aquosa para a matriz protéica, o que possivelmente favoreceria o aumento da firmeza; 2) pelo aumento das cargas elétricas das proteínas, resultando em maior repulsão eletrostática, diminuindo as interações proteína-proteína e favorecendo a interação proteína-água, o que poderia resultar em diminuição da firmeza. O aumento do pH pós-processamento afeta de forma diferente a firmeza dos queijos Cheddar, Mussarela e Prato. Possivelmente, nos queijos Cheddar e Mussarela, nos quais se observou aumento de firmeza com aumento do pH, o efeito da migração do cálcio para a matriz protéica tenha suplantado o efeito da interação proteína-água. No caso do queijo Prato, no qual se observou redução da firmeza com o aumento do pH, é possível que o efeito da interação proteína-água tenha suplantado o efeito da migração do cálcio para a matriz protéica.

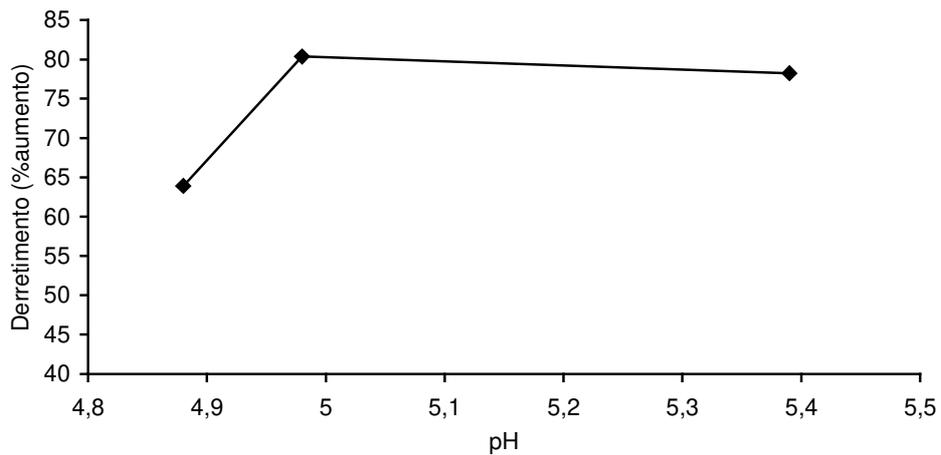
Os resultados sugerem que o efeito do pH sobre a firmeza é dependente do conteúdo de cálcio solúvel e ligado à matriz protéica do queijo, o qual é definido pelo processo de fabricação. Esta hipótese é suportada pela diminuição da firmeza do Cream cheese frente ao aumento do pH (Almena-Aliste, 2002; Monteiro, 2003), assim como observado para o queijo Prato. Neste caso, num queijo obtido por coagulação ácida e com conteúdo médio de 80 mg Ca/100 g de queijo (Renner, 1999), a firmeza foi influenciada principalmente pelo aumento da interação proteína-água e não pela migração do cálcio para a matriz protéica.

Os resultados indicaram que não existe uma relação linear entre pH e derretimento (Tabela 2; Figura 7). Para o queijo controle (pH 4,98) a porcentagem de aumento do diâmetro após teste de derretimento (130 °C/10 minutos) foi  $80,39 \pm 11,82\%$ . Para os queijos com alto (pH 5,39) e baixo pH (4,88), estes valores foram, respectivamente,  $78,25 \pm 7,91\%$  e  $63,91 \pm 28,19\%$ . A alteração do pH para valores acima ou abaixo do pH do queijo controle (pH 4,98) implicou em diminuição da capacidade de derretimento, sendo que a maior perda se deu quando o pH foi reduzido de 4,98 para 4,88. Os autores Kindstedt et al. (2001) e Pastorino et al. (2003) têm demonstrado, utilizando o método de alteração de pH pós processamento, que o pH próximo de 5,0 é um ponto máximo de derretimento e que o queijo perde a capacidade de derretimento, especialmente no pH abaixo de 5,0.

De acordo com Pastorino et al. (2003), o efeito do pH no derretimento do queijo está relacionado com as interações protéicas. Quando o pH do queijo Cheddar foi diminuído ou aumentado de 5,0 houve redução no derretimento. Segundo os autores, o cálcio promove interação entre as proteínas e, a sua solubilização, que pode ocorrer na diminuição do pH de 5,3 para 5,0, diminui esta interação facilitando o derretimento. O decréscimo do pH de 5,0 para 4,7, também resultou em diminuição do derretimento, pois as caseínas se aproximaram do seu ponto isoelétrico favorecendo a interação proteína-proteína, suplantando o efeito da solubilização do cálcio.

Segundo Kindstedt et al. (2001) o comportamento frente ao derretimento está associado ao equilíbrio entre o cálcio solúvel e insolúvel no queijo. No pH

menor que 5,0 a quantidade de cálcio solúvel em água aumenta rapidamente, o que pode contribuir para a maior perda da capacidade de derretimento. Por outro lado, o gradual crescimento na quantidade de cálcio solúvel com o aumento do pH (acima de 5,0) contribui para a diminuição do derretimento pelo aumento da quantidade de cálcio disponível para promover ligações cruzadas na matriz caseica.



**Figura 7.** Influência do pH sobre a firmeza do queijo Prato.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMENA-ALISTE, M.; GIGANTE, M. L.; KINDSTEDT, P. S. Reversibility of pH-induced changes in the texture and serum phase of cultured cream cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83 (supl. 1): 1019 (abst), 2002.

ASSOCIATION OF OFFICAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16. Ed. 3, revision. Maryland: AOAC Internatinal, v1-2, 1997.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). **Methods**. London: British Standards Institution, 1989. 12p.

CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, E.; VALDUGA, A. T.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M. Characterization of Prato cheese, a brasilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, v. 13, n.4/5, p. 329-336, 2002.

CORTEZ, M. A. S.; FURTADO, M. M.; GIGANTE, M. L.; KINDSTEDT, P. S. Impact of pH during aging on proteolysis, texture and melting characteristics of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86 (Supl. 1): 42, 2003.

FEENEY, E. P.; GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.7, p. 1646-1654, 2002.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Maryland: An Aspen Publication, 2000. 587p.

GIGANTE, M. L.; ALMENA-ALISTE, M.; KINDSTEDT, P. S. Application of a model system to study of pH on the serum phase of cultured cream cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 84 (Supl. 1):436 (abst.), 2001.

GUINEE, T. P.; FEENEY, E. P.; AUTY, M. A. E.; FOX, P. F. Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p. 1655-1669, 2002.

KIELY, L. J.; KINDSTEDT, P. S.; HENDRICKS, G. M.; LEVIS, J. E.; YUN, J. J.; BARBANO, D. M. Effect of draw pH on the development of curd structure during

the manufacture of Mozzarella cheese. **Food Structure**, v.11, n.3, p. 217-224, 1992.

KINDSTEDT, P.S.; ZIELINSKI, A.; ALMENA-ALISTE, M.; GE, C. A post-manufacture method to evaluate the effect of pH mozzarella cheese characteristics. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.56, n. 3, p. 14-19, 2001.

KOSIKOWSKI, F. V. **Cheese and fermented milk foods**, 3<sup>rd</sup> ed. Ann Arbor MI: Edwards Bros., 1982. 620p.

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

LAWRENCE, R. C.; HEAP, H. A.; GILLES, J. A controlled approach to cheese technology. **Journal of Dairy Science**, vol. 67, n. 8, p. 1632-1645, 1984.

MONTEIRO, R. R. **Efeito do pH sobre as características físico-químicas do Cream cheese**. Campinas, 2004, 126 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

NOOMEN, A. The role of the surface flora in the softening of cheeses with a low initial pH. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, v. 37, n.4, p. 229-232, 1983.

OLIVEIRA, J.S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Ícone, 1986. 146p.

PASTORINO, A. J.; HANSEN, C. L.; McMAHON, D.J. Effect of pH on the chemical composition and structure-functional relationships of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v.86, n. 9, p.2751-2760, 2003.

RAMKUMAR, C.; CREAMER, L. K.; JOHSTON, K. A.; BENNETT, R. J. Effect of pH and time on the quantity of readily available water within fresh cheese curd. **Journal of Dairy Research**, v. 64, n.1, p. 123-134, 1997.

RENNER, E. Nutritional aspects of cheese. In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, 2a Edição, v. 1, cap, 15, p. 557-579, Editora Aspen Publishers, Inc., 1999.

RICHARDSON, G. H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products**. Washington: American Publ. Health Assoc, 1985. 412p.

SINCICH, T. **Business statistics by example**, 4th ed.,Upper Saddle River: Prentice-Hall. 1996. 1259p.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the microstructure of Prato type cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Milchwissenschaft**, v. 59, n. (3/4), p. 151-155, 2004.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the melting of Prato cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Le Lait**, v. 83, n.5, p.397-408, 2003.

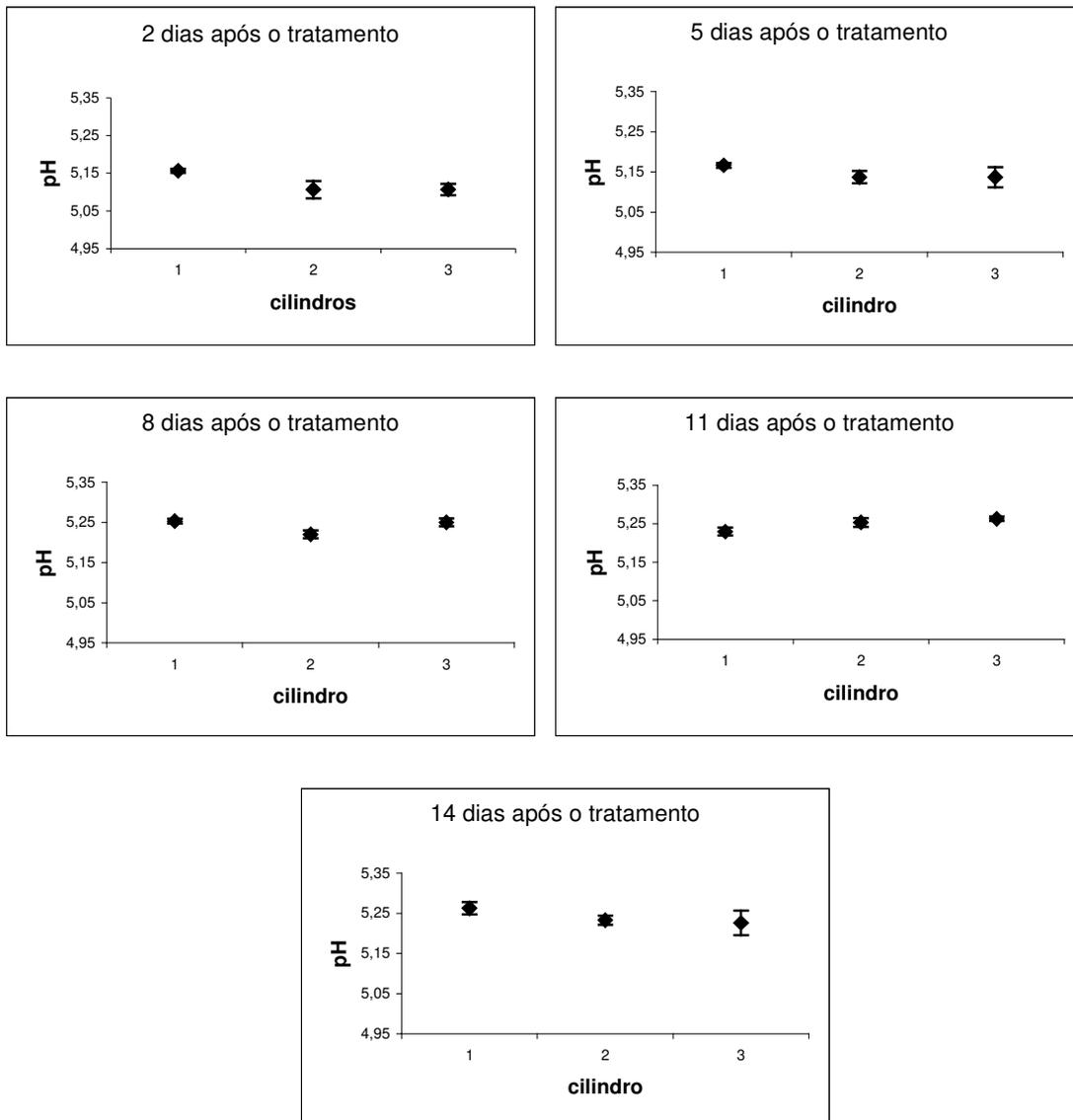
VASSAL, L.; MONNET, V.; LE BARS, D.; ROUX, C.; GRIPON, I. J. Relation entre le pH, la composition chimique et la texture des fromages de type camembert. **Lait**, v.66, n.4, 341-351, 1986.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

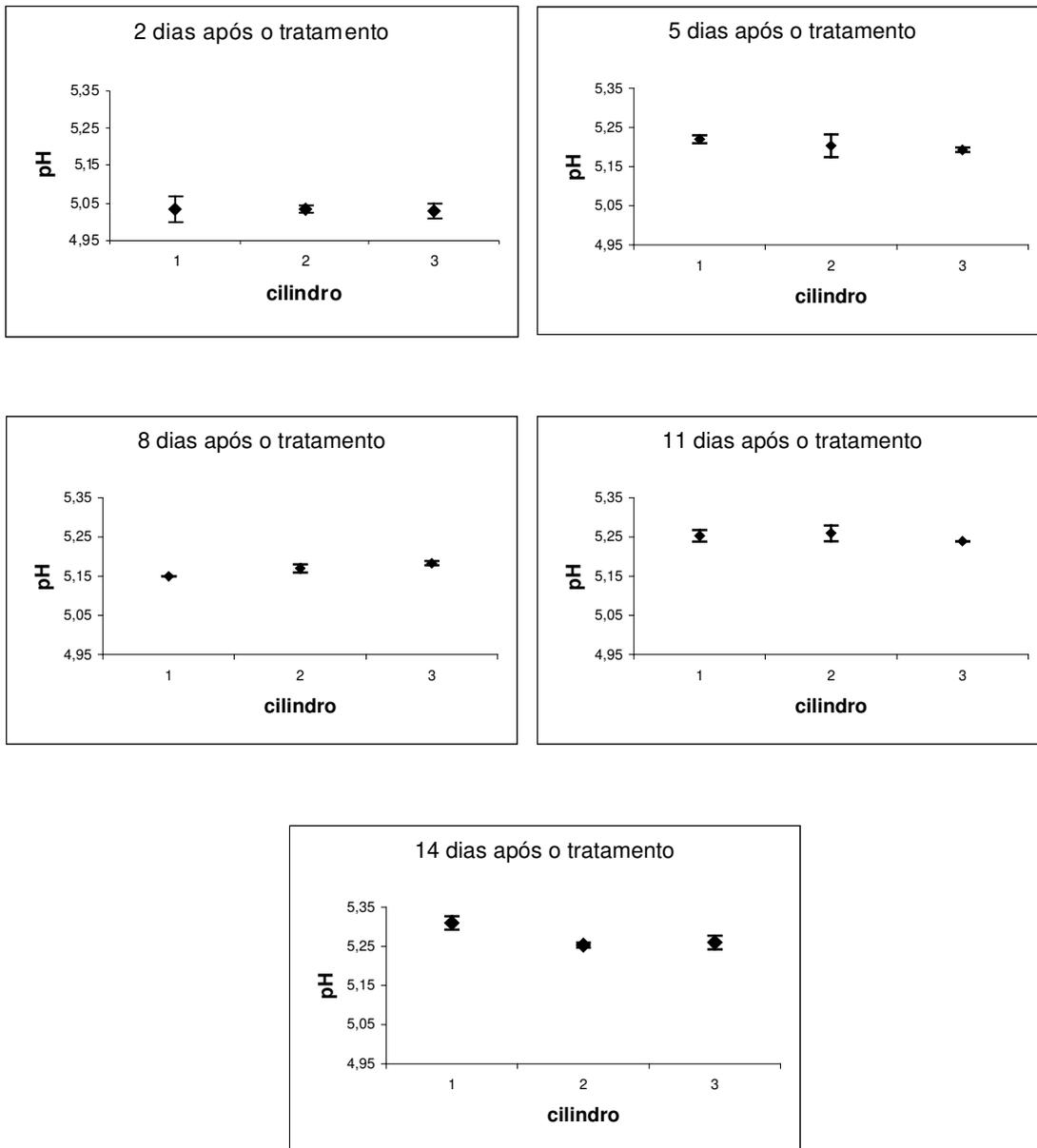
WATKINSON, P.; COKER, C.; CRAWFORD, R.; CRAIG, D.; JOHNSTON, K.; MCKENNA, A.; WHITE, N. Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. **International Dairy Journal**, v.11, n.4-7, p. 455-464, 2001.

YAZICI, F.; DERVISOGLU, M. Effect of pH adjustment on some chemical, biochemical, and sensory properties of Civil cheese during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 4, p. 361-369, 2003.

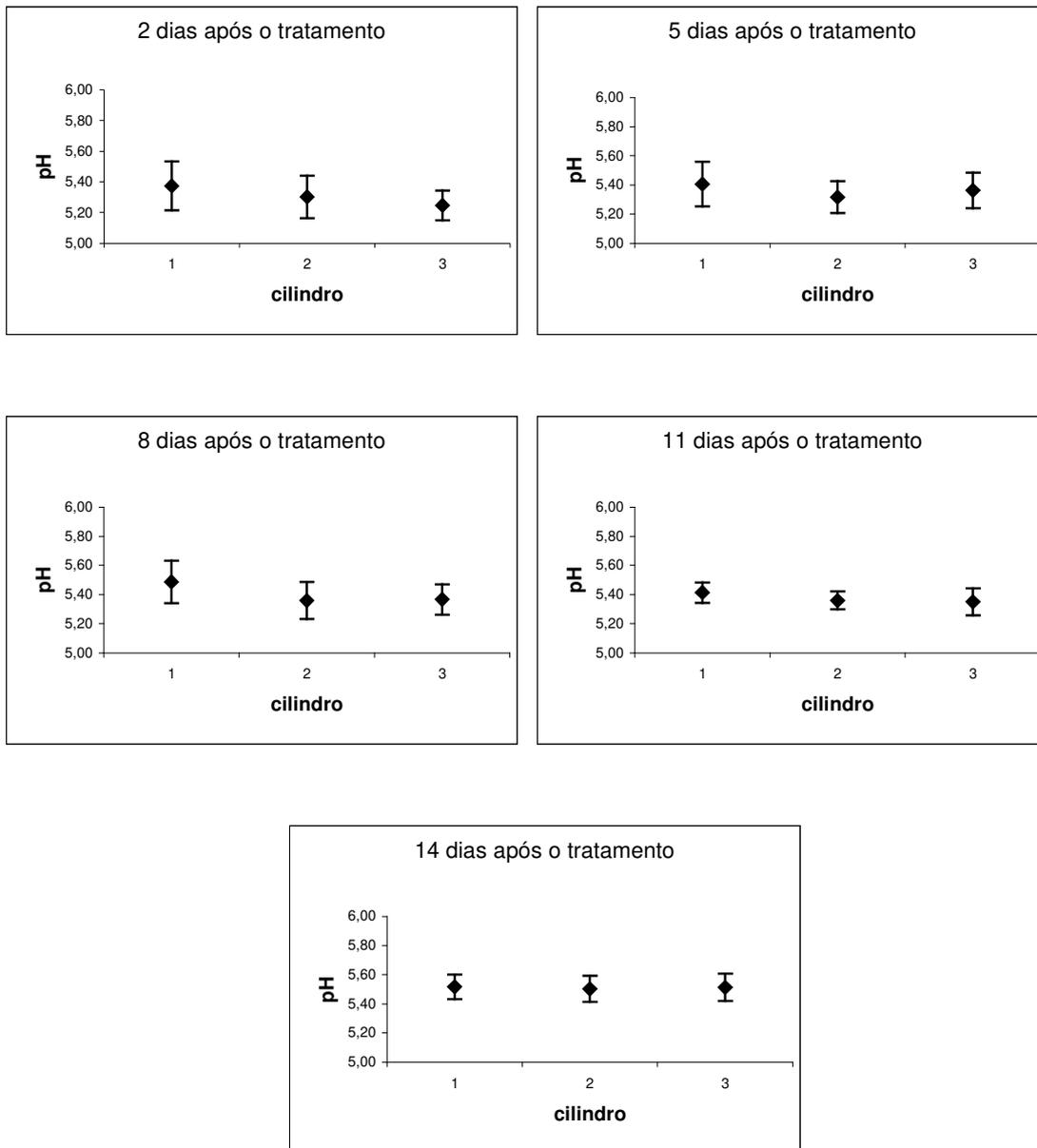
## **ANEXO I**



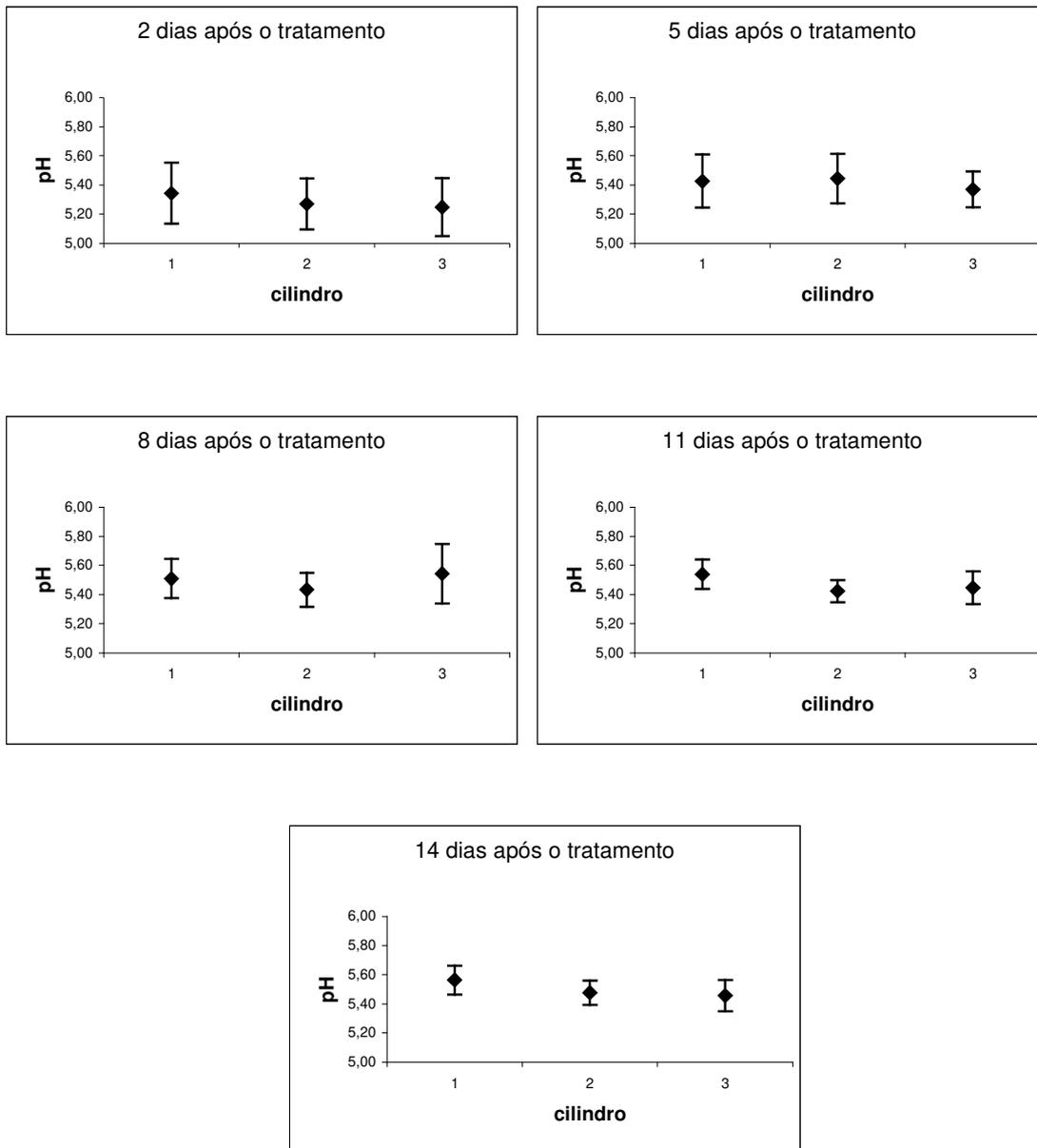
**Figura 1.** Comportamento do pH ao longo do tempo nos cilindros do queijo controle. Lote A.



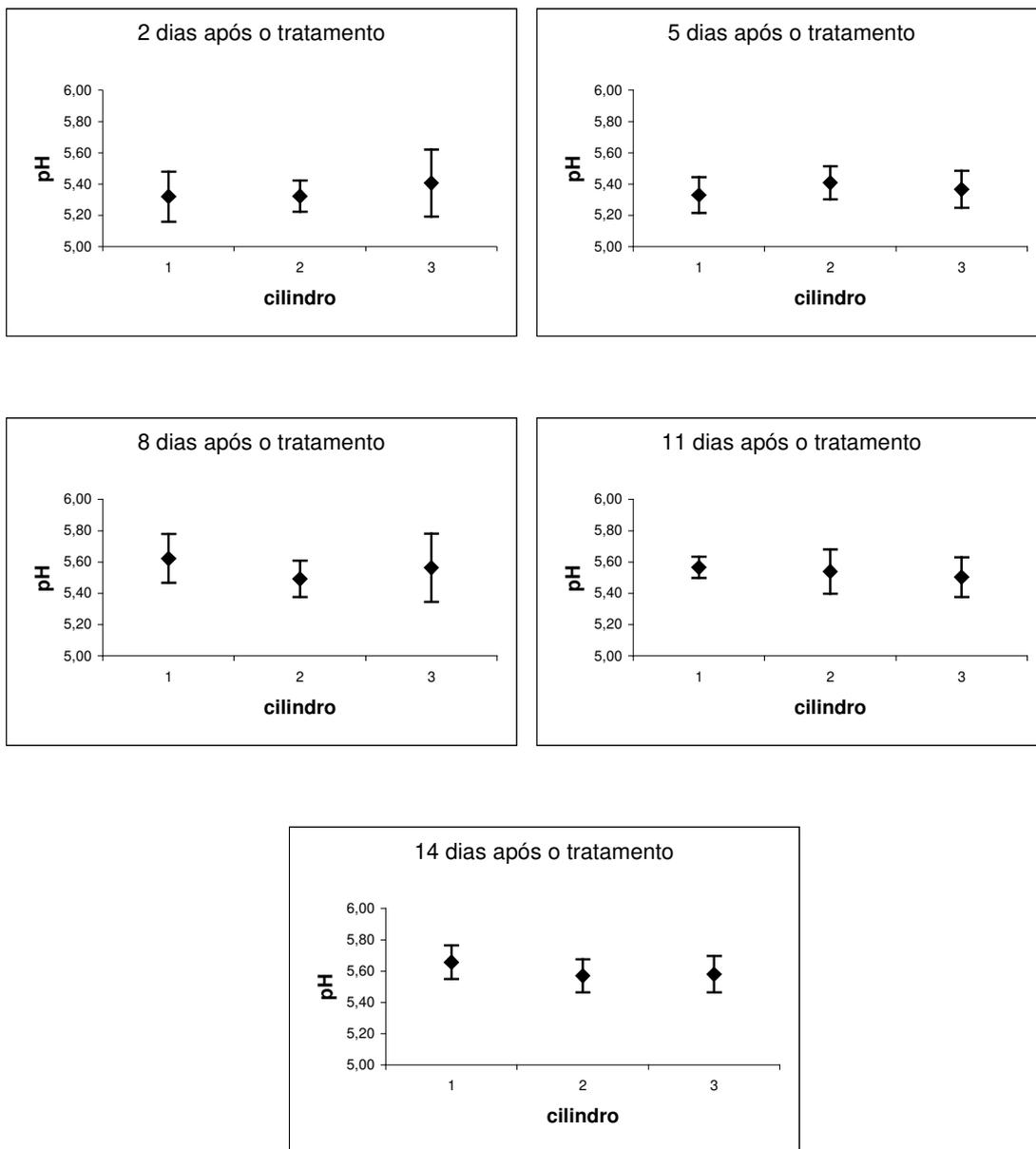
**Figura 2.** Comportamento do pH ao longo do tempo nos cilindros do queijo controle. Lote B.



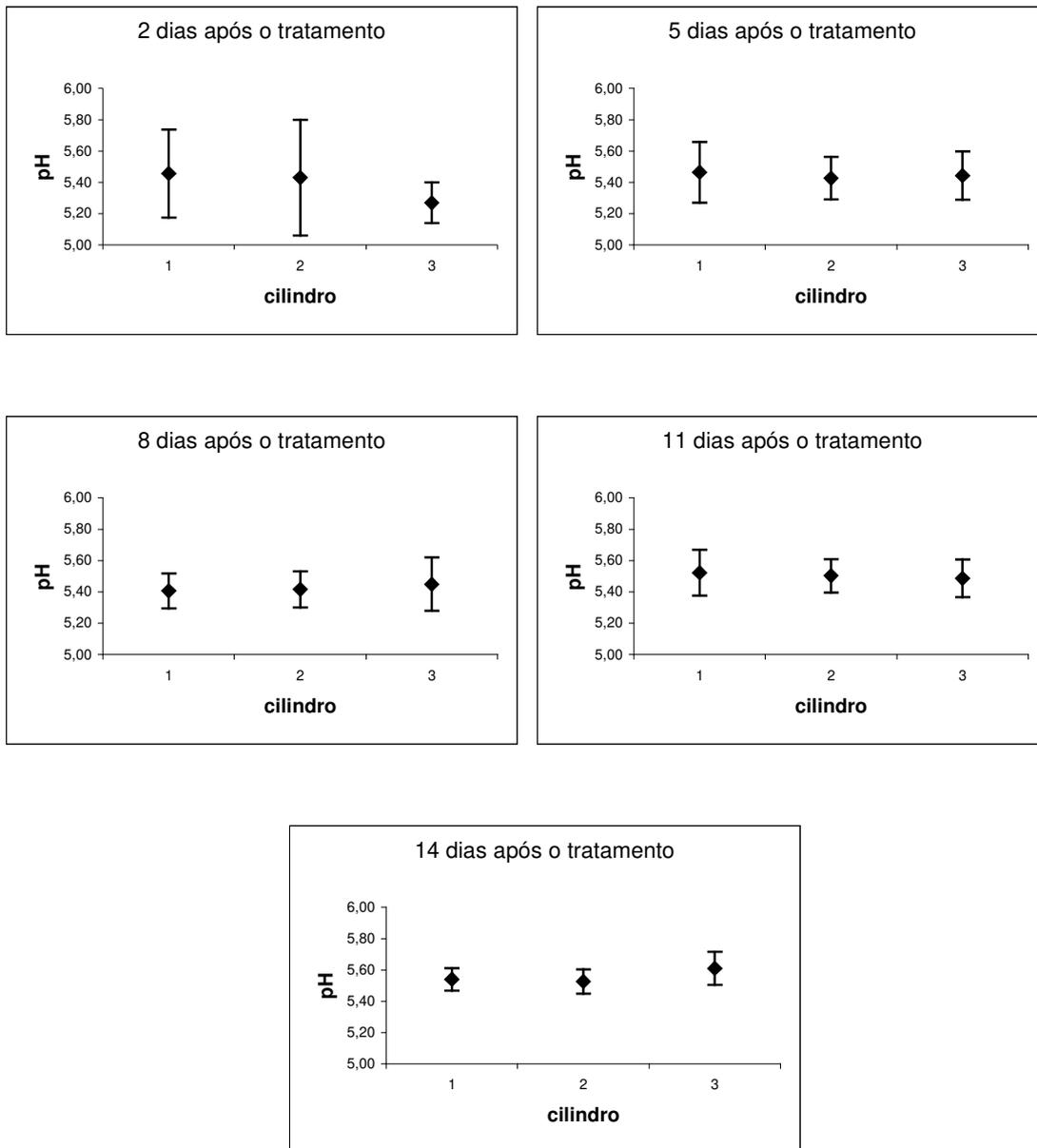
**Figura 3.** Comportamento do pH ao longo do tempo nos cilindros dos queijos expostos ao hidróxido de amônio por 1 hora. Lote A.



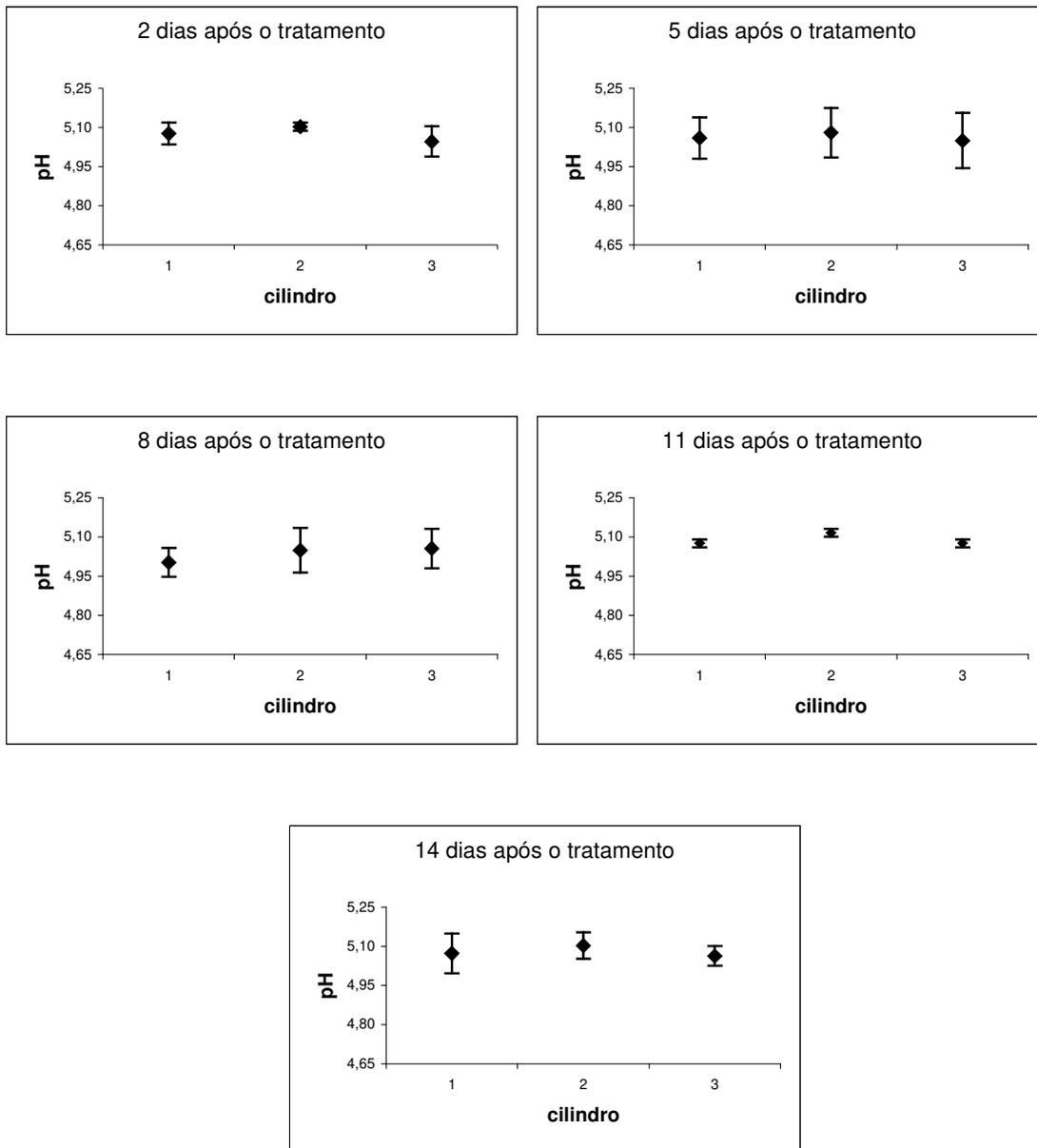
**Figura 4.** Comportamento do pH ao longo do tempo nos cilindros dos queijos expostos ao hidróxido de amônio por 1 hora. Lote B.



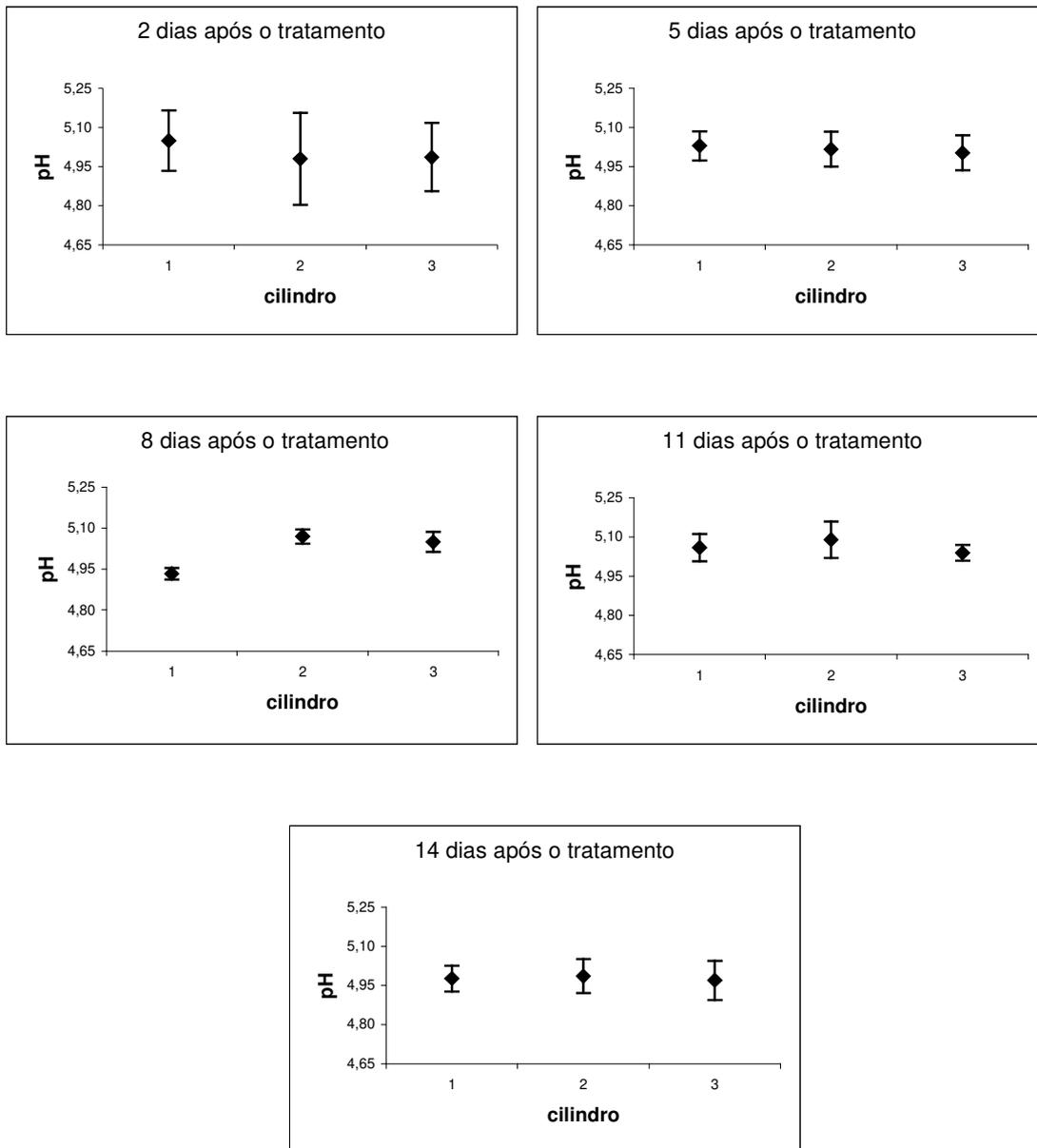
**Figura 5.** Comportamento do pH ao longo do tempo nos cilindros dos queijos expostos ao hidróxido de amônio por 1 hora e 30 minutos. Lote A.



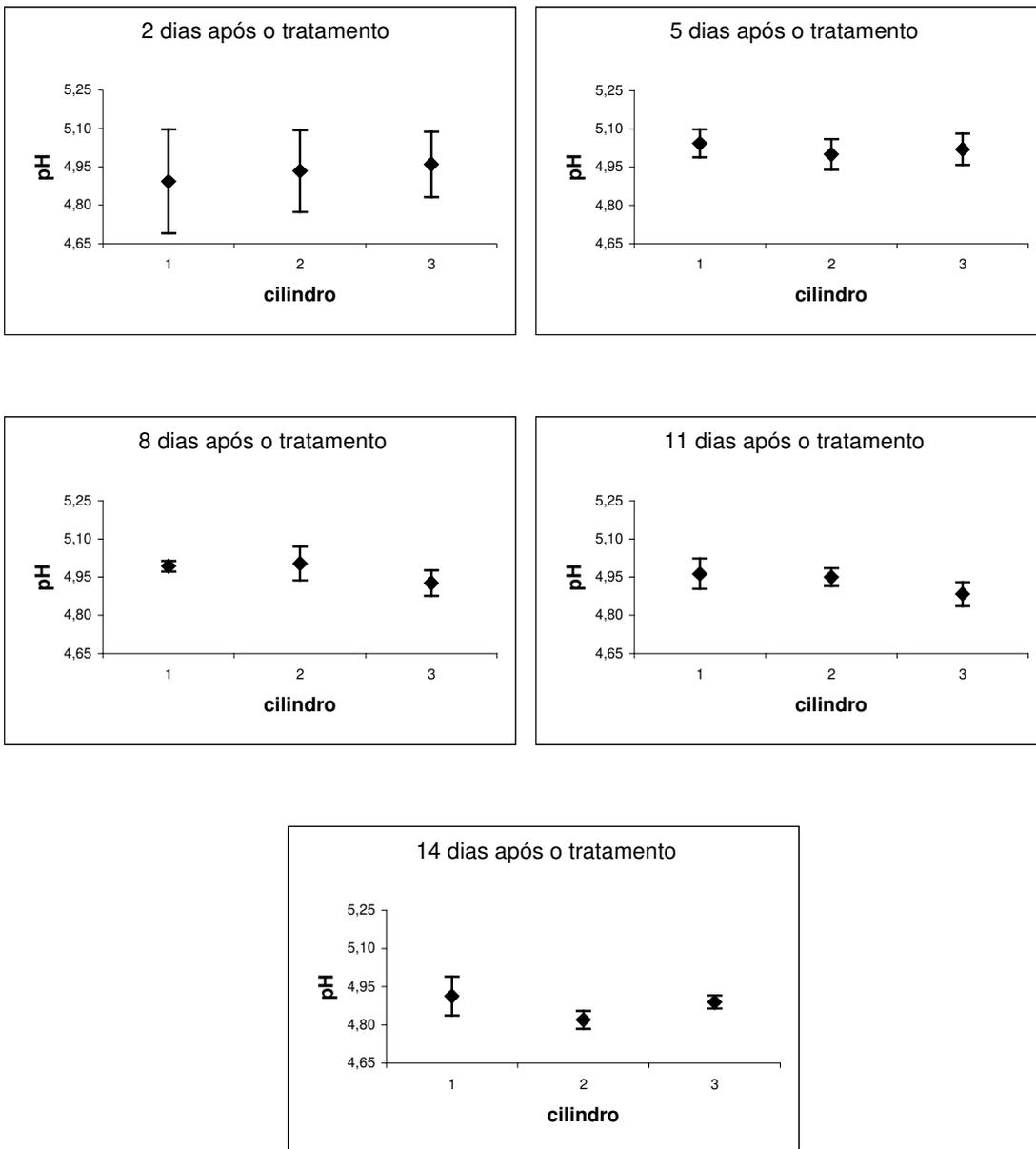
**Figura 6.** Comportamento do pH ao longo do tempo nos cilindros dos queijos expostos ao hidróxido de amônio por 1 hora e 30 minutos. Lote B.



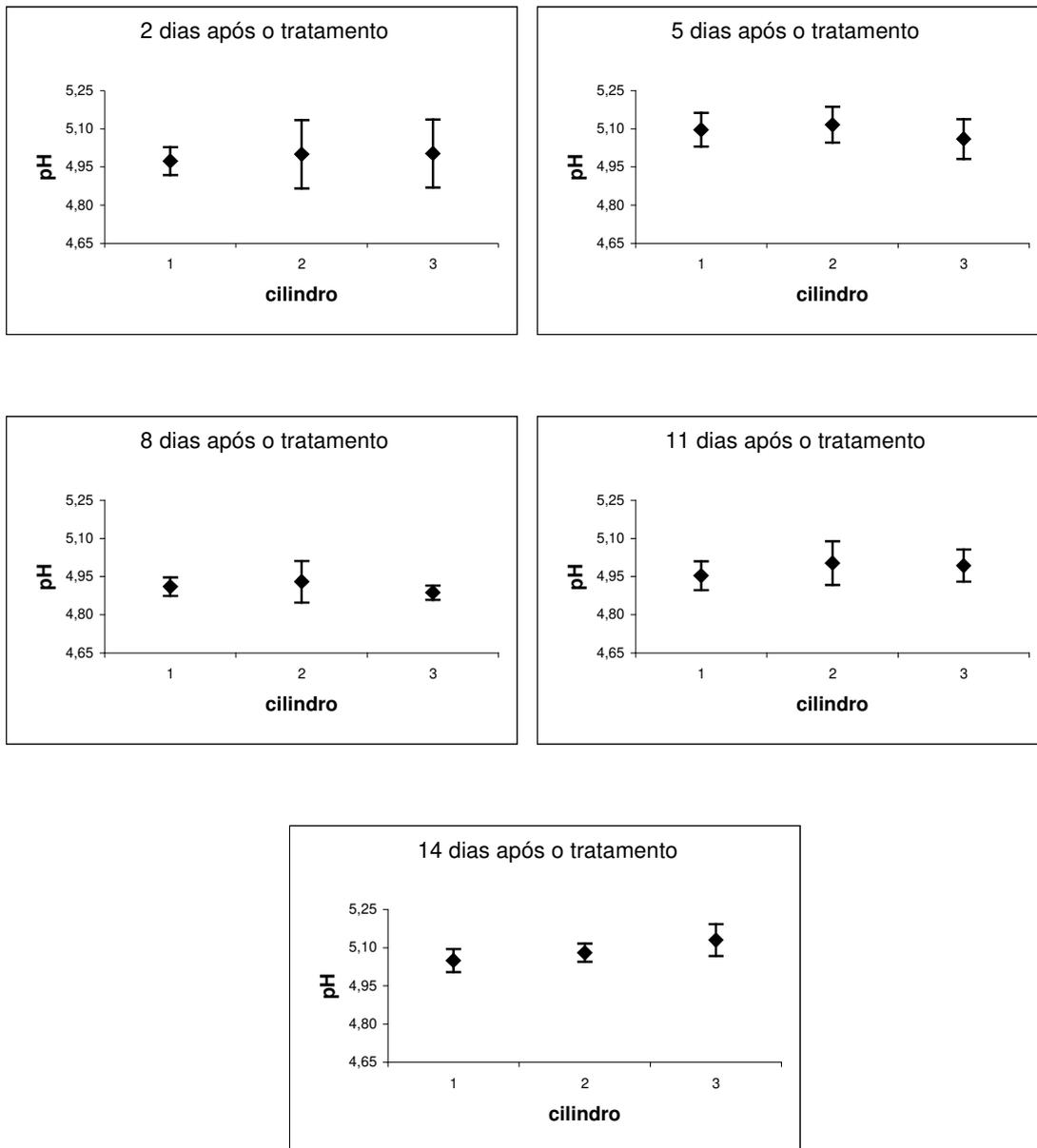
**Figura 7.** Comportamento do pH ao longo do tempo nos cilindros dos queijos expostos ao ácido acético por 1 hora e 30 minutos. Lote A.



**Figura 8.** Comportamento do pH ao longo do tempo nos cilindros dos queijos expostos ao ácido acético por 1 hora e 30 minutos. Lote B.



**Figura 9.** Comportamento do pH ao longo do tempo nos cilindros dos queijos expostos ao ácido acético por 2 horas. Lote A.



**Figura 10.** Comportamento do pH ao longo do tempo nos cilindros dos queijos expostos ao ácido acético por 2 horas. Lote B.

## CONCLUSÃO GERAL

No que diz respeito ao comportamento da fase aquosa, os resultados indicaram que, além da proteólise, o comportamento da fase aquosa do queijo no período inicial da maturação pode ser também responsável pela modificação da funcionalidade do queijo, uma vez que afeta a hidratação da matriz protéica. A interação da fase aquosa com a matriz protéica pode contribuir para a melhoria das características funcionais do queijo Prato.

Quanto ao efeito independente do pH sobre a proteólise, verificou-se que o pH não afetou significativamente a proteólise do queijo Prato. Entretanto, os índices de extensão e profundidade de maturação aumentaram ao longo do tempo e aumentaram menos para o mais baixo pH, o que foi confirmado pelo perfil eletroforético. Nos queijos de menor pH a degradação da  $\alpha_{S1}$  e da  $\beta$ -caseínas ocorreu mais lentamente e menos extensivamente do que nos queijos controle e de mais alto pH.

Além disso, observou-se a existência de correlação linear positiva ( $R^2 = 1$ ) entre pH e a firmeza dos queijos. Os resultados sugerem que o efeito do pH sobre a firmeza é dependente do conteúdo de cálcio solúvel e ligado à matriz protéica do queijo. A redução da firmeza com o aumento do pH, possivelmente pode ser atribuída ao efeito da interação proteína-água que suplantou o efeito da migração do cálcio para a matriz protéica. Os resultados demonstraram que a melhor condição para avaliar o derretimento do queijo Prato durante todo o período de maturação foi 130°C/10min. Não se observou associação significativa entre pH e derretimento e entre pH.