



LAÍS DE SOUZA ALVES

**“FABRICAÇÃO DE QUEIJO PRATO COM DIFERENTES
PROTEASES”**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LAÍS DE SOUZA ALVES

**“FABRICAÇÃO DE QUEIJO PRATO COM DIFERENTES
PROTEASES”**

Orientador (a): Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante

Coorientador (a): Dra. Carolina Merheb Dini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Tecnologia de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LAÍS DE SOUZA ALVES E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MIRNA LÚCIA GIGANTE

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

AL87f Alves, Laís de Souza, 1987-
Fabricação de queijo prato com diferentes proteases /
Laís de Souza Alves. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante.
Coorientador: Carolina Merheb Dini.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Queijo Prato. 2. Enzimas de fungos. 3.
Avaliação sensorial. 4. Maturação. I. Gigante, Mirna
Lúcia. II. Dini, Carolina Merheb. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Manufacture of prato cheese with different proteases

Palavras-chave em inglês:

Prato cheese

Fungal enzymes

Sensory evaluation

Ripening

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Mirna Lúcia Gigante [Orientador]

Eliana Paula Ribeiro

Leila Maria Spadoti

Data da defesa: 27-05-2013

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante
Orientadora
FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro
Membro Titular
INST. MAUÁ DE TEC. - ESC. ENG. MAUÁ

Dra. Leila Maria Spadoti
Membro Titular
ITAL/TECNOLAT

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna
Membro Suplente
IBILCE/UNESP

Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto
Membro Suplente
FEA/UNICAMP

DEDICATÓRIA

À Deus, dedico meu agradecimento maior, pela fé e perseverança que tem me dado.

*Aos meus pais, Abdias e Vera, aos meus irmãos, Leandro e Lilian e ao meu noivo
Fernando, agradeço pelo apoio, amor e compreensão.*

*“É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à
margem de nós mesmos”.*

Fernando Teixeira de Andrade

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Abdias e Vera, aos meus irmãos, Leandro e Lilian pelo apoio, incentivo, amor e dedicação que sempre me motivaram a prosseguir.

Ao meu noivo Fernando pelo apoio, amor, carinho e compreensão. Obrigada por me fazer tão feliz.

A minha orientadora Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante pela oportunidade, disponibilidade e por sua contribuição no meu crescimento pessoal e profissional.

A minha coorientadora Dra. Carolina Merheb Dini pela produção da enzima, pelo apoio, amizade e companheirismo em todos os momentos deste trabalho e da vida.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro, Dra. Leila Maria Spadoti, Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna e Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto pelas correções e sugestões sobre a dissertação.

A técnica de laboratório Bete, pelos ensinamentos e pela ajuda com análises realizadas neste trabalho.

As amigas de Karina e Cecília pela ajuda nos processos de fabricação dos queijos e pela amizade.

Aos amigos da pós-graduação Diogo, Lígia, Mônica, Guilherme, Ana, Graciela, Simone e Gislaine pela amizade e companheirismo.

A UNESP de São José do Rio Preto, pelo fornecimento do fungo e espaço para a produção da enzima.

A empresa Bela Vista pelo fornecimento do coagulante microbiano.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de pós-graduação e a Fapesp, processos 2011/51158-8 e 2011/50844-5.

A todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o mais profundo agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Coagulação do leite.....	4
3.2 Coagulantes	6
3.3 Queijo Prato.....	8
3.4 Mudanças bioquímicas no queijo durante a maturação	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Obtenção da enzima	14
4.2 Fabricação do queijo Prato.....	15
4.3 Amostragem e análises.....	16
4.4 Determinações analíticas.....	17
4.4.1 Análises físico-químicas	17
4.4.2 Determinação da recuperação dos constituintes do leite e rendimento de fabricação dos queijos	18
4.4.3 Avaliação do perfil eletroforético (Urea-PAGE).....	19
4.4.4 Avaliação da firmeza dos queijos	20
4.5 Delineamento experimental e análise estatística dos resultados	20
4.6 Análise Sensorial.....	21

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Composição dos leites cru e tratado termicamente	23
5.2 Efeito do tratamento sobre o comportamento do pH durante o processamento dos queijos	24
5.3 Composição dos queijos e dos soros	25
5.4 Efeito do tratamento na recuperação dos constituintes do leite e rendimento de fabricação dos queijos.	27
5.5 Maturação dos queijos.....	28
5.6 Análise Sensorial.....	33
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS	37
ANEXO 1	48
ANEXO 2	50
ANEXO 3	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Efeito do tempo de armazenamento sobre a acidez do queijo Prato durante a maturação (n=3). ^{a, b, c} Valores com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância..... 29
- Figura 2 - Efeito do tempo de armazenamento sobre o teor de NS pH 4,6 (%NT) (●) e de NS TCA 12% (%NT) (○) do queijo Prato durante a maturação (n=3). ^{a, b, c, d} Valores com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância. 30
- Figura 3 - Perfil de degradação das caseínas dos queijos Prato durante 50 dias de maturação. T representa os queijos fabricados com o coagulante do *Thermomucor indicaseudaticae* N31 (Thermomucor) e C os queijos produzidos com o com o coagulante comercial (Controle) e 2, 9, 16, 30 e 50 representam os dias de maturação apresentados no eletroferograma..... 31
- Figura 4 - Efeito do tempo de armazenamento sobre a firmeza do queijo Prato durante a maturação (n=3). ^{a, b} Valores com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância..... 32
- Figura 5 - Impressão global do queijo Thermomucor (■) e Controle (□). Aceitação: notas 6 a 9; Indiferença: nota 5; Rejeição: notas 1 a 4..... 34
- Figura 6 - Intenção de compra dos queijo Thermomucor (■) e Controle (□). 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização físico-química média e desvio padrão do leite utilizado na fabricação dos queijos (n=3).	23
Tabela 2 - Valores de pH durante o processamento dos queijos (n=2).	24
Tabela 3 - Caracterização físico-química média e desvio padrão dos queijos ¹ (n=3).	25
Tabela 4 - Caracterização físico-química média e desvio padrão dos soros (n=3).	26
Tabela 5- Efeito dos tratamentos na recuperação dos constituintes no queijo, no soro e rendimento dos queijos (n=3).	27
Tabela 6 - Efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação tratamento x tempo sobre o pH, acidez, umidade, NS pH 4,6 (%NT), NS TCA 12% (%NT) e firmeza dos queijos durante a maturação obtidos na análise de variância (ANOVA) (n=3).	28
Tabela 7 - Padrão microbiológico dos queijos submetidos à avaliação sensorial (Anexo 3).	33
Tabela 8 - Notas para os atributos dos queijos obtidas na avaliação sensorial (n=100).	34

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito do coagulante microbiano sobre o rendimento, características físico-químicas, sensoriais e firmeza do queijo Prato durante a maturação. Os queijos foram fabricados a partir de leite tratado termicamente usando como coagulantes a protease do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, e coagulante comercial de *Rhizomucor* sp. O experimento foi do tipo fatorial 2 x 6, em blocos completamente aleatorizados com três repetições. Os resultados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey ao nível de 5% de significância. O leite, o soro e os queijos foram avaliados quanto à composição centesimal e rendimento. Os queijos foram analisados após 2, 9, 16, 30, 40 e 50 dias de armazenamento com relação ao pH, acidez, umidade, proteólise, firmeza e degradação das frações de caseína por eletroforese em gel. A aceitação sensorial dos queijos foi realizada após 26 dias de fabricação. Os diferentes coagulantes não afetaram a composição dos queijos que apresentou, em média, 42,68% ± 1,87 de umidade, 28,58% ± 1,06 de gordura e 1,91% ± 0,021 de sal, conforme o esperado para queijo Prato. A recuperação de proteína e gordura e o rendimento dos queijos não foram afetados pelos diferentes coagulantes. Ambos os queijos apresentaram boa aceitação sensorial e apresentaram nota média para a aceitação global de 7,1 ± 0,05. Durante a maturação, a proteólise aumentou de maneira similar para ambos os queijos e houve redução de firmeza. A eletroforese em gel de ureia mostrou que o perfil de hidrólise proteica dos queijos foi muito semelhante. O conjunto de dados mostra que a nova protease apresentou comportamento similar à enzima comercial, sugerindo o potencial tecnológico da enzima do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 como agente coagulante para a fabricação de queijo Prato.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the effect of the microbial coagulant on Prato cheese yield and on the development of its physico-chemical, sensory and firmness characteristics during ripening. Cheeses were manufactured using the following coagulants: laboratory obtained protease, from the fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 and commercial coagulant from *Rhizomucor* sp. A 2 x 6 factorial design with 3 replications was performed and the results were evaluated by ANOVA and mean values were compared by Tukey's test at a 5% significance level. Milk, whey and cheese composition were evaluated and cheese yield was calculated. Cheeses were monitored after 2, 9, 16, 30, 40 and 50 days of storage regarding pH, acidity, moisture, proteolysis, firmness and degradation of casein fractions by gel electrophoresis. Sensory acceptance was evaluated after 26 days of manufacture. The different coagulants did not affect cheese composition, which exhibited average content of $42.68\% \pm 1.87$ for moisture, $28.58\% \pm 1.06$ for fat and $1.91\% \pm 0.02$ for salt, as expected for Prato cheese. Protein and fat recovery and cheese yield were not affected by the coagulants as well. Both cheeses presented good sensory acceptance with overall liking scores of 7.1 ± 0.05 representing the 'like moderately' category. For both cheeses, proteolysis increased and firmness decreased throughout ripening. Urea-PAGE showed that the protein hydrolysis profile was very similar. The gathered data suggest that ripening developed in the same way for both cheeses suggesting the technological potential of protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as milk clotting agent for Prato cheese manufacture.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Prato é um queijo típico brasileiro e um dos mais consumidos no país. A legislação brasileira define o queijo Prato como um queijo maturado (por pelo menos 25 dias), obtido através da coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. É um queijo gordo, de média umidade, de massa semicozida e lavada e possui um corpo macio e sabor suave (BRASIL, 1997).

A coagulação enzimática do leite, para a fabricação de queijos, envolve modificações específicas das micelas de caseína através da proteólise limitada por proteinases selecionadas, seguida por agregação das micelas na presença de cálcio.

A renina, também conhecida como quimosina, obtida de bezerros é a protease mais utilizada como coagulante para a fabricação de queijos (KLOOSTERMAN, 1991). O aumento da produção mundial de queijos, a escassez de reninas de bezerros e o elevado custo da quimosina bovina incentivaram a obtenção de enzimas coagulantes a partir de outras fontes (FOX et al., 2000). Atualmente, a quimosina obtida por fermentação, através da técnica de DNA recombinante, constituída de quimosina pura, e os coagulantes obtidos de micro-organismos como *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Endothia parasítica*, *Aspergillus oryzae* e *Irpex lactis*, são extensivamente utilizados na fabricação de queijos. Dentre os coagulantes microbianos disponíveis no mercado, os de origem fúngica são os mais utilizados atualmente na fabricação de queijos (JACOB et al., 2011).

A busca por coagulantes é uma constante, e de tempos e tempos uma nova fonte é reportada. Os substitutos da renina devem imitar suas propriedades específicas. Devem ter uma alta atividade coagulante, ou seja, ter especificidade para a κ -caseína e ter baixa atividade proteolítica em pH e temperatura normalmente utilizados no processo de fabricação de queijos (HYSLOP, 2003). Estudos conduzidos por Merheb-Dini et al. (2010) mostraram que o extrato enzimático do fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 exibiu forte atividade coagulante, baixa atividade proteolítica e baixa ação hidrolítica sobre as caseínas do leite durante a coagulação. O extrato foi utilizado com sucesso na fabricação de queijo Prato em escala laboratorial, sugerindo o potencial tecnológico desta enzima (MERHEB-DINI et al., 2012).

Tendo em vista a valorização de tecnologias brasileiras, neste trabalho serão apresentados estudos comparando o efeito do coagulante microbiano sobre rendimento, composição, maturação, aceitação sensorial e firmeza do queijo Prato. Os coagulantes utilizados foram a protease obtida em laboratório a partir do fungo *Thermomucor indicaseudaticae* N31 isolado no Brasil e o coagulante Alternative produzido pela Bela Vista (Santa Catarina) a partir do *Rhizomucor* sp. O queijo Prato foi escolhido por ser tipicamente brasileiro e amplamente consumido no país.

2. OBJETIVO

O trabalho teve como objetivo comparar o efeito do coagulante microbiano (protease produzida em laboratório pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e coagulante comercial produzido por *Rhizomucor* sp.) sobre o rendimento, características físico-químicas, sensoriais e firmeza do queijo Prato durante a maturação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Coagulação do leite

A coagulação da caseína do leite é o processo fundamental para a elaboração de queijos. Assim, normalmente, faz-se uso de enzimas proteolíticas coagulantes que, dependendo de sua origem, apresentam composições enzimáticas diferenciadas, tanto em proporção das enzimas, por exemplo, renina obtida de estômago de bezerros em lactação apresenta em média 88-94% de quimosina e 6-12% de pepsina (SCOTT, 1998) e a renina obtida de bovinos adultos apresenta 80-90% de pepsina e 10-20% de quimosina (HARBOE et al., 2010), quanto em origem, por exemplo, animal, vegetal, microbiana ou quimosina obtida por fermentação (NEELAKANTAN et al., 1999).

As proteínas do leite são divididas em dois grandes grupos: as proteínas solúveis em pH 4,6, que são as proteínas do soro, especialmente α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, e as proteínas insolúveis neste pH, que são encontradas em grandes partículas coloidais denominadas micelas de caseína. As caseínas (CN) constituem aproximadamente 80% das proteínas do leite bovino, e suas principais frações (α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseínas) encontram-se em combinação com apreciáveis quantidades de fosfato de cálcio micelar ou coloidal na forma de agregados. A estabilidade das micelas de caseína no leite é atribuída à repulsão eletrostática devido às suas cargas negativas, à repulsão estérica pela região flexível do macropeptídeo da κ -caseína, os chamados “cabelos” da caseína, à camada de hidratação o que reduz a tensão superficial das partículas, aumentando sua estabilidade (HORNE; BANKS, 2004; CRABBE, 2004). Além disso, a κ -caseína é uma proteína insensível ao cálcio que forma uma camada protetora ao redor das proteínas sensíveis ao cálcio (α_{s1} -, α_{s2} e β -), resultando na estabilidade das micelas. (CRABBE, 2004).

Durante a coagulação enzimática do leite, a κ - caseína é a única proteína hidrolisada pela quimosina, especificamente na ligação entre os aminoácidos Phe₁₀₅-Met₁₀₆ (CRABBE, 2004; FOX, et al., 2000), o que promove a desestabilização das micelas. Esta ligação é particularmente instável, devido à natureza dos aminoácidos envolvidos, à presença de uma serina adjacente a fenilalanina (Phe) e resíduos hidrofóbicos (Leu, Ala e Ile) (ECK, 1987). Após a hidrólise, a parte N-terminal da molécula, κ -CN f1-105 referida como paracaseína,

permanece ligada à micela de caseína, enquanto a parte C-terminal, referida como glicomacropéptido (f106-169), é liberado na fase aquosa (DEJMEK; WALSTRA, 2004; FOX, et al., 2000). Proteases do *Rhizomucor miehei* também hidrolisam preferencialmente a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -CN, porém, ao contrário da quimosina, também clivam outras ligações da κ -CN (FOX, et al., 2000).

As modificações físico-químicas que ocorrem ao nível das micelas continuam após esta primeira hidrólise. Na segunda fase da coagulação, as micelas de paracaseína, na presença de Ca⁺² e em temperaturas acima de 20 °C se agregam formando uma rede proteica chamada de coágulo ou gel (FOX et al., 2000). O coágulo é então tratado, e os diferentes tratamentos após a coagulação conduzem à fabricação dos diversos tipos de queijos (SARDINAS, 1972).

Vários fatores influenciam o processo de coagulação do leite, incluindo pH, temperatura, força iônica, concentração de enzimas e sais. A reação é dependente do pH e geralmente a coagulação é realizada em pH 6,3-6,6. A taxa de coagulação aumenta com a temperatura, desde que a enzima seja estável. O aumento da temperatura para \approx 30-32 °C ou redução do pH a 6,6 permite a coagulação a uma baixa porcentagem de hidrólise da κ -caseína. A indução da formação do gel a 35 °C requer aproximadamente 65% de hidrólise da κ -caseína. A concentração de íon cálcio também afeta a coagulação do leite já que participa da formação de pontes entre as micelas para formar o coágulo (CRABBE, 2004).

Quando o gel é cortado e submetido à agitação mecânica durante a elaboração do queijo, o soro é expulso do coágulo (PEARSE; MACKINLAY, 1989). Essa liberação de soro permite o controle do conteúdo de umidade do queijo e conseqüentemente, a atividade de micro-organismos e enzimas, a estabilidade e a qualidade final do queijo. A taxa e a extensão da expulsão do soro são influenciadas pela composição do leite, especialmente pela concentração de cálcio e caseína; pelo pH; pelo tempo e temperatura de cozimento e pelo grau de agitação da mistura coágulo/soro (FOX et al., 2000).

A porcentagem de recuperação de proteína e gordura do leite no queijo é influenciada pelo processo de fabricação e tem impacto no rendimento de queijos (BANKS, 2007). O rendimento do queijo obtido é muito importante porque mede a eficiência do processo de fabricação e determina sua viabilidade econômica. É uma ferramenta interessante para avaliar o potencial de um processo específico ou mudança de tecnologia (FOX et al., 2000).

Vários fatores afetam o rendimento de queijos, como por exemplo, composição do leite (concentrações de proteína e gordura), contagem de células somáticas, conteúdo de umidade do queijo, pH do coágulo, condições de fabricação do queijo, entre outros. Entre as condições de fabricação pode-se citar o tipo de coagulante, que exerce grande influência no rendimento de fabricação dos queijos. Coagulantes com alta atividade proteolítica diminuem o rendimento (LUCEY; KELLY, 1994). Na fabricação de queijos, geralmente a quimosina é o agente coagulante preferido por apresentar um ótimo rendimento quando comparado com coagulantes microbianos que podem resultar em um rendimento menor (EMONS, 1990). Na prática, reduções de rendimento atribuídas aos substitutos de renina podem ser minimizadas por meio da padronização do tempo de coagulação e seguindo-se as instruções do fabricante quanto ao uso do coagulante (LUCEY; KELLY, 1994).

3.2 Coagulantes

A utilização de enzimas para a fabricação de produtos específicos, com atributos característicos, é crescente, e pode ser enfatizada pela grande venda mundial de enzimas industriais. Em 2005 o mercado mundial de enzimas representou um faturamento da ordem de 4 bilhões de dólares, destes, 2,2 bilhões de dólares representaram o mercado de enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para a indústria de alimentos e enzimas para ração animal). No mesmo ano o Brasil importou 3.295.845 Kg de enzimas industriais e produtos relacionados e exportou 3.491.469 Kg (POLITZER; BON, 2006). O mercado mundial de enzimas deverá aumentar 7% até 2015, representando 8 bilhões de dólares. O uso de enzimas no segmento de alimentos e bebidas deve chegar à cerca 1,3 bilhões de dólares neste mesmo ano com as maiores vendas ocorrendo no mercado de leite e derivados (GLOBAL MARKETS, 2011).

Na indústria de queijo, o termo coalho, refere-se à enzima obtida do quarto estômago de bezerros que é utilizada para coagular o leite para a fabricação de queijos. Nesse caso, a enzima mais importante presente no coalho é a quimosina, também conhecida como renina e muitas vezes referida como coalho animal (SCOTT, 1998; SARDINAS, 1972). A quimosina (EC 3.4.23.4) é uma proteinase aspártica conhecida por promover proteólise limitada da caseína, e é justamente essa propriedade que é desejável quando se seleciona

proteinasas para uso como substitutos de coalho (FOX et al., 2000). O pH ótimo para a atividade da quimosina é 5,8 e a temperatura varia entre 30 a 50 °C. É relativamente estável a temperaturas de até 50 °C (KUMAR et al., 2010). Enzimas usadas para a coagulação do leite que não são obtidas do abomaso de ruminantes são denominadas coagulantes (ANDRÉN, 2002).

Nos últimos anos, devido ao aumento da produção mundial de queijos, à redução da oferta de coalhos de bezerros e ao elevado custo da quimosina bovina, houve o estímulo à procura por fontes alternativas para substituir este coalho (FOX et al., 2000; VISSER, 1993). Nesse contexto, existem vários tipos de coagulantes propostos como os de origem vegetal, microbiana e a quimosina obtida por fermentação (BENEDET, 1993).

Coagulantes extraídos de flores do cardo *Cynara cardunculus* são utilizados há séculos na produção de queijos artesanais, principalmente em Portugal e Espanha (SOUSA et al., 2001; SOUZA; MALCATA, 1998). Outra alternativa ao coalho animal, é a quimosina obtida por fermentação, constituída de quimosina pura. Essa é obtida através da técnica de DNA recombinante, que permite a abtenção da quimosina através do uso de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactics*, *A. nidulans*, *A. niger* e *Trichoderma reesei* (WALSTRA et al., 2006; NEELAKANTAN et al., 1999).

Inúmeras pesquisas foram realizadas com bactérias e fungos com o objetivo de avaliar a capacidade de produção de enzimas que coagulam o leite e suas características proteolíticas (SCOTT, 1998). Apesar de apresentarem algumas propriedades diferentes em relação à quimosina, algumas proteases de origem microbiana possuem ação similar a esta enzima, mostrando-se adequadas para a fabricação de queijos. Tais coagulantes podem ser facilmente produzidos por fermentação e são disponíveis quase que de maneira ilimitada. *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae* e *Irpex lactis*, são alguns exemplos de micro-organismos que já são extensivamente utilizados para a produção de coagulantes e adequados para substituir o coalho animal (NEELAKANTAN et al., 1999). O coagulante obtido de *Rhizomucor miehei* possui máxima atividade coagulante em pH 6,6 – 6,8 a 60 °C, possuindo ainda atividade a 70 °C (ROGELJ et al., 2001).

Pesquisas mostram novas proteases microbianas obtidas de diversas fontes sendo investigadas como substitutos de coalho, como por exemplo, os estudos realizados com os

micro-organismos *Nocardiopsis* sp (Cavalcanti et al., 2005), *Rhizopus oryzae* (Kumar et al., 2005) *Mucor bacilliformis* (Machalinski et al., 2006), *Bacillus subtilis* natto (Chwen et al., 2009), *Metschnikowia reukaufii* (Chi et al., 2009), *Gliocladium verticilloides* (Silva et al., 2009) *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (Vishwanatha et al., 2010) e *Bacillus licheniformis* (Ahmed; Helmy 2012).

O estudo conduzido por Merheb-Dini et al. (2010) apresentou a obtenção de uma protease coagulante a partir do fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 isolado de pilha de bagaço de cana-de-açúcar (MARTIN et al., 2010). O extrato enzimático foi produzido por fermentação em estado sólido utilizando-se farelo de trigo como substrato. Em curto período de tempo (24 horas), o micro-organismo secretou extracelularmente a enzima. O extrato enzimático apresentou máxima atividade coagulante em pH 5,7 e a 70 °C e estabilidade na faixa de pH 3,5 a 4,5 e 5,0 a 6,0 e de 35°C até 40-45°C (Merheb-Dini et al., 2010). O extrato enzimático foi utilizado com sucesso na fabricação de queijo Prato em escala laboratorial e se mostrou muito interessante do ponto de vista tecnológico porque além de possuir forte atividade coagulante e baixa atividade proteolítica sobre as caseínas do leite, foi obtido rapidamente utilizando-se um substrato barato (Merheb-Dini et al., 2012).

3.3 Queijo Prato

Dados da Associação Leite Brasil mostram que, em 2007, cerca de 35% do leite produzido no país (6,3 bilhões de litros) foi destinado para a produção de queijos (TURCO, 2008). Entre os anos de 2002 e 2006, a produção de queijos apresentou um crescimento em torno de 20%. A produção de 2006 representou um faturamento de 3,7 bilhões de reais (SEBRAE, 2008). Dados mais recentes da ABIQ (2012) apontam que em 2011, a produção de queijos no país foi de 812.638 toneladas, representando um crescimento de 9,3% quando comparado ao ano anterior. Desse volume produzido, 161.450 toneladas, aproximadamente 20% foram de queijo Prato. Esses dados denotam a importância econômica do queijo Prato no país, uma vez que a produção aumenta ano após ano.

O queijo Prato é um queijo típico brasileiro e atualmente o terceiro mais consumido no país (ABIQ, 2012). Ele foi introduzido no Brasil por imigrantes dinamarqueses e

originou-se dos queijos Danbo dinamarquês e Gouda holandês (PERRY, 2004). É um queijo gordo, de média umidade, de massa semicozida e lavada possuindo um corpo macio e sabor suave (SILVA, 2005). Sua composição média é de 42-44% de umidade, 26-29% de gordura, pH 5,2-5,4 e 1,6-1,9 de sal (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

Por definição, entende-se como queijo Prato, o queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulante apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997).

O processo de fabricação do queijo Prato compreende adição de cultura láctica, cloreto de cálcio, corante urucum e coagulante ao leite. Após a coagulação, a massa é cortada e agitada. Em seguida, retira-se 30% do soro e inicia-se o aquecimento gradativo da mistura massa/soro, com adição de água a 80 °C, até que a mistura alcance a temperatura de 42 °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 (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994; SILVA, 2005).

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1997) o queijo Prato deve possuir as seguintes características sensoriais:

- consistência semidura, elástica;
- textura compacta, lisa, fechada, com alguns olhos pequenos arredondados e/ ou algumas olhaduras mecânicas;
- cor amarelo ou amarelo-palha;
- sabor característico;
- odor característico; e
- não possuir crosta, ou uma crosta fina, lisa e sem trincas.

Para estabilização de suas características específicas, o queijo Prato deve apresentar um período de maturação maior ou igual que 25 dias. Deve ser conservado a uma temperatura não superior a 12 °C. (BRASIL, 1997). Pode possuir várias formas tais como paralelepípedo de seção transversal, retangular, cilíndrico ou esférico, mas é bastante utilizado com formato retangular, conhecido como Prato lanche para facilitar seu fatiamento, uma vez que é muito utilizado para sanduíches (SEBRAE, 2008).

3.4 Mudanças bioquímicas no queijo durante a maturação

Durante a maturação ocorre uma multiplicidade de eventos microbiológicos, químicos e bioquímicos e os principais constituintes do queijo, proteínas, lipídeos e lactose residual, são degradados (FOX; McSWEENEY, 1997). É um processo complexo e delicado que é influenciado por um grande número de fatores como pH, conteúdo de umidade, teor de sal, flora microbiana, entre outros (KLOOSTERMAN, 1991).

As mudanças bioquímicas primárias que podem ocorrer durante a maturação dos queijos envolvem o metabolismo da lactose residual do lactato e do citrato, lipólise e proteólise e as mudanças secundárias envolvem o metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos (McSWEENEY, 2004a; UPADHYAY; McSWEENEY, 2003). Como resultado dessas mudanças, há formação de numerosos compostos, como peptídeos, cetonas, aminoácidos livres e ácidos graxos livres, que irão conferir o sabor, aroma e textura característicos. O pH controla o tipo de fermentação e a atividade das enzimas. Os queijos normalmente apresentam um pH menor nos primeiros dias de maturação. Isso é regulado pela quantidade de lactose fermentada em ácido láctico e a capacidade tamponante da coalhada durante a fabricação do queijo. A capacidade tamponante é determinada pelas concentrações de fosfato de cálcio não dissolvido, caseínas e lactato remanescente no queijo (OLSON, 1996).

Para a fabricação de queijo Prato são utilizadas culturas lácticas mesofílicas compostas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (SILVA, 2005). Essas culturas lácticas atuam produzindo ácido láctico por meio da fermentação da lactose durante a fabricação de queijos e como consequência, ocorre redução do pH. (SHEEHAN, 2007). A atividade da cultura láctica é reduzida no final da fabricação dos queijos devido à combinação de fatores como, por exemplo, baixo valor de pH, alta concentração de sal e falta de carboidrato fermentável (McSWEENEY, 2004a). A formação de ácido láctico e o metabolismo da lactose residual durante os estágios iniciais da maturação reduzem o pH do queijo para $\approx 5 (\pm 0,3)$ dependendo da sua variedade. Durante a maturação, o pH do queijo aumenta devido a formação de compostos contendo nitrogênio alcalino e/ou ao catabolismo do ácido láctico. O pH do queijo Cheddar aumenta $\approx 0,1$ unidade após seis meses de maturação e o pH do queijo Gouda sobe de $\approx 5,1$ para 5,3-5,9 (FARKYE; FOX, 1990). A

maior parte da lactose é perdida no soro ($\approx 98\%$) e a que fica retida na massa ($\approx 0,8-1,5$) é metabolizada rapidamente após a drenagem do soro. A massa do queijo contém baixo nível de lactose, que é rapidamente metabolizado no início da maturação a lactato que pode ser catabolizado subsequentemente através de uma série de vias (FOX; LAW, 1991).

A proteólise é o evento mais complexo, e na maioria das variedades, o mais importante acontecimento que ocorre durante a maturação de queijos (McSWEENEY, 2004b). É pré-requisito para as características de desenvolvimento de sabor que é influenciado pelo uso de cultura láctica e coagulante adequado (NEELAKANTAN et al., 1999). A contribuição da proteólise para o sabor dos queijos ocorre através da formação de peptídeos, aminoácidos, aminas, ácidos, tióis, tioésteres, etc (FOX; LAW, 1991). A proteólise atua também no desenvolvimento da textura dos queijos devido à quebra da rede proteica, aumentando a capacidade de ligar água do coágulo. (McSWEENEY, 2004b; SOUSA et al., 2001).

Os principais agentes proteolíticos envolvidos no processo de maturação são: o coagulante residual; proteinases naturais do leite, especialmente a plasmina; bactérias provenientes da cultura láctica e suas enzimas que são liberadas a partir da lise celular; bactérias contaminantes, não provenientes da cultura láctica, que correspondem aos microorganismos sobreviventes ao tratamento térmico aplicado, ou que tiveram acesso ao leite pasteurizado ou ao coágulo durante a fabricação do queijo. (VISSER, 1993; FOX; LAW, 1991).

A proteólise em queijos é medida através do NS pH 4,6 (%NT) e NS TCA 12% (%NT). O NS pH 4,6 (%NT) está fundamentalmente relacionado com as proteinases naturais do leite e ao agente coagulante, os quais degradam a proteína em peptídeos de alto peso molecular na proteólise primária. O NS TCA 12% (%NT) está relacionado principalmente com a atividade das endoenzimas e exoenzimas da cultura láctica empregada na fabricação do queijo e de possíveis contaminantes que degradam os peptídeos de alto peso molecular a peptídeos de baixo peso molecular na proteólise secundária (NARIMATSU et al., 2003).

A quantidade de coagulante que permanece ativo no queijo depois da fabricação contribui significativamente com a proteólise durante a maturação e a taxa de retenção do coagulante no queijo depende de vários fatores incluindo o tipo de coagulante, a

temperatura de cozimento da massa, a variedade do queijo, pH e o teor de umidade final do queijo (FOX; LAW, 1991; GUINEE; WILKINSON, 1992; VISSER, 1993). Segundo Souza et al. (2001), apenas 0-15 % de coagulante adicionado ao leite permanece ativo no coágulo após a fabricação. A quimosina residual atua na ligação Phe₂₃ - Phe₂₄ da α_{s1} -caseína para produzir um grande peptídeo C-terminal α_{s1} -CN (f24-199) e um pequeno peptídeo α_{s1} -CN (f1-23) (FOX; McSWEENEY, 1997). A α_{s1} -CN (f24-199) é hidrolisada pela quimosina nas ligações Leu₁₀₁ - Lys₁₀₂ e mais lentamente em Phe₃₂ - Gly₃₃, Leu₁₀₉ - Glu₁₁₀, Phe₂₈ - Pro₂₉ e Leu₄₀ - Ser₄₁ (UPADHYAY et al., 2004). A α_{s2} -caseína é mais resistente à hidrólise por quimosina que α_{s1} -caseína; os sítios de clivagem da α_{s2} -caseína por quimosina são restritos a regiões hidrofóbicas da molécula (sequências 90-120 e 160-207). Em solução, a β -caseína é clivada por quimosina em sete sítios que podem resultar na produção de pequenos peptídeos hidrofóbicos, que são amargos (McSWEENEY, 2004a). A ação dos coagulantes microbianos na caseína durante a maturação de queijos é diferente da quimosina. Os principais sítios de clivagem da protease do *Rhizomucor miehei* em α_{s1} -caseína são nas ligações Phe₂₃-Phe₂₄, Phe₂₄-Phe₂₅, Met₁₂₃-Lys₁₂₄, e Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆ e em β -caseína são Glu₃₁-Lys₃₂, Val₅₈-Val₅₉, Met₉₃-Gly₉₄ e Phe₁₉₀-Leu₁₉₁ (FOX et al., 2000).

Dentre os coagulantes microbianos, os coagulantes obtidos de *Rhizomucor miehei* são os mais utilizados na fabricação de queijos e são mais proteolíticos e termoestáveis que a quimosina. A quimosina é caracterizada por sua alta e específica atividade coagulante e em geral baixa atividade proteolítica (HARBOE et al., 2010). De acordo com Jacob et al. (2011), muitas proteases microbianas possuem ação similar a quimosina e são parcialmente adequadas para a fabricação de queijos. Isso porque, essas enzimas apresentam alta atividade proteolítica durante a fabricação dos queijos que pode levar a uma perda de produtos de degradação da proteína para o soro que pode afetar negativamente o rendimento.

A plasmina (EC 3.4.21.7), proteinase natural do leite, tem sido reportada por possuir atividade proteolítica durante a maturação de queijos. A maior parte da plasmina ($\approx 90\%$) no leite bovino existe na forma de seu precursor, o plasminogênio (FOX, 1992). Esta enzima possui atuação ótima em pH 7,5 e portanto, sua importância é mais pronunciada em variedades de queijos onde o pH é mais elevado, como por exemplo, em queijo Camembert, onde o pH aumenta durante a maturação para $\approx 7,0$ (FOX, 1989; FOX et al., 2000). Possui temperatura ótima a 37 °C, é mais ativa em queijos que utilizam alta

temperatura no cozimento da massa devido à desnaturação de proteases termosensíveis, como o coagulante, por exemplo, e aumento da sua ativação (McSWEENEY, 2004a). A clivagem primária da β -caseína por plasmina ocorre em três sítios, Lys₂₈ – Lys₂₉, Lys₁₀₅ – His₁₀₆ e Lys₁₀₇ – Glu₁₀₈, hidrólise que origina as γ -caseínas [β -CN f 29-209 (γ_1 -CN), f106-209 (γ_2 -CN) e f108-209 (γ_3 -CN)], e protease peptona (PP) PP5 (β -CN f1-105 e f1-107), PP8 β -CN f 29-105, f29-107 e β -CN f1-28. Já a α_{s2} -caseína em solução é clivada por plasmina em oito sítios (FOX e McSWEENEY, 1997). A α_{s1} -CN (f24-199) é hidrolisada lentamente por plasmina nas ligações Lys₁₀₃ – Tyr₁₀₄ e Lys₁₀₅ – Val₁₀₆ (UPADHYAY et al., 2004).

Depois da fabricação, a textura dos queijos muda quase que continuamente, devido à ação da proteolítica. As mudanças de textura no queijo ocorrem nas primeiras semanas da maturação e ocorrem em duas fases. Na primeira fase, após as duas primeiras semanas, o coagulante hidrolisa a ligação Phe₂₃ - Phe₂₄ da α_{s1} -caseína formando α_{s1} - I - caseína resultando no amolecimento inicial dos queijos (CREAMER; OLSON, 1982). Na segunda fase, as mudanças são mais lentas e são decorrentes da quebra da rede proteica como resultado da proteólise e do aumento do pH (GUNASEKARAN; AK, 2003). A hidrólise da α_{s1} - caseína pelo coagulante microbiano é similar ao bovino e quimosina, nos estágios iniciais da maturação, proporcionando características de textura semelhantes. Entretanto, longos períodos de maturação com coagulante microbiano, podem levar a uma consistência menos firme nos queijos (LAWRENCE et al., 1987). A textura do queijo pode ser definida como um atributo sensorial resultante de uma combinação de propriedades físicas que são percebidas pelo tato, visão e audição (O'CALLAGHAN; GUINEE, 2004). Um método objetivo para avaliar a textura dos alimentos é através da análise do perfil de textura (TPA) utilizando-se o texturômetro. O teste consiste em comprimir uniaxialmente um pedaço de alimento duas vezes. Assim, durante o teste é realizada uma primeira compressão seguida por um relaxamento e uma segunda compressão. Deste teste obtém-se um gráfico de força versus tempo, do qual se calculam os parâmetros de textura (BOURNE, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da enzima

O fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi obtido da coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP, Campus de São José do Rio Preto – SP. A protease foi produzida de acordo com metodologia descrita por Merheb-Dini et al. (2010), com modificações conforme descrito abaixo.

Inicialmente o fungo foi inoculado em frascos Erlenmeyer (250 mL) inclinados, contendo 50 mL do meio Sabouraud e incubado em estufa a 45 °C por 2 dias para crescimento. A cada frasco contendo o fungo foi adicionado 100 mL de solução salina esterilizada, composta de 0,1% dos seguintes sais: sulfato de amônia [(NH₄)₂SO₄], sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) e nitrato de amônia (NH₄NO₃). A superfície do meio foi raspada delicadamente obtendo-se uma suspensão de micélios, que foi utilizada para inocular os meios de fermentação. Foram preparados e esterilizados (120 °C/20 min), em frascos Erlenmeyer de 500 mL, meios contendo 20 g de farelo de trigo. Os meios foram inoculados com 27 mL da suspensão micelial, obtendo-se 60% de umidade inicial, e foram incubados a 45 °C estacionariamente por 24 horas. Para a extração enzimática, 160 mL de água destilada foram adicionados aos meios. Os frascos foram agitados a 100 rpm / 30 minutos, o conteúdo foi filtrado e centrifugado a 30996 x g 20 minutos a 5 °C. A solução obtida, denominada extrato enzimático bruto, foi filtrada em papel de filtro Whatman n°1 e concentrada por ultrafiltração (Quixstand System, GE) até atingir atividade enzimática de 666 U/mL. Para cada processamento de queijo, 300 mL de extrato concentrado foi produzido e utilizado. O extrato concentrado foi congelado em frascos plásticos, acondicionado em isopor com gelo e transportado para a Unicamp.

A atividade enzimática foi determinada de acordo com Arima et al. (1970), com modificações. Cinco mL de solução de leite desnatado (Itambé) reconstituído a 10% (p/v) com CaCl₂ 0,01 M foi pré incubada a 35 °C por 10 minutos. Foi adicionado 0,5 mL de solução enzimática e iniciou-se a contagem do tempo. A formação do coágulo foi observada enquanto rodava-se o tubo de ensaio manualmente. O tempo em que as primeiras partículas foram formadas foi medido. Uma unidade de atividade coagulante (UAC) foi

definida como a quantidade de enzima necessária presente em 1 mL de extrato que coagulou 10 mL de substrato em 40 minutos e foi calculada de acordo com Shata (2005): $U/mL = 2400/T \times S/E$, onde T é o tempo necessário para formação do coágulo, S é o volume de leite e E é o volume de enzima.

4.2 Fabricação do queijo Prato

Os queijos foram fabricados em tanque de aço inox tipo queijomatic, através de método tradicional de fabricação como descrito por Furtado e Lourenço Neto (1994). Para cada processamento, no dia anterior a fabricação, 100 litros de leite cru proveniente do Laticínio Atilatte (Fazenda Atibainha, Atibaia, SP) foi tratado termicamente (68 °C/2 minutos), resfriado a 4 °C, dividido em duas porções de 50 litros e armazenados em câmara fria (4 ± 1°C). No dia seguinte, o leite foi colocado na queijomatic e aquecido a 35 °C. Uma porção de 50 L foi utilizada para a fabricação do queijo Prato adicionado da enzima do *T. indiciae-seudaticae* N31, identificado no texto como queijo Prato Thermomucor. A outra porção foi utilizada para a fabricação do queijo Prato adicionado do coagulante microbiano comercial (Alternative, Bela Vista - produzido por fermentação por *Rhizomucor* sp.), identificado no texto como queijo Prato Controle. Para ambos os tratamentos, após o aquecimento a 35 °C o leite foi adicionado de cloreto de cálcio (250 ppm), corante urucum (80 ppm), cultura láctica tipo O (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* - R704, Chr. Hansen) na proporção de 1% (v/v), e coagulante calculado para coagular em 55 min (Thermomucor) e 35 min (Controle). A quantidade de coagulante adicionada foi determinada através da força do coalho. O queijo Controle foi fabricado de forma tradicional, utilizando-se o tempo de 35 minutos para a coagulação, que também foi utilizado por Cichoscki et al. (2002), Mazal et al. (2007) e Kubo et al. (2013). O queijo Thermomucor foi fabricado utilizando-se o tempo de coagulação de 55 minutos, a partir de estudos realizados por Dini (2010), onde a enzima aplicada para produção de queijo Prato foi produzida e concentrada de forma a possuir uma atividade enzimática de 666 U/mL que coagulou 15 L de leite em aproximadamente 45 minutos. O tempo de coagulação para o queijo Thermomucor foi determinado em função da concentração e atividade da enzima de acordo com as condições possíveis do laboratório de produção. Ao atingir o ponto de corte,

o gel foi cortado em cubos de 1 cm de aresta e seguiram-se as etapas de tratamento da massa: agitação por 15 minutos, dessoragem parcial (retirada de 30% do soro), lavagem e cozimento da massa através da adição de 20% água a 80 °C de modo a aumentar a temperatura da mistura coágulo/soro para 42 °C (1 °C a cada 3 minutos). Após atingir o ponto de massa, foi feita a dessoragem e a massa foi colocada em formas retangulares de 0,5 kg e prensada. A prensagem ocorreu em quatro etapas da seguinte maneira: primeira prensagem: 15 psi por 15 min; segunda prensagem: 15 psi por 15 min; terceira prensagem: 35 psi por 30 min; e quarta prensagem: 45 psi por 90 min. Os queijos foram fermentados por 5 horas em temperatura ambiente e salgados em salmoura (20%) por 10 horas (5 °C). Ao final da salga, os queijos foram secos por 48 horas (12 °C), embalados a vácuo em plástico termo-encolhível e armazenados a 12 °C por 50 dias.

4.3 Amostragem e análises

O leite cru foi submetido à determinação de pH, acidez, densidade, gordura e extrato seco total.

Para verificar a eficiência do tratamento térmico o leite foi submetido à avaliação da atividade das enzimas lactoperoxidase e fosfatase alcalina. O leite tratado termicamente foi avaliado quanto ao pH, acidez, gordura, extrato seco total, cinzas, nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA 12%).

O pH foi avaliado durante o processo de fabricação dos queijos nas seguintes etapas: leite no tanque, após a adição de cultura, corte, primeira dessoragem, final do aquecimento, segunda dessoragem e enformagem.

Amostras de soro foram coletadas para realização das seguintes análises: pH, acidez, gordura, extrato seco total, cinzas, nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA 12%).

Em cada dia de amostragem, um queijo foi escolhido aleatoriamente, a parte externa do queijo foi retirada e desprezada, foi cortado em cubos e triturado em multiprocessador. Os queijos foram avaliados após 6 dias de fabricação (2 dias de armazenamento após embalagem a vácuo) para obtenção da composição com relação ao pH, acidez, extrato seco

total, gordura, cinzas, sal, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12% e após 9, 16, 30, 40 e 50 dias de armazenamento refrigerado (12 °C) após serem embalados a vácuo para o acompanhamento da maturação. A maturação foi acompanhada através das análises de pH, acidez, extrato seco total, proteólise, firmeza e perfil eletroforético.

Com base na composição dos queijos e dos soros foram calculadas as taxas de recuperação dos constituintes do leite para o queijo e soro e o rendimento ajustado.

4.4 Determinações analíticas

4.4.1 Análises físico-químicas

O pH foi determinado através da utilização de potenciômetro calibrado, com eletrodo introduzido diretamente nas amostras de leite, soro e de queijo.

A acidez titulável foi determinada através da titulação com hidróxido de sódio 0,1N em presença de indicador fenolftaleína. Para leite e soro, coletou-se a amostra e mediu-se diretamente a acidez; para o queijo, a amostra foi diluída em água morna, agitada com o auxílio de um mixer, filtrada e titulada (AOAC 2006).

A densidade foi determinada para o leite cru através do lactodensímetro com correção de temperatura (AOAC 2006).

A atividade das enzimas lactoperoxidase e fosfatase alcalina foi realizada segundo LANARA (1981) e AOAC (2006) respectivamente.

O extrato seco total (EST) foi determinado pelo disco de Ackermann para o leite cru e para o leite tratado termicamente, soro e queijo determinado por secagem em estufa a 105 °C até peso constante, de acordo AOAC (2006).

A gordura foi determinada pelo método de Gerber (leite e queijo) de acordo com British Standard Institution (1989) e por Monjonier (soro) de acordo com AOAC (2006).

A determinação de cinzas foi realizada por incineração em mufla a 550 °C até peso constante, de acordo com AOAC (2006).

O teor de sal do queijo foi determinado pelo método Volhard, onde às amostras de queijo foram adicionadas nitrato de prata, água e ácido nítrico e foram digeridas em placa

aquecedora. Procedeu-se a titulação até as amostras passarem de amarelo claro para laranja claro (RICHARDSON, 1985).

O nitrogênio total (NT) foi determinado para o leite e para o soro através do método micro-Kjeldahl e para o queijo foi utilizado o método macro-Kjeldahl de acordo com AOAC (2006). O teor de proteína total foi calculado multiplicando o NT pelo fator de correção 6,38.

O nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) foi determinado através do nitrogênio solúvel do filtrado após a precipitação no ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6) pelo método macro-Kjeldahl, de acordo com AOAC (2006).

O nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA 12%) foi determinado através do nitrogênio solúvel do filtrado, após precipitação pela adição de ácido tricloroacético (TCA 12%), pelo método macro-Kjeldahl, de acordo com AOAC (2006).

O teor de caseína foi calculada pela diferença entre nitrogênio total e o nitrogênio solúvel em pH 4,6, multiplicado por 6,38.

A proteólise foi expressa com base nos valores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 em relação ao nitrogênio total [NS pH4,6 (%NT)], e de nitrogênio solúvel em TCA 12% em relação ao nitrogênio total [NS TCA12% (%NT)]. Esses valores foram utilizados para acompanhar e comparar a proteólise dos queijos submetidos aos diferentes tratamentos.

4.4.2 Determinação da recuperação dos constituintes do leite e rendimento de fabricação dos queijos

A recuperação dos constituintes do leite e o rendimento do processo de fabricação foram calculados conforme descrito por Mazal et al. (2007). A recuperação de proteína e gordura (%R) foi calculada de acordo com a equação 1:

$$\%R_{ij} = \frac{(m_j \times c_{ij}) \times 100}{m_{leite} \times c_{i_{leite}}} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

i: componentes do leite (proteína, gordura)

j: amostra (queijo ou soro)

m: peso da amostra (g)

c_{ij}: porcentagem de *i* na amostra *j*

m_{leite}: peso do leite (g)

c_ileite: porcentagem de *i* no leite

O rendimento ajustado, que considera os teores de sal e umidade desejáveis no queijo, foi calculado segundo a equação 2. Para o queijo Prato foram considerados conteúdos desejáveis de sal de 1,6% e 42% de umidade.

$$R_{ajustado} = \frac{R \times [100 - (\% \text{ conteúdo real de umidade} + \% \text{ conteúdo real de sal})] \times 100}{[100 - (\% \text{ conteúdo desejável de umidade} + \% \text{ conteúdo desejável de sal})]} \quad \text{Equação (2)}$$

4.4.3 Avaliação do perfil eletroforético (Urea-PAGE)

A eletroforese foi realizada aos 2, 9, 16, 30 e 50 dias de maturação. Com base no teor de proteína dos queijos após quantificação do nitrogênio total as amostras foram preparadas de forma a apresentarem 0,4% de proteína. As amostras foram digeridas em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,7 contendo ureia 8 M e β-mercaptoetanol a 40 °C por 1 hora e foram congeladas em tubos Eppendorf até o momento da análise. As amostras foram submetidas à urea-PAGE seguindo o método de Andrews (1983), com modificações, o gel concentrador foi preparado na concentração de 4% e o gel fracionador na concentração de 9%. A separação ocorreu na voltagem constante de 120 V utilizando tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M pH 8,3. As bandas foram coradas *overnight* por imersão do gel em *Coomassie Brilliant Blue* (R-250) e descoradas em solução descorante (10% ácido acético, 40% metanol e 50% água).

4.4.4 Avaliação da firmeza dos queijos

Para a avaliação da firmeza, de cada queijo foram retiradas de toda a sua extensão, oito amostras cilíndricas de 2 cm de diâmetro e 2,4 cm de altura com o auxílio de uma sonda de alumínio. Os cilindros foram embalados em filme plástico, acondicionados em sacos e mantidos em banho de água gelada (10 °C) por no mínimo 4 horas para estabilização da temperatura. A determinação da firmeza foi realizada em texturômetro TA-XT2, com probe de alumínio de 35 mm de diâmetro. A velocidade do teste foi de 100 mm/min e com compressão de 40% da altura inicial do cilindro de queijo, com repetição em 5 segundos (BOURNE, 2002).

4.5 Delineamento experimental e análise estatística dos resultados

Para avaliar o efeito do coagulante sobre a composição do queijo foram realizados experimentos do tipo fatorial 2 x 6, em blocos completamente aleatorizados. O fator coagulante teve dois níveis de variação (coagulante comercial e coagulante produzido pelo *T. indicae-seudaticae* N31); o fator tempo de armazenamento teve 6 níveis de variação (2, 9, 16, 30, 40 e 50 dias de maturação). Os processamentos foram considerados como blocos (processamentos 1, 2 e 3 para cada um dos queijos). Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para avaliação do efeito dos tratamentos sobre a composição físico-química do queijo e do soro, a recuperação de proteína e gordura e o rendimento de fabricação dos queijos considerando-se apenas o efeito do coagulante. Para avaliação das características físico-químicas durante a maturação, foram avaliados, os efeitos independentes do coagulante, do tempo de maturação, bem como a interação entre estes fatores. Para comparações de médias foi utilizado o teste de Tukey considerando-se nível de significância de 5%. A análise de variância foi realizada no programa Minitab 14 e o teste de Tukey no programa Statistica 7.0.

4.6 Análise Sensorial

A avaliação sensorial foi realizada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo 1) e após a confirmação de que os produtos estavam de acordo com as especificações de segurança estabelecidas pela legislação brasileira (Brasil, 2001) que determina padrões para contagem de coliformes a 45 °C, estafilococos coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* para o queijo Prato. Estas análises foram realizadas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Os laudos contendo as metodologias analíticas utilizadas e os resultados encontram-se no Anexo 3.

A análise sensorial foi realizada no 26º dia de armazenamento refrigerado, aplicando-se um teste de aceitação a 100 assessores não treinados, no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos, FEA, UNICAMP.

Os testes foram realizados em cabines individuais, sob luz branca. Um cubo de queijo de cada tratamento foi servido em recipiente plástico adequado, devidamente codificado com números aleatórios de 03 dígitos. As amostras foram servidas acompanhadas de biscoito “cream cracker” e água mineral à temperatura ambiente, para remoção do sabor residual entre as amostras.

Os assessores receberam uma ficha com escala hedônica estruturada de nove pontos (1 = desgostei extremamente; 5 = nem gostei / nem desgostei; 9 = gostei extremamente) para avaliar o produto quanto à aparência, aroma, sabor, textura e impressão global (STONE e SIDEL, 1993). A impressão global foi apresentada através do gráfico de barras mostrando a frequência, que representa o número de pessoas que avaliaram o produto, relacionada com o número de respostas referentes à aceitação (notas de 6 a 9), indiferença (nota 5) ou rejeição (notas de 1 a 4) dos produtos. Para avaliar a intenção de compra foi empregada escala hedônica de cinco pontos (1 = certamente não compraria; 3 = tenho dúvidas se compraria ou não este produto; 5 = certamente compraria). A intenção de compra foi apresentada através do gráfico de barras mostrando a frequência, que representa o número de pessoas que avaliaram o produto, relacionada com o número de respostas referentes à escala hedônica de 5 pontos citada anteriormente. A ficha de Aceitação Sensorial de queijo Prato utilizada pelos assessores apresenta-se no Anexo 2.

Os resultados obtidos no teste de aceitação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) no programa Minitab, considerando-se como causa de variação as amostras e assessores, considerando um nível de significância de 5%. Os resultados da intenção de compra foram avaliados de forma gráfica, por histograma de barra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição dos leites cru e tratado termicamente

A Tabela 1 apresenta a composição média e o desvio padrão das amostras de leite destinado à fabricação do queijo Prato.

Tabela 1- Caracterização físico-química média e desvio padrão do leite utilizado na fabricação dos queijos (n=3).

Composição	Leite cru	Leite tratado termicamente
pH	6,78 ± 0,07	6,79 ± 0,07
Acidez (°D)	15,20 ± 1,05	16,26 ± 1,01
Densidade relativa a 15°C (g/mL)	1,032 ± 0,0	nd
Gordura (%)	3,43 ± 0,29	3,43 ± 0,29
Extrato seco total (%)	12,37 ± 0,35	11,82 ± 0,32
Cinzas (%)	nd	0,72 ± 0,02
NS pH 4,6 (%)	nd	0,12 ± 0,007
Proteína total (%)	nd	3,02 ± 0,22
NS TCA 12%	nd	0,03 ± 0,001
Caseína (% Proteína total)	nd	75,51 ± 2,88
Atividade da fosfatase alcalina	Positiva	Negativa
Atividade da lactoperoxidase	Positiva	Positiva

nd – não determinado

Observa-se que o leite utilizado na fabricação dos queijos atendeu aos padrões exigidos pela IN 62 (BRASIL, 2011) quanto aos parâmetros físico-químicos: mínimo 3% de gordura, acidez entre 14 a 18 °D, densidade relativa a 15 °C entre 1,028 a 1,034 g/mL e mínimo 2,9% de proteína total. Pode-se observar também que o tratamento térmico aplicado ao leite foi adequado, apresentando resultados negativo para a atividade da fosfatase alcalina e positivo para a lactoperoxidase.

5.2 Efeito do tratamento sobre o comportamento do pH durante o processamento dos queijos

A Tabela 2 apresenta o pH do leite e o comportamento do pH durante a fabricação do queijo para os diferentes tratamentos.

Tabela 2 - Valores de pH durante o processamento dos queijos (n=2).

Etapas	pH		
	Queijo Controle	Queijo Thermomucor	p*
Leite	6,73 ± 0,03	6,83 ± 0,06	0,193
Adição de Cultura	6,59 ± 0,00	6,61 ± 0,04	0,609
Corte	6,54 ± 0,01	6,52 ± 0,00	0,184
Primeira Dessora	6,5 ± 0,04	6,45 ± 0,01	0,189
Final do Aquecimento	6,5 ± 0,04	6,32 ± 0,08	0,097
Dessora Final	6,47 ± 0,04	6,24 ± 0,00	0,012
Enformagem	6,47 ± 0,04	6,24 ± 0,00	0,012
Queijos ¹	5,13 ± 0,11	5,08 ± 0,09	0,603

¹ queijos avaliados após 6 dias de fabricação

*Ao nível de 5% de significância

Observa-se na Tabela 2 que o pH não diferiu entre os tratamentos nas etapas iniciais de fabricação. A diferença no pH ocorreu na etapa final do processo, diferindo significativamente no momento da dessora final e enformagem do produto. Essa diferença não persistiu e os queijos, após 6 dias de fabricação, não apresentaram diferença no pH (5,13 para o Queijo Prato Controle e 5,08 para o Queijo Prato Thermomucor).

5.3 Composição dos queijos e dos soros

A Tabela 3 apresenta a composição físico-química dos queijos.

Tabela 3 - Caracterização físico-química média e desvio padrão dos queijos¹ (n=3).

Composição	Controle	Thermomucor	p*
pH	5,13 ± 0,11	5,08 ± 0,09	0,6027
Acidez (°D)	0,91 ± 0,13	0,98 ± 0,13	0,5935
Umidade (%)	44,0 ± 1,54	41,36 ± 1,47	0,0984
Gordura (%)	27,83 ± 2,60	29,33 ± 2,43	0,5058
GES ² (%)	49,67 ± 3,80	49,98 ± 2,87	0,9162
Proteína total (%)	22,97 ± 0,32	24,62 ± 0,41	0,0051
PES ³ (%)	41,03 ± 0,70	42 ± 1,02	0,2440
Caseína (% Proteína total)	95,22 ± 1,92	96,30 ± 1,02	0,4375
NS pH 4,6 (%)	0,16 ± 0,05	0,14 ± 0,03	0,6193
NS pH 4,6 (%NT) (%)	4,34 ± 1,44	3,54 ± 0,79	0,4503
NS TCA 12%	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,8830
NS TCA 12% (NT) (%)	1,68 ± 0,23	1,61 ± 0,47	0,8409
Cinzas (%)	4,03 ± 0,38	4,08 ± 0,12	0,8345
Sal	1,93 ± 0,24	1,90 ± 0,04	0,8645
S/U ⁴	4,38 ± 0,38	4,63 ± 0,29	0,4305
Firmeza (g)	1928 ± 390,10	2496 ± 333,52	0,1278

¹queijos com 6 dias de armazenamento; ² GES: Gordura no Extrato Seco; ³; PES: Proteína no Extrato Seco; ⁴ S/U: Sal na umidade.

* Ao nível de 5% de significância

Pode-se observar na Tabela 3 que os tratamentos não afetaram significativamente a composição dos queijos, exceto o teor de proteína total, que foi maior no queijo Thermomucor. No entanto, quando expresso em base seca, o teor de proteína não apresentou diferença entre os tratamentos. Esse resultado sugere que a diferença observada na porcentagem de proteína pode estar relacionada à diferença de 3% não significativa ao

nível de 5% de significância na umidade dos produtos. Ambos os queijos atenderam aos padrões exigidos pela legislação quanto ao teor de gordura no extrato seco (45-59,9%) e umidade (36-45,9%) (BRASIL, 1997) e apresentaram conteúdo médio de 42,68% \pm 1,87 de umidade, 28,58% \pm 1,06 de gordura e 1,91% \pm 0,021 de sal, estando de acordo com o esperado para queijo Prato (FURTADO e LOURENÇO NETO, 1994; SILVA, 2005). Resultados semelhantes de composição do queijo Prato também foram reportados por Augusto; Viotto (2008), Mazal et al. (2007), Silveira (2009), Tenório (2012). Estes resultados indicam que o uso dos diferentes coagulantes não afetou a composição dos queijos, que foi típica de queijo Prato.

A Tabela 4 apresenta a composição química média dos soros resultantes de cada processamento.

Tabela 4 - Caracterização físico-química média e desvio padrão dos soros (n=3).

Composição	Controle	Thermomucor	p*
pH**	6,42 \pm 0,07	6,18 \pm 0,04	0,049
Acidez ($^{\circ}$ D)**	12,28 \pm 0,86	13,94 \pm 0,96	0,212
Extrato seco total (%)	7,04 \pm 0,09	7,16 \pm 0,2	0,204
Gordura (%)	0,54 \pm 0,06	0,63 \pm 0,11	0,293
Proteína total (%)	0,78 \pm 0,03	0,85 \pm 0,03	0,056
NS pH 4,6 (%)	0,13 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,479
NS TCA 12%	0,04 \pm 0,003	0,05 \pm 0,01	0,057
Cinzas (%)	0,52 \pm 0,01	0,53 \pm 0,03	0,674

*Ao nível de significância de 5%

** n=2

Os tratamentos não afetaram as características do soro, com exceção do pH, que foi ligeiramente menor para o queijo Thermomucor, conforme observado durante o processo de fabricação (Tabela 2). Em relação aos teores de proteína e gordura do soro verifica-se que os mesmos estão de acordo a literatura. Perdas de gordura no soro variam e podem estar em torno de 0,41 a 0,80 (SPADOTI et al., 2003; SILVEIRA, 2009; AUGUSTO;

VIOTTO, 2008; SIQUEIRA et al., 2002) e perdas de proteína estão em torno de 0,62 a 0,98 (SILVEIRA, 2009; MAZAL et al., 2007; AUGUSTO; VIOTTO, 2008; SPADOTI et al., 2003). As características físico-químicas dos soros indicam comportamento similar dos coagulantes.

5.4 Efeito do tratamento na recuperação dos constituintes do leite e rendimento de fabricação dos queijos.

Com relação à recuperação dos constituintes do leite observa-se na Tabela 5 que os tratamentos não afetaram a recuperação de proteína e gordura do leite para os queijos e para os soros.

Tabela 5- Efeito dos tratamentos na recuperação dos constituintes no queijo, no soro e rendimento dos queijos (n=3).

	Controle	Thermomucor	p*
Recuperação no queijo (%)			
Proteína	76,21 ± 5,66	77,02 ± 5,53	0,868
Gordura	81,09 ± 6,63	80,62 ± 6,02	0,932
Recuperação no soro (%)			
Proteína	22,42 ± 1,68	25,18 ± 2,81	0,219
Gordura	13,51 ± 1,47	16,15 ± 2,48	0,187
Rendimento (%)			
Rendimento ajustado	9,57 ± 0,34	9,48 ± 0,40	0,518

*Ao nível de 5% de significância

Ao se observar o rendimento ajustado (Tabela 5), que leva em consideração os conteúdos de umidade e sal, real e desejável, verifica-se que o queijo Thermomucor não diferiu significativamente do queijo Controle. O rendimento ajustado foi similar aos observado por Mazal et al. (2007) e Silveira (2009) para os mesmos ajustes de umidade (42%) e sal (1,6%). Augusto; Viotto (2008) também não observou diferença no rendimento

ajustado para os queijos Prato fabricados com diferentes coagulantes e diferentes tipos de aquecimento.

5.5 Maturação dos queijos

A Tabela 6 apresenta o efeito do tratamento, do tempo de armazenamento, bem como da interação destes fatores sobre o pH, a acidez, umidade, a proteólise e firmeza durante a maturação.

Tabela 6 - Efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação tratamento x tempo sobre o pH, acidez, umidade, NS pH 4,6 (%NT), NS TCA 12% (%NT) e firmeza dos queijos durante a maturação obtidos na análise de variância (ANOVA) (n=3).

Fatores	GL	Valores de p					
		pH	Acidez	Umidade	NS pH 4,6 (%NT)	NS TCA 12% (%NT)	Firmeza
Coagulante	2	0,683	0,204	<0,0001	<0,0001	0,381	<0,0001
Tempo	5	0,554	<0,0001	0,273	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Coagulante xTempo	5	0,856	0,530	0,732	0,588	0,838	0,978

$P \leq 0,05$

A Tabela 6 mostra que os tratamentos, o tempo de armazenamento e a interação tratamento x tempo não afetaram o pH ao longo da maturação. Em média, o pH dos queijos foi $5,10 \pm 0,02$ e $5,09 \pm 0,03$ para os queijos fabricados com a protease do *Thermomucor* e com o coagulante comercial, respectivamente. Durante a maturação o pH pode diminuir, como verificou Dornellas (1997) devido a produção de ácido láctico por ação das bactérias lácticas ou aumentar, como observado por Silveira (2009) devido à formação de compostos nitrogenados alcalinos. Neste caso, como o pH não variou durante a maturação, pode-se supor que o aumento significativo de acidez ao longo do tempo (Figura 1) foi equivalente a produção de compostos nitrogenados, mascarando a variação do pH dos queijos ao longo do armazenamento.

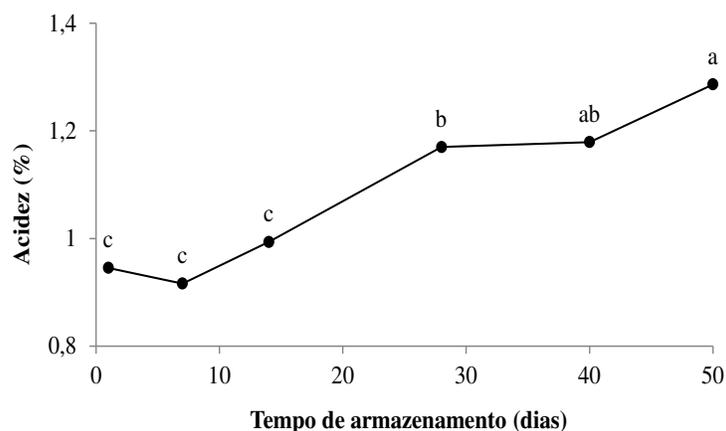


Figura 1 - Efeito do tempo de armazenamento sobre a acidez do queijo Prato durante a maturação (n=3). ^{a, b, c} Valores com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Verifica-se que o tempo de armazenamento não afetou a umidade dos queijos, porém, a umidade foi afetada pelos coagulantes, sendo menor para o queijo Thermomucor (Tabela 6). A umidade média do queijo Thermomucor foi $41,07 \pm 0,47$, enquanto que do queijo Controle foi $43,26 \pm 0,55$.

Os coagulantes e o tempo de armazenamento afetaram significativamente a proteólise [NS pH 4,6 (%NT)] do queijo Prato que, foi maior para o queijo Controle. Os queijos Thermomucor e Controle apresentaram, em média, $7,81 \pm 3,34$ e $9,75 \pm 3,81\%$ de NS pH 4,6 (%NT), respectivamente. Sugere-se que a maior proteólise nos queijos produzidos com o coagulante comercial pode ser decorrente de maior quantidade de coagulante ativo no coágulo, que leva a um aumento da clivagem das caseínas durante a maturação, uma vez que as proteinases do *Rhizomucor miehei* são caracterizadas por terem relativamente elevada atividade proteolítica e estabilidade ao calor (até 60 °C) (WALSH; LI, 2000; HARBOE et al., 2010), contribuindo para que permanecessem ativas após o tratamento da massa (42 °C). Já a protease do *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 não é tão termoestável (até 40-45 °C) (DINI, 2010) e provavelmente sofreu maior desnaturação durante a etapa de tratamento térmico da massa. De acordo com o trabalho realizado por Augusto (2003) verificando a eficiência do tipo de coagulante (*Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina obtida por fermentação) nas características do queijo Prato, ficou

evidenciado que os queijos fabricados com a protease do *Rhizomucor miehei* apresentaram os maiores índices de extensão da proteólise, mostrando a maior atividade proteolítica desse coagulante.

A Figura 2 apresenta o comportamento NS pH 4,6 (%NT) e do NS TCA 12% (%NT) dos queijos ao longo da maturação. O NS pH 4,6 (%NT) variou de $3,93 \pm 0,56$ a $13,08 \pm 1,42$ e o NS TCA 12% (%NT) variou $1,64 \pm 0,05$ a $5,93 \pm 0,09$ durante os 50 dias de maturação.

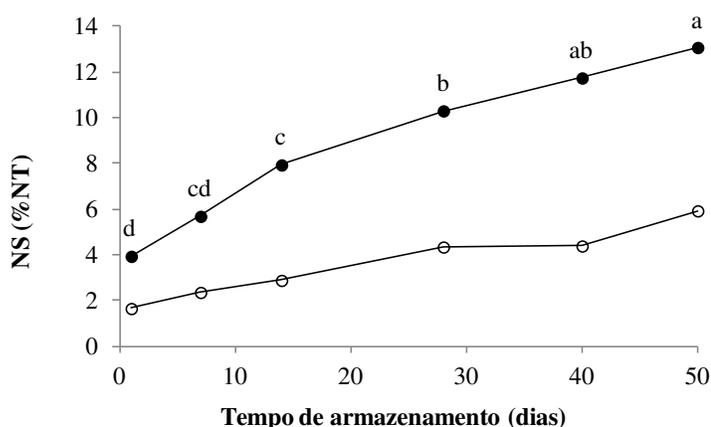


Figura 2 - Efeito do tempo de armazenamento sobre o teor de NS pH 4,6 (%NT) (●) e de NS TCA 12% (%NT) (○) do queijo Prato durante a maturação (n=3). ^{a, b, c, d} Valores com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

O aumento dos índices de maturação era esperado, pois essas frações nitrogenadas aumentam devido à degradação da caseína ao longo do tempo. Estudos realizados por Folegatti (1994), Narimatsu et al. (2003) e Spadoti et al. (2005) também observaram aumento do teor de NS pH 4,6 (%NT) e NS TCA 12% (%NT) durante a maturação.

Na Figura 3 encontra-se o perfil eletroforético dos queijos obtidos através da eletroforese em gel urea-PAGE.

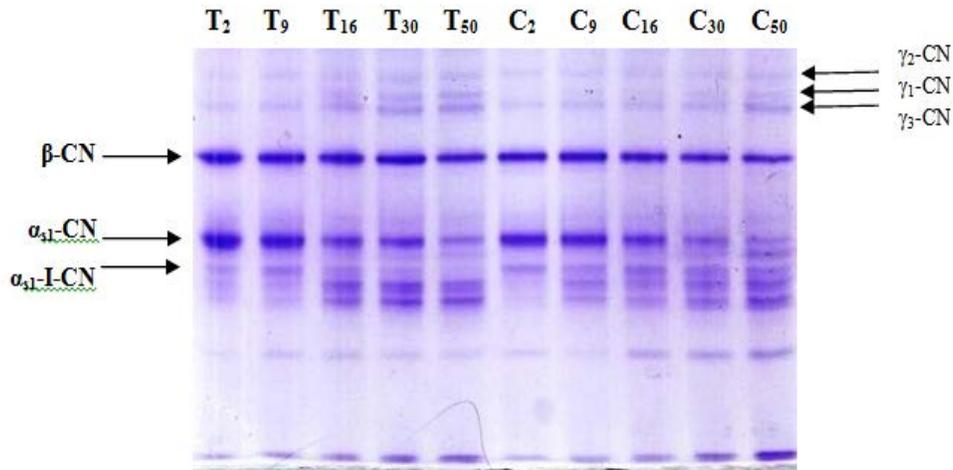


Figura 3 - Perfil de degradação das caseínas dos queijos Prato durante 50 dias de maturação. T representa os queijos fabricados com o coagulante do *Thermomucor indicaseudaticae* N31 (Thermomucor) e C os queijos produzidos com o com o coagulante comercial (Controle) e 2, 9, 16, 30 e 50 representam os dias de maturação apresentados no eletroferograma.

A Figura 3 mostra a degradação das caseínas dos queijos produzidos com o coagulante do *Thermomucor indicaseudaticae* N31 (T₂ a T₅₀) e com o coagulante comercial (C₂ a C₅₀) durante 50 dias de maturação. Nota-se degradação similar para ambos os coagulantes testados. Os resultados mostram que ocorreu o desdobramento gradual e crescente da α₁-caseína em α₁-I-caseína com o tempo de maturação para ambos os queijos evidenciando a ação residual do coagulante. Pode-se observar também o aparecimento de γ-caseínas com aumento da intensidade das bandas com o tempo, indicando uma possível ação da plasmina sobre a β-caseína. Durante a maturação a α₁-caseína é sempre a primeira a ser hidrolisada e geralmente é a mais extensivamente degradada (GRAPPIN et al., 1985). Comportamento similar de hidrólise foi observado para queijo Prato por Augusto (2003), Silveira (2009), Tenório (2012) e Merheb-Dini et al. (2012).

Ainda na Figura 3 pode-se observar uma degradação mais acentuada da α₁-caseína para os queijos Controle com maior formação de produtos de degradação, o que esta de acordo com o maior teor de NS pH 4,6 (%NT) deste queijo. A degradação da β-caseína foi

pequena para ambos os queijos, o que fica evidenciado que a proteólise ocorrida deveu-se fundamentalmente à ação do coagulante.

Observa-se na que a firmeza foi afetada significativamente pelos coagulantes e pelo tempo de armazenamento (Tabela 6). A firmeza do queijo Thermomucor (2296,23 g) foi maior que a do queijo Controle (1737,55 g). O maior conteúdo de umidade leva a uma mais rápida redução da firmeza do queijo durante a maturação (LUCEY; KELLY 1994). A maior firmeza do queijo Themomucor pode estar relacionada com o menor teor de umidade deste queijo e com a menor degradação da caseína [NS pH 4,6 (%NT)]. O fato de o queijo Controle provavelmente ter retido mais coagulante e ser mais úmido, refletiu na maior proteólise e menor firmeza deste queijo.

A Figura 4 mostra que a firmeza diminuiu com o tempo, o que já era esperado, uma vez que durante a maturação as frações proteicas são hidrolisadas, resultando no amolecimento dos queijos. Durante a maturação, o sítio primário da ação do coagulante é sobre α_{s1} -caseína na ligação Phe₂₃ – Phe₂₄. Acredita-se que a clivagem dessa ligação é responsável pelo amolecimento inicial de queijos. Os pequenos peptídeos formados desta clivagem são rapidamente hidrolisados pelas bactérias lácticas (FOX; McSWEENEY, 1997; UPADHYAY et al., 2004). A proteólise da caseína e dos seus produtos de degradação favorece a hidratação da matriz proteica e reflete na redução da firmeza, devido ao enfraquecimento da matriz (FOX et al. 2000).

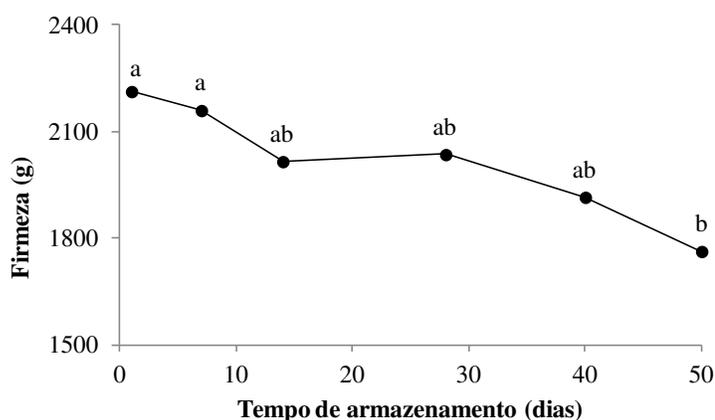


Figura 4 - Efeito do tempo de armazenamento sobre a firmeza do queijo Prato durante a maturação (n=3). ^{a, b} Valores com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Como não houve interação entre os fatores coagulante x tempo para nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 6) conclui-se que o pH, a acidez, a proteólise e a firmeza evoluíram de forma similar para ambos os queijos durante a maturação demonstrando o potencial da enzima do *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 como agente coagulante para a produção de queijos.

5.6 Análise Sensorial

Observa-se na Tabela 7 que ambos os queijos atendem aos padrões microbiológicos exigidos para o consumo do produto que estabelece a tolerância para amostra de contagem de coliformes a 45°C (n=5, c=2, m=5x10², M=10³), estafilococos coagulase positiva (n=5, c=2, m=10², M=10³), pesquisa de *Salmonella* sp. (ausente) e *Listeria monocytogenes* (ausente).

Tabela 7 - Padrão microbiológico dos queijos submetidos à avaliação sensorial (Anexo 3).

Análises	Queijo Prato Controle	Queijo Prato Thermomucor
Coliformes a 45°C (NMP/g) ¹	< 3	< 3
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g) ²	< 10	< 10
<i>Salmonella</i> spp (em 25g)	ausente	ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	ausente	ausente

¹NMP: Número mais provável por grama de amostra

²UFC: Unidade formadora de colônia por grama de amostra

A Tabela 8 mostra que nenhum dos parâmetros avaliados (aparência, aroma, sabor, textura, impressão global e intenção de compra) apresentou diferença significativa nos queijos, os quais tiveram boa aceitação (Figura 5) com notas para impressão global de 7,06 ± 1,33 e 7,13 ± 1,30, representando a categoria “gostei moderadamente” para ambos os queijos, Thermomucor e Controle, respectivamente.

Tabela 8 - Notas para os atributos dos queijos obtidas na avaliação sensorial (n=100).

Atributo	Queijo Prato Controle	Queijo Prato Thermomucor	p*
Aparência ¹	7,75 ± 1,00	7,55 ± 1,01	0,1604
Aroma ¹	7,31 ± 1,23	7,43 ± 1,20	0,4854
Sabor ¹	6,98 ± 1,40	7,07 ± 1,43	0,6533
Textura ¹	7,20 ± 1,55	6,99 ± 1,41	0,3176
Impressão global ¹	7,13 ± 1,31	7,06 ± 1,33	0,7080
Intenção de compra ²	3,81 ± 1,09	3,80 ± 1,02	0,9463

¹escala: 1 = desgostei extremamente, 7 = gostei moderadamente e 9 = gostei extremamente

²escala: 1= certamente não compraria este produto a 5 = certamente compraria este produto

*Ao nível de 5% de significância

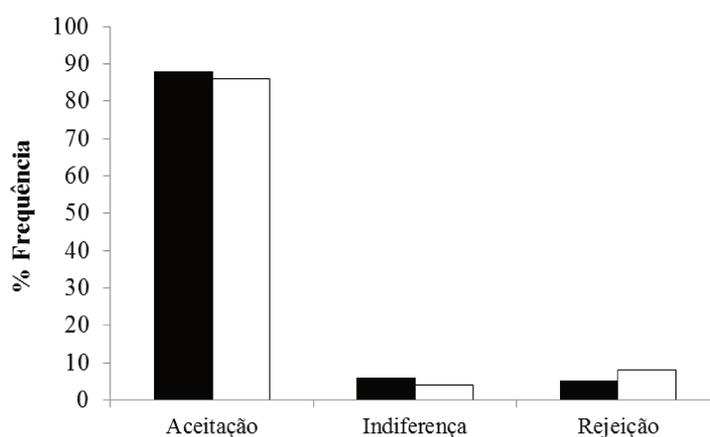


Figura 5 - Impressão global do queijo Thermomucor (■) e Controle (□). Aceitação: notas 6 a 9; Indiferença: nota 5; Rejeição: notas 1 a 4

A Figura 6 mostra a frequência de respostas dos assessores em relação à categoria intenção de compra dos queijos Thermomucor e Controle e mostra que a maioria provavelmente compraria os queijos.

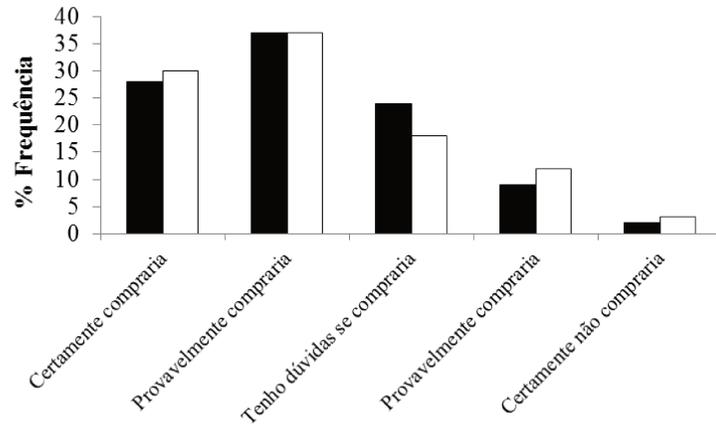


Figura 6 - Intenção de compra dos queijo Thermomucor (■) e Controle (□).

6. CONCLUSÕES

A comparação da protease do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 com uma protease fúngica comercial mostrou que a nova enzima testada não afetou a composição, o rendimento, o comportamento geral durante a maturação e as características sensoriais dos queijos obtidos. Sugere-se que a protease do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 tem potencial tecnológico para a fabricação de queijo Prato.

7. REFERÊNCIAS

ABIQ – Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Evolução do Mercado Brasileiro de queijos. 2012.

AHMED, S. A.; HELMY, W. A. Comparative evaluation of *bacillus licheniformis* 5A5 and *Aloe variegata* milk-clotting enzymes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 29, n.01, p. 69 - 76, January - March, 2012.

ANDRÉN, A. Rennets and coagulants. In Encyclopedia of dairy sciences. **Academic Press**, London, p. 281-286, 2002.

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

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. Washington, 2006.

ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var *lindt*. **Methods in Enzymology**, v. 19, p. 446-459, 1970.

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

AUGUSTO, M. M. M; VIOTTO, W. H. Efeito do tipo de coagulante e do cozimento da massa no rendimento de queijo Prato, fabricado em escala industrial. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, vol. 63, n. 360, p. 38-46, 2008.

BANKS, J. M. Cheese yield. In McSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Cheese problems solved**. Cambridge, Woodhead Publishing Limited. 2007. 402 p.

BENEDET, H. D. Enzimas coagulantes obtidas a partir da *Endothia parasítica*, *Mucor miehei* e renina: Diferenciação em gel de ágar caseína. **B. Ceppa**, v. 11, n. 01, p. 47-52, jan/jun, 1993.

BOURNE, M. **Food texture and viscosity: concept and measurement**. New York: Academic Press. 2ª ed., 2002. 427 p.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, em 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Instrução Normativa nº62, de 29 de setembro de 2011, que altera a IN 51 de 2002 e aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite Cru Refrigerado, do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, em 29 de dezembro de 2011. Seção 1. 2011.

BRASIL. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. Publicado no **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, em 08 de setembro de 1997.

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

CAVALCANTI, M. T. H. et al. Milk-clotting protease production by *Nocardiaopsis* sp in inexpensive medium. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p.151-154, 2005.

CHI, Z. et al. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential application. **Biotechnology Advances**, v.27, p. 236–255, 2009.

CHWEN, J. S.; LAN, A. P. T.; ING, L. S. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p.85–91, 2009.

CICHOSCHI, A. J. et al. Characterization of prato cheese, a brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, v.13, p. 329-336, 2002.

CRABBE, M. J. C. Rennets: general and molecular aspects. In FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese – Chemistry, physics, and microbiology** – vol. 1 – General Aspects. 3^a ed. London, 2004, 617 p.

CREAMER, L. K.; OLSON, N. F. Rheological evaluation of maturing cheddar cheese. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 2, p.631-636, 1982.

DEJMEK, P.; WALSTRA, P. The syneresis of rennet-coagulated curd. In FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese – Chemistry, physics, and microbiology** – vol. 1 – General Aspects. 3^a ed. London, 2004, 617 p.

DINI, C. M. **Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado.** 130p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

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

ECK, A. **Cheesemaking: science and technology.** 2ª ed., 1987, 533 p.

EMONS, D. B. Milk-clotting enzymes. 2. Estimating cheese yield losses from proteolysis during cheese making. **Journal Dairy Science**, v. 73, n. 08, p. 2016-2021, 1990.

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

FOLEGATTI, M. I. S. **Avaliação do uso de quimosina produzida por *Aspergillus niger* var. *awamori* na fabricação de queijo tipo Prato.** 65 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

FOX, P. F. Indigenous enzymes in milk – proteinases. In FOX, P. F. (Ed.). **Advanced dairy chemistry**, v. 1: Proteins, Blackie academic & professional. 1ªed., 1992. 767p.

FOX, P. F; McSWEENEY, P. L. H. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In LAW, B. A. (Ed.). **Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk.** Blackie academic & professional. 2ª ed., 1997. 365 p.

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

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science.** Gaithersburg: Aspen. 2000. 587 p.

FOX, P. F.; LAW, J. Enzymology of cheese ripening. **Food Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 239-262, 1991.

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

GLOBAL MARKETS – Enzymes in industrial applications, 2011.

GRAPPIN, R.; RANK, T. C.; FOLSON, N. F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 531-540, 1985.

GUNASEKARAN, S.; MEHMET AK, M. **Cheese rheology and texture**. CCR Press LLC, 2003. 437 p.

GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v. 45, p. 94-104, 1992.

HARBOE, M.; BROE, M. L.; QVIST, K. B. The production, action and application of rennet and coagulants. In LAW, B. A.; TAMIME, A. Y. (Ed.). **Technology of cheesemaking**, Blackwell Publishing , 2ª ed., 2010, 482 p.

HISLOP, D. B. Enzymatic coagulation of milk. In FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry**, v.1: Proteins, 3ª ed., part B. 2003, 713p.

HORNE, D. S.; BANKS, J. M. Rennet-induced coagulation of milk. In FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese – Chemistry, physics, and microbiology** – vol. 1 – General Aspects. 3ª ed. London, 2004, 617 p.

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.01, p. 14-33, 2011.

KLOOSTERMAN, J. The role of biotechnology in the manufacturing of wholesome natural ripened cheese. **Food Biotechnology**, v.5, n.3, p. 207-215, 1991.

KUBO, M. T. K. et al. Transference of lutein during cheese making, color stability, and sensory acceptance of Prato cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, p. 81-88, 2013.

KUMAR, S. et al. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 04, p. 243 – 258, 2010.

KUMAR, S. et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1701–1705, 2005.

LANARA - Secretaria de Defesa Agropecuária. M.A. **Métodos Analíticos Oficiais de Controle de Produtos de origem animal e seus Ingredientes**. II-Métodos Físicos e Químicos. Brasília-DF: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1981.

LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1748-1986, 1987.

LUCEY, J.; KELLY, J. Cheese yield. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 47, n.01, February, p. 1-14, 1994.

MACHALINSKI, C. et al. Structural aspects of the *Mucor bacilliformis* proteinase, a new member of the aspartyl-proteinase family. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 443-452, 2006.

MARTIN, N. et al. Pectinase production by a brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid-state and submerged fermentation. **Microbiology**, v. 79, n. 03, p. 306-313, 2010.

MAZAL, G. et al. Effect of somatic cell count on prato cheese composition. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 630-636, 2007.

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

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview. In In FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese – chemistry, physics, and microbiology** – vol. 1 – General Aspects. 3^a ed. London, 2004, 617 p. (b).

MERHEB-DINI, C. et al. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. **Food Chemistry**, v. 130, p. 859- 865, 2012.

MERHEB-DINI, C. et al. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v. 120, p. 87-93, 2010.

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

NEELAKANTAN, S.; MOHANTY, A.K.; KAUSSEHIK, J.K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 143 – 148. 1999.

O'CALLAGHAN, D. J.; GUINEE, T. P. Rheology and textura of cheese. In: FOX P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Ed.). **Cheese – chemistry, physics, and microbiology** – vol. 1 – General Aspects. 3^a ed. London, 2004, 617 p.

OLSON, N. F. Cheese. In REHM, H, J. NAGODAWITHANA, T. W. (Ed.) **Biotechnology: enzymes, biomass, food and feed**. Wiley-Blackwell, v. 9, 2^a ed., 1996. 804 p.

PEARSE, M. J.; MACKINLAY, A. G. Biochemical aspects of syneresis: A review. **Journal Dairy Science**, v. 72, p. 1401-1407, 1989.

PERRY, K. S. P; Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quím. Nova**, vol. 27, n.2, p. 293-300, 2004.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. Enzimas industriais e especiais. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**. Rio de Janeiro, 2006.

RICHARDSON, G.H. **Standard methods for examination of dairy products**. American Washington, Public Health Association: 1985.

ROGELJ. I; PERKO. B, FRANCKY. A; PENCA. V; PUNGERCAR J. Recombinant lamb as an alternative coagulating enzyme in cheese production. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1020-1026, 2001.

SARDINAS, J. L. Microbial rennets. In PERLMAN. D (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**, v.15. 1972, p. 39-73.

SCOTT, R. **Cheesemaking practice**. Third edition. New York. Kluwer academic/Plenum Publishers, 1998. 449 p.

SEBRAE; ESPM. **Queijos Nacionais** – Estudos de Mercado, 2008.

SHATA, H. M. A. Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, p. 241-247, 2005.

SHEEHAN, J. J. Acidification. In McSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Cheese problems solved**. Cambridge. Woodhead Publishing Limited. 2007. 402 p.

SILVA, F. T. **Queijo Prato**. Embrapa Informação Tecnológica, (Agroindústria Familiar), Brasília, DF. 2005. 54 p.

SILVA, G. A. B. et al. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da Fermentação em Estado Sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 03, n.01, p. 28-41, 2009.

SILVEIRA, A. C. **Fabricação e avaliação da maturação de queijo Prato obtido a partir de leite pré-acidificado com CO₂ e redução de coagulante**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA/UNICAMP, 2009, 68p.

SIQUEIRA, I. M. C. et al. Caracterização físico-química de quatro tipos de soro de queijo. **Revista Instituto Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 225-227, 2002.

SOUSA, M. J.; ARDÖ, Y.; McSWEENEY. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 327-345, 2001.

SOUSA, M. J.; MALCATA, F. X. Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 305-314, 1998.

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

SPADOTI, L. M. et al. Avaliação do rendimento do queijo tipo prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 23, n. 03, p. 492-499, 2003.

STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices**. New York: Academic Press, 308 p. 1993.

TENÓRIO, C. G. M. S. C. **Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e aplicação em queijo Prato**. 147 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

TURCO, C. Mercado de queijo, uma visão do Brasil. **Carta leite**, outubro, 2008. Disponível em: <<http://www.scotconsultoria.com.br/leite/mercado-leite/139/mercado-de-queijo-uma-visao-do-brasil.htm>>. Acesso em: 04 de jan. 2013.

UPADHYAY, V. K.; McSWEENEY, P. L. H. Acceleration of cheese ripening. In SMIT, G. **Dairy processing**. 2003. 532p.

UPADHYAY, V. K.; McSWEENEY, P. L. H.; MAGBOL, A. A. A.; FOX, P. F. Proteolysis in cheese during ripening. In: FOX P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Ed.). **Cheese – chemistry, physics, and microbiology** – vol. 1 – General Aspects. 3^a ed. London, 2004, 617 p.

VISHWANATHA, K. S.; APPU RAO, A. G.; SINGH, S. A. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.85, p. 1849–1859, 2010.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation cheese ripening and flavour. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.329–350, 1993.

WALSH, M. K.; LI, X. Thermal stability of acid proteinases. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 637-640, 2000.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology**. New York. Taylor & Francis: 2006. 739 p.

ANEXO 1

Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 28/06/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 470/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0400.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO DA PROTEASE DE *THERMOMUCOR INDICAE-SEUDATICA*E N31 PARA PRODUÇÃO DE QUEIJOS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carolina Merheb Dini

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/06/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/06/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Produzir queijo Prato e Parmesão com a protease coagulantes de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e avaliar a atuação da enzima durante a maturação dos mesmos para inferir sobre seu potencial tecnológico.

III – SUMÁRIO.

Serão selecionados voluntários para a avaliação sensorial dos atributos aparência, aroma, sabor e textura dos queijos. O extrato enzimático obtido do fungo foi analisado quanto à presença de micotoxinas pelo Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria Alimentar e Nutrição – Esalq/USP, cujo resultado foi negativo. Além disso, as análises exigidas pela legislação brasileira em relação ao padrão microbiológico do produto serão realizadas previamente à avaliação sensorial pelos voluntários. A hipótese do estudo é que esse novo coagulante possa ser empregado na produção dos queijos sem a necessidade de alterar os parâmetros tecnológicos tradicionais e que as características físico-químicas e sensoriais dos produtos obtidos sejam comparáveis aos queijos produzidos com o coagulante comercial. O emprego do novo coagulante poderia reduzir os custos de fabricação dos queijos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Estudo claro. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é sucinto e objetivo, esclarece a metodologia. Os provadores serão voluntários, maiores de 18 anos, convocados através de cartazes e avisos enviados por e-mail. O único risco envolvido seria alergia a um dos componentes dos queijos, para evitar tal ocorrência os voluntários deverão ser consumidores regulares de queijos. Os alimentos têm pesquisa negativa de micotoxinas e serão aprovados quanto aos padrões microbiológicos.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

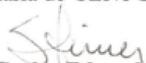
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de junho de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2

Ficha de aceitação aplicada aos provadores

Avaliação Sensorial de Queijo Prato			
Nome: _____		Data: _____	
Você está recebendo uma amostra codificada de queijo Prato. Por favor AVALIE o quanto você gostou ou desgostou da amostra, em relação aos parâmetros abaixo utilizando a escala:			
	Amostra _____	Amostra _____	
	Nota	Nota	9. Gostei extremamente
			8. Gostei muito
Aparência	_____	_____	7. Gostei moderadamente
Aroma	_____	_____	6. Gostei ligeiramente
Sabor	_____	_____	5. Nem gostei/nem desgostei
Textura	_____	_____	4. Desgostei ligeiramente
Impressão Global	_____	_____	3. Desgostei moderadamente
			2. Desgostei muito
			1. Desgostei extremamente
Por favor, INDIQUE qual a sua INTENÇÃO DE COMPRA em relação ao produto.			
Amostra: _____	Amostra: _____		
Nota: _____	Nota: _____		
			1. Certamente não compraria este produto
			2. Provavelmente não compraria este produto
			3. Tenho dúvidas se compraria ou não este produto
			4. Provavelmente compraria este produto
			5. Certamente compraria o produto
Comentários: _____			

Obrigada!			

ANEXO 3

Laudos Análises Microbiológicas



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ENSAIO RE 02.28-12	MATERIAL: Conforme descrito abaixo
CONTRATANTE: Mima Lúcia Gigante	DATA DE FABRICAÇÃO: vide abaixo
(Processo Fapesp nº 2011/51158)	DATA DE VALIDADE: vide abaixo
END: Rua Monteiro Lobato, 80 Cidade	DATA DE RECEBIMENTO: 24/01/2012
Universitária Zeferino Vaz Barão Geraldo	REALIZAÇÃO DA ANÁLISE: 24/01/2012
Campinas/SP CEP: 13083-971	DATA DE EMISSÃO DO LAUDO: 02/10/12
NATUREZA DAS ANÁLISES: Microbiológica	

1. IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Amostras	Identificação das Amostras	Lote	Fabricação	Validade
Queijo Prato Processo 2 Tratamento 1 (N31)	RAm 110/12	Não consta	19/09/12	Não consta
Queijo Prato Processo 2 Tratamento 2 (Comercial)	RAm 111/12	Não consta	19/09/12	Não consta

2. METODOLOGIAS

2.1. Preparo de amostras e diluições

DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.). 2001. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4. Ed American Public Health Association, Washington, D. C.

2.2. Coliformes a 30-35°C e a 45°C

- ISO 4831. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms – Most probable number technique, 3rd Ed. The International Organization for Standardization, 2006

- ISO 7251. Microbiology of food and animal stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli – Most probable number technique. 3rd Ed. The International Organization for Standardization, 2005

RAm 110/12 e RAm 111/12 p.1/3



CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE LATICÍNIOS
Av. Brasil, 2380 • CEP 13.070-178 • Campinas/SP • Brasil
Tel. 19 3743-1860 • Fax 19 3743-1862
<http://www.ital.sp.gov.br/tecnolab>



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

2.3. Estafilococos coagulase positivo

- HENNING, D. R.; FLOWERS, R. REISER, R.; RYSER, E. T. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F. (ed.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17th. Robert T. Marshall (ed.). American Public Health Association. Washington, D.C., 2004. Chapter 5, p.103-152.

2.4. *Salmonella* spp

- ISO and IDF. **ISO 6785 / IDF 93: milk and milk products – Detection de Salmonella spp.** Suíça, 2001

3. RESULTADOS DAS ANÁLISES

DETERMINAÇÕES	Queijo Prato Processo 2 Tratamento 1 (N31) (RAm 110/12)	Queijo Prato Processo 2 Tratamento 2 (Comercial) (RAm 111/12)
Coliformes a 30-35°C (NMP/g)*	> 1.100	1.100
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3	< 3
Estafilococos coag. positiva (UFC/g)**	< 10	< 10
<i>Salmonella</i> spp (em 25 gramas de amostra)	ausente	ausente

* NMP - Número mais provável por grama de amostra

** UFC - Unidade formadora de colônia por grama de amostra

4. OBSERVAÇÕES

Os resultados destas análises têm validade somente para as amostras analisadas.

As análises foram realizadas com equipamentos e vidrarias calibrados. Suas incertezas estão de acordo com os critérios de aceite estabelecidos pelo Sistema da Qualidade do ITAL e não entram no cálculo dos resultados apresentados, mas estão disponíveis.

Parecer e interpretações dos resultados expressos não fazem parte do escopo da habilitação deste laboratório pela REBLAS.

Este relatório somente é válido com as assinaturas ou rubricas originais em todas as suas páginas.

RAm 110/12 e RAm 111/12 p.2/3



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

5. RESPONSÁVEIS TÉCNICOS

Fabiana Trento
Pesquisador Científico
TECNOLAT

Izildinha Moreno
Pesquisador Científico
Diretor Técnico do TECNOLAT

Este relatório somente poderá ser reproduzido na íntegra.
A reprodução parcial requer aprovação formal deste laboratório.



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº CQ 6609/2012MB

MATERIAL: Queijo Prato Processo 2 Tratamento 1 (N31) – Ram 110/12, Fabricação 19/09/12

INTERESSADO: Mirna Lúcia Gigante – Projeto Fapesp 2011/51158-8

ENDEREÇO: Rua Monteiro Lobato, 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, S/nº, Barão Geraldo, Campinas (SP)

DATA DE RECEBIMENTO DA(S) AMOSTRA(S): 25/09/2012

DATA DE ANÁLISE: 26/09/2012

DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO: 08/10/2012

NATUREZA DA(S) ANÁLISE(S): Microbiológica

RESPONSÁVEL(EIS): Valéria C. A. Junqueira, Maristela S. Nascimento

1. MÉTODO(S)

ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: detection method, 1st ed. The International Organization for Standardization, 1996. Amendment 1:2004.

2. RESULTADO(S)

Determinação	Resultado
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	ausente

3. OBSERVAÇÕES

a) O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material, cuja identificação foi fornecida pelo interessado. Os resultados aplicam-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu controle. b) Este relatório só tem valor oficial quando impresso em papel com marca d'água, com assinaturas ou rubricas originais em todas as páginas. Sua reprodução só pode ser feita na íntegra, sendo requerida autorização formal deste laboratório para reprodução parcial.

Visto:


Beatriz Thie Iamanaka
Vice Diretor Técnico de Serviço
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia


Maristela S. Nascimento
Pesquisador Científico
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia



CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS
Av. Brasil, 2880 • CEP 13.070-178 • Campinas/SP • Brasil
Tel. 19 3743-1781/1810/1786 • Fax 19 3242-4585
email: ccqa@ital.sp.gov.br
<http://www.ital.sp.gov.br>





GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº CQ 6610/2012MB

MATERIAL: Queijo Prato Processo 2 Tratamento 2 (Comercial) – Ram 111/12, Fabricação 19/09/12

INTERESSADO: Mirna Lúcia Gigante – Projeto Fapesp 2011/51158-8

ENDEREÇO: Rua Monteiro Lobato, 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, S/nº, Barão Geraldo, Campinas (SP)

DATA DE RECEBIMENTO DA(S) AMOSTRA(S): 25/09/2012

DATA DE ANÁLISE: 26/09/2012

DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO: 08/10/2012

NATUREZA DA(S) ANÁLISE(S): Microbiológica

RESPONSÁVEL(EIS): Valéria C. A. Junqueira, Maristela S. Nascimento

1. MÉTODO(S)

ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: detection method, 1st ed. The International Organization for Standardization, 1996. Amendment 1:2004.

2. RESULTADO(S)

Determinação	Resultado
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	ausente

3. OBSERVAÇÕES

a) O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material, cuja identificação foi fornecida pelo interessado. Os resultados aplicam-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu controle. b) Este relatório só tem valor oficial quando impresso em papel com marca d'água, com assinaturas ou rubricas originais em todas as páginas. Sua reprodução só pode ser feita na íntegra, sendo requerida autorização formal deste laboratório para reprodução parcial.

Visto:


Beatriz Thie Iamanaka
Vice Diretor Técnico de Serviço
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia


Maristela S. Nascimento
Pesquisador Científico
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia



CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS
Av. Brasil, 2880 • CEP 13.070-178 • Campinas/SP • Brasil
Tel. 19 3743-1781/1810/1786 • Fax 19 3242-4585
email: ccqa@ital.sp.gov.br
<http://www.ital.sp.gov.br>



1/1