

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Engenharia de Alimentos**  
**Departamento de Tecnologia de Alimentos**

**EFEITO DO USO COMBINADO DE ÁCIDO LÁTICO COM  
DIFERENTES PROPORÇÕES DE FERMENTO LÁTICO  
MESOFÍLICO NO RENDIMENTO, PROTEÓLISE, QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICA E PROPRIEDADES MECÂNICAS DO QUEIJO  
MINAS FRESCAL**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Alessandra Cristina Campos, aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de maio de 2000.

**Alessandra Cristina Campos**

Autora

**Walkíria Hanada Viotto**

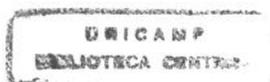
Orientadora

Campinas, 08 de maio de 2000.

*Walkíria H. Viotto*  
Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto  
Presidente da Banca

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Tecnologia de Alimentos**

Campinas, 2000



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

2000 5433

JUNIDADE BC  
N.º CHAMADA:  
T/UNICAMP  
C157e  
V. \_\_\_\_\_ Ex. \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 41469  
PROC. 278/00  
C  D   
PRECOS RB.11,00  
DATA 11-07-00  
CPD

CM-00143188-7

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

C157e Campos, Alessandra Cristina  
Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesofílico no rendimento, proteólise, qualidade microbiológica e propriedades mecânicas do queijo minas frescal / Alessandra Cristina Campos. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1. Queijo de Minas. 2. Ácido láctico. 3. Rendimento.  
4. Microbiologia. I. Viotto, Walkíria Hanada. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III. Título.

**Banca Examinadora**

*Walkiria H. Viotto*

---

**Dra. Walkiria Hanada Viotto**

(orientadora)

*Salvador Massagué Roig*

---

**Dr. Salvador Massagué Roig**

(membro)

*Antes*

---

**Dr. Lúcio Alberto F. Antunes**

(membro)

---

**Dra. Ariene Gimenes F. Van Dender**

(membro)

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO 1 – <i>Queijo Minas Frescal – Uma Revisão</i></b>	<b>5</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Queijo Minas Frescal fabricado com fermento láctico</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Queijo Minas Frescal fabricado com ácido láctico</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Queijo Minas Frescal fabricado sem a utilização de fermento ou de ácido láctico</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Queijo Minas Frescal fabricado através de ultrafiltração</b>	<b>10</b>
<b>2. Uso de ingredientes em queijo Minas Frescal</b>	<b>11</b>
<b>3. Transformações bioquímicas que ocorrem durante a estocagem refrigerada</b>	<b>12</b>
<b>4. Qualidade microbiológica</b>	<b>15</b>
<b>5. Referências bibliográficas</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 2 <i>Rendimento de Queijo Minas Frescal Fabricado com Ácido Láctico e Diferentes Proportões de Fermento Láctico Mesofílico</i></b>	<b>23</b>
<b>Resumo</b>	<b>24</b>
<b>Summary</b>	<b>25</b>
<b>Introdução</b>	<b>26</b>
<b>2. Material e Métodos</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Fabricação do queijo</b>	<b>27</b>
<b>2.2. Análises do leite, soro e queijo</b>	<b>28</b>
<b>2.3. Cálculos de Recuperação e Rendimento</b>	<b>28</b>
<b>3. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados</b>	<b>29</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Composição do leite, soro e queijo</b>	<b>30</b>
<b>4.2. Recuperação de gordura e proteína e rendimento do queijo</b>	<b>32</b>
<b>5. Discussão</b>	<b>34</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>35</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b>	<b>35</b>

<b>Capítulo 3 - Efeito do Uso Combinado de Ácido Lático e Diferentes Proporções de Fermento Lático Mesofílico na Qualidade Microbiológica do Queijo Minas Frescal</b>	<b>37</b>
<b>Resumo</b>	<b>38</b>
<b>Summary</b>	<b>39</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>40</b>
<b>2. Material e métodos</b>	<b>42</b>
<b>2.1. Fabricação do queijo</b>	<b>42</b>
<b>2.2. Análises do leite, soro e queijo</b>	<b>43</b>
<b>2.3. Análises microbiológicas do leite e queijo</b>	<b>43</b>
<b>3. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados</b>	<b>44</b>
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>45</b>
<b>5. Referências bibliográficas</b>	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO 4 - Proteólise e Propriedades Reológicas de Queijo Minas Frescal Fabricado com Ácido Lático e Diferentes Proporções de Fermento Lático Mesofílico</b>	<b>58</b>
<b>Resumo</b>	<b>59</b>
<b>Summary</b>	<b>60</b>
<b>Introdução</b>	<b>61</b>
<b>2. Material e Métodos</b>	<b>62</b>
<b>2.1. Fabricação do queijo</b>	<b>62</b>
<b>2.2. Análises do leite, soro e queijo</b>	<b>63</b>
<b>2.3. Análises reológicas do queijo: Compressão Uniaxial</b>	<b>64</b>
<b>2.3.1. Análise dos dados</b>	<b>64</b>
<b>2.4. Eletroforese em Uréia-PAGE</b>	<b>65</b>
<b>3. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados</b>	<b>66</b>
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>67</b>
<b>4.1. Composição</b>	<b>67</b>
<b>4.2. Evolução do pH e acidez</b>	<b>68</b>
<b>4.3. Proteólise</b>	<b>70</b>
<b>4.4. Eletroforese</b>	<b>72</b>
<b>4.5. Reologia</b>	<b>74</b>

<b>5. Conclusão</b>	<b>78</b>
<b>6. Referências bibliográficas</b>	<b>78</b>

## RESUMO GERAL

Esse trabalho teve por objetivo avaliar o uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesofílico (zero, 0,1% e 0,5%) no rendimento e qualidade físico-química e microbiológica do queijo Minas Frescal. Foi determinada a composição físico-química do leite, soro e queijo, a recuperação de gordura e proteína nos queijos e o rendimento de fabricação. Semanalmente, durante 21 dias, foram avaliadas a qualidade microbiológica (contagem total, coliformes a 30°C e 45°C, bolores e leveduras), a acidificação, a proteólise e as propriedades reológicas dos queijos. A mudança na proporção de fermento láctico não afetou significativamente ( $p>0,16$ ) a composição físico-química, a recuperação de gordura, recuperação de proteína e o rendimento dos queijos. Entretanto, os queijos com 0,5% de fermento apresentaram menores valores de recuperação de gordura e proteína e, conseqüentemente, menores valores de rendimento. Para todas as análises de contaminantes realizadas, os queijos sem fermento apresentaram contagens mais altas, confirmando a proteção que o fermento confere aos queijos, mesmo que em pequenas proporções. Valores de pH e acidez mantiveram-se estáveis nos queijos sem fermento durante os 20 dias de estocagem, diferindo significativamente ( $p=0,05$ ) dos queijos com fermento, onde o pH diminuiu e a acidez aumentou durante o mesmo período. Os índices de extensão e profundidade de proteólise aumentaram significativamente ( $p=0,0001$ ) com o tempo. Com relação à extensão da proteólise, os maiores níveis foram observados nos queijos sem fermento, diferindo significativamente dos queijos com fermento ( $p=0,05$ ). Estatisticamente, os queijos não apresentaram diferenças significativas ( $p=0,05$ ) para profundidade de proteólise, mas pode ser observada uma tendência de aumento dos índices de Nitrogênio solúvel em TCA12%/NT conforme aumentou-se a

proporção de fermento utilizada. Com relação ao comportamento reológico, os queijos sem fermento mostraram maiores valores para tensão na ruptura ( $\sigma_{rup}$ ), módulo de elasticidade (E) e trabalho na ruptura ( $W_{rup}$ ), e menores valores para deformação ( $\epsilon_{Hrup}$ ), sendo essas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,05$ ) para módulo de elasticidade e deformação. A utilização de 0,1% de fermento mostrou-se uma boa alternativa na fabricação do queijo Minas Frescal, pois não causou redução no rendimento, apresentou níveis de acidificação e proteólise aceitáveis e conferiu proteção contra microorganismos contaminantes.

## INTRODUÇÃO GERAL

Existem centenas ou até milhares de diferentes tipos de queijo. No Brasil, o Minas Frescal é dos mais consumidos, sendo recente e originário das fabricações caseiras difundidas no estado de Minas Gerais.

É um queijo fresco, coagulado enzimaticamente e pode ser produzido utilizando-se fermento láctico mesofílico e/ou ácido láctico e até mesmo sem a adição de ambos. Tradicionalmente fabricado com a adição de 1,0 a 1,5% de fermento, hoje, grande parte do Minas Frescal consumido em todo o país é produzido substituindo-se o fermento pelo ácido láctico. A maioria das fábricas adotou essa substituição procurando aumentar o rendimento de fabricação e, também, a vida de prateleira dos queijos.

O alto rendimento de fabricação é um fator muito importante quando se pensa em garantir a viabilidade econômica da produção de queijos. Apesar da importância econômica do Minas Frescal, poucos trabalhos foram realizados avaliando o rendimento resultante das diferentes tecnologias de fabricação do queijo. Segundo WOLFSCHOON-POMBO *et al*, (1978), a substituição de 1,5% de fermento láctico mesofílico por ácido láctico resultou em aumento de rendimento devido a uma maior retenção de umidade no queijo. Uma maior vida de prateleira para os queijos fabricados somente com ácido láctico é causada pela eliminação das enzimas do fermento, que aceleram os processos de glicólise e proteólise, tornando os queijos ácidos e com textura amolecida, rapidamente.

Porém, o Minas Frescal é um queijo bastante vulnerável a contaminações microbiológicas. Apresenta alto teor de umidade, baixa porcentagem de sal e é muito manuseado durante as etapas de enformagem, viragem e embalagem. Com a substituição do fermento por ácido láctico, esse queijo passou a ter um pH elevado e não possui mais as

bactérias do fermento que, além de competirem com os microorganismos contaminantes pelo substrato, muitas vezes produzem compostos antimicrobianos.

Assim, esse trabalho teve como objetivo encontrar uma proporção ótima de fermento láctico mesofílico que conseguisse proteger o queijo contra microorganismos contaminantes e, ao mesmo tempo, não prejudicasse seu rendimento e vida de prateleira.

Para tanto, foram avaliados o rendimento, a qualidade microbiológica, a acidificação, a proteólise e o comportamento reológico de queijo Minas Frescal fabricado através de três diferentes tratamentos: somente com ácido láctico, com ácido e 0,1% de fermento e com ácido e 0,5% de fermento. Esse balanço proteção microbiológica-rendimento-vida de prateleira pode ser obtido através da escolha adequada das proporções de ácido e fermento empregadas.

## **Capítulo 1**

### ***QUEIJO MINAS FRESCAL – UMA REVISÃO***

## Queijo Minas Frescal – Uma Revisão

### 1. Introdução

O queijo Minas Frescal pode ser considerado um tipo de queijo desenvolvido no Brasil e, que teve sua origem nas fabricações caseiras difundidas no estado de Minas Gerais. (OLIVEIRA, 1986). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, a produção nacional de queijo Minas Frescal aumentou de 16,1 toneladas em 1993 para 25,6 toneladas em 1997, sendo atualmente o terceiro queijo mais produzido no país.

O Minas Frescal é um queijo fresco, ou seja, que está pronto para o consumo logo após sua fabricação. É um queijo magro, que contém entre 10,0 e 24,9% de gordura, sendo, ainda, considerado um queijo de muito alta umidade, com um teor de água superior a 55%. (BRASIL – MAARA, 1996).

Devido ao seu alto teor de umidade é um queijo bastante perecível, com durabilidade média de 10 dias e um rendimento médio de 6,0-6,5 litros de leite/ kg de queijo. Geralmente apresenta coloração interna esbranquiçada, consistência mole, textura fechada (com algumas olhaduras irregulares) e sabor variando de levemente ácido a suave (FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994).

A fabricação tradicional do queijo Minas Frescal sofreu modificações ao longo do tempo, visando melhorias na qualidade do produto final, aumento de rendimento de fabricação, maior vida útil, padronização e segurança para a saúde pública. Por ser um queijo de tecnologia simples, facilmente elaborado e de fabricação artesanal, diferentes procedimentos de produção são adotados pelos fabricantes. Assim, há queijos feitos por adição somente de coalho, outros feitos pelo método tradicional com adição de cultura láctica, queijos fabricados com ácido láctico em substituição ao fermento e ainda, os queijos

obtidos pelo processo de ultrafiltração. A não existência de um padrão bem definido do queijo, aliado a falta de exigência do consumidor faz com que todos se denominem e sejam comercializados como queijo Minas Frescal, apesar de, evidentemente, resultarem em queijos com qualidade e características bem diferentes. A indústria brasileira tem adotado majoritariamente o processo de fabricação do Minas Frescal com adição de ácido láctico, sem uso de fermento, em virtude de possível aumento no rendimento de fabricação e menor grau de alterações indesejáveis durante o armazenamento refrigerado. Esta revisão discute os vários métodos de fabricação do queijo, com especial ênfase sobre o rendimento de fabricação, a qualidade microbiológica e as mudanças físico-químicas e bioquímicas que ocorrem durante o armazenamento refrigerado do Minas Frescal.

### **1.1. Queijo Minas Frescal fabricado com fermento láctico**

O Minas Frescal é um queijo de coagulação enzimática, possui massa crua e nenhuma cura, sendo fabricado, tradicionalmente, com a utilização de 1,0% de fermento láctico mesofílico (OLIVEIRA, 1986). Pode-se dizer que o fermento tem três finalidades básicas na fabricação de queijos: desenvolvimento de acidez, formação de olhaduras e formação de sabor e aroma.

Com relação à utilização de culturas lácteas na fabricação do Minas Frescal, ISEPON & OLIVEIRA (1995) concluíram que o emprego de 1,0% de culturas simples ou mistas de *S. lactis* e *S. cremoris* não afeta o rendimento do processamento, porém, pode ser importante para o desenvolvimento do sabor láctico em queijos processados com leite cru. VAN DENDER & MORENO (1992), estudando diversos métodos de fabricação de queijo Minas Frescal, selecionaram três alternativas tecnológicas e concluíram que, o uso de culturas termofílicas (0,5%) e de temperaturas mais altas para coagulação, aumentou a vida

útil do queijo, pois este apresentou menor desenvolvimento microbiano durante estocagem refrigerada. Determinaram ainda que a associação de ácido láctico a 0,1% de fermento láctico mesofílico ou termofílico permitiu a obtenção de um pH inicial mais propício à ação do coalho, diminuindo o tempo de coagulação e aumentando a firmeza da coalhada e, que a menor proporção de fermento, tanto mesofílico quanto termofílico, aumentou a durabilidade do queijo durante sua estocagem devido a menor intensidade de acidificação e proteólise ocorridas.

## **1.2. Queijo Minas Frescal fabricado com ácido láctico**

Alguns pesquisadores (VAN DENDER & MORENO, 1992; WOLFSCHOON-POMBO *et al.*, 1978) estudaram a utilização de ácido láctico industrial como substituto do fermento láctico. Esta alteração na tecnologia de fabricação teve como resultados principais o aumento da umidade, aumento do pH final do queijo, diminuição da acidez e maior perda de sólidos solúveis no soro, se comparados com queijos produzidos convencionalmente. Apesar da maior perda de sólidos no soro, a utilização de ácido láctico aumenta o rendimento dos queijos.

A perda de sólidos no soro, no processo onde se utiliza o ácido láctico, pode ser explicada pelo fato do leite com fermento conter um maior número de bactérias lácticas e sofrer maior hidrólise da lactose, resultando em maior produção de ácido láctico durante a fabricação. Este fato favorece a atuação da quimosina que possui melhor atuação em meio ácido; o seu pH ideal de atuação sobre a caseína do leite é de 5,5 (VEISSEYRE, 1975) ou de 4,0 - 4,5 (ALAIS, 1974). Com um coágulo menos rígido, o queijo fabricado com ácido láctico retém menos sólidos, quando comparado com o queijo fabricado com a utilização de 1,5% de fermento láctico.

O aumento no rendimento quando da utilização do ácido láctico deve-se ao aumento no teor de umidade no extrato seco total do queijo, já que, uma coalhada menos ácida retém mais facilmente o soro. Isto acontece porque, ao se coagular o leite, a caseína em complexo com o cálcio e o fósforo, forma o paracaseinato de cálcio. A permeabilidade dessa estrutura está ligada à presença de cálcio. A acidificação favorece a drenagem do soro, aumentando a permeabilidade do gel como consequência da desmineralização da coalhada. Adicionalmente, o queijo Minas Frescal fabricado com uso de ácido láctico apresenta na estocagem menores alterações que os fabricados tradicionalmente com fermento láctico, apresentando corpo mais firme, menor alteração na coloração da casca e sabor menos ácido (VAN DENDER & MORENO, 1992; FURTADO *et al*, 1980; WOLFSCHOON-POMBO *et al.*, 1978)

Devido ao aumento no rendimento e na vida de prateleira do queijo, essa tecnologia tem sido a mais utilizada pelos fabricantes.

### **1.3. Queijo Minas Frescal sem a utilização de fermento ou de ácido láctico**

FURTADO *et al.* (1980a), apontaram algumas desvantagens do uso do fermento láctico em um queijo de consumo imediato como o Minas Frescal, uma vez que o fermento proporciona proteólise e acidificação com o tempo de estocagem refrigerada, resultando em uma massa amolecida, coloração da casca amarelada e sabor ácido. Essas alterações que ocorrem durante o armazenamento do Minas Frescal, estão relacionadas à degradação enzimática da lactose residual e da matéria protéica.

Levando em consideração que o Minas Frescal é um queijo destinado ao consumo quase que imediato, ou seja, não tem maturação, FURTADO *et al* (1980a) estudaram a viabilidade da fabricação deste produto sem a utilização de culturas lácticas, concluindo,

através dos resultados obtidos, que o processo estudado trazia um aumento no rendimento da fabricação e no período de vida útil do produto.

Segundo FURTADO *et al.* (1980b) o queijo sem fermento apresentou um rendimento da fabricação maior quando comparado ao queijo fabricado pelo método tradicional, com fermento láctico e, um rendimento menor se comparado ao queijo com ácido láctico. Essas variações estão ligadas às diferenças de pH e acidez titulável em cada processo. O queijo sem fermento, por possuir uma acidez mais baixa desde o início do processo, foi o que apresentou uma coalhada menos firme e que, conseqüentemente, reteve menos elementos do leite. Entretanto, foi a que reteve mais umidade, pois quanto menor a acidificação menor a desmineralização protéica, dificultando a dessoragem espontânea do queijo. Com relação à textura e sabor, os queijos fabricados com ácido láctico e os fabricados sem fermento e sem ácido mostraram-se muito parecidos, e com alterações ao longo do tempo muito mais leves que o queijo fabricado pelo método tradicional. Esses pesquisadores observaram ainda que pode haver um aumento dos casos de estufamento precoce relacionados à supressão do fermento do processo, pois as bactérias lácticas do fermento desempenham um papel importante na proteção contra os microorganismos causadores deste defeito, através do consumo rápido da lactose e pelo abaixamento do pH.

#### **1.4. Queijo Minas Frescal fabricado através de ultrafiltração**

No Brasil, desde 1988 vem sendo comercializado um tipo de queijo Minas Frescal produzido por ultrafiltração. O queijo é fabricado a partir de retentados obtidos da ultrafiltração do leite até um fator de concentração em torno de 4. Esse leite é coagulado na própria embalagem, com a adição opcional de fermento e ácido láctico (VAN DENDER, 1995)

O produto tem tido boa aceitação no mercado, porém é considerado bem diferente do produto tradicional, principalmente com relação ao sabor e à consistência (MORTENSEN, 1992). Segundo VIEIRA *et al* (1983,1984) e VAN DENDER (1995), a fabricação de queijo Minas Frescal por ultrafiltração traz vantagens econômicas de alto rendimento, além de um produto com características desejáveis e melhor qualidade higiênica.

## **2. Uso de ingredientes em queijo Minas Frescal**

Visando ainda uma melhoria na qualidade, no rendimento e nos custos de fabricação do Minas Frescal, outros estudos foram realizados.

GIGANTE & ROIG (1991) determinaram que a substituição de gordura láctea por gordura vegetal na fabricação de Minas Frescal é viável e, que essa substituição proporciona um aumento das cifras de transição de gordura e sólidos totais do leite para o queijo, resultando em um processo com maior rendimento. SOUZA *et al* (1992) produziram queijo Minas Frescal com extrato solúvel desengordurado de soja (ESD), encontrando um queijo mais firme com 4% de ESD e um melhor rendimento utilizando-se 16% de ESD. Segundo TADINI (1994), o uso de até 0,8% de caseinato de cálcio no Minas Frescal aumenta o rendimento de fabricação, diminui o efeito de dessoramento durante o período de armazenamento, aumenta o teor de proteínas totais do queijo e diminui o teor de gordura. RODRIGUES & BRANDÃO (1995) concluíram que a adição de 0,5% de concentrado protéico de soro elimina a formação de soro do queijo Minas Frescal.

### **3. Transformações bioquímicas durante a estocagem refrigerada**

Apesar de não ser um queijo curado, o Minas Frescal sofre uma série de reações bioquímicas durante o armazenamento refrigerado, no período compreendido entre a produção e o consumo.

O teor residual de lactose no queijo tem um papel importante na sua qualidade, visto que mudanças na acidez titulável e no pH estão diretamente ligadas à quantidade de ácido láctico produzido pela fermentação da lactose. A conversão de lactose em ácido láctico é realizada através de um processo enzimático conhecido como glicólise. As enzimas necessárias à degradação do carboidrato são fornecidas pela flora natural do leite e pelos microrganismos do fermento láctico (CASAGRANDE & WOLFSCHOON-POMBO, 1988).

No que se refere à produção de queijo Minas Frescal, o desenvolvimento de acidez é a consequência mais importante da ação do fermento por contribuir para o sabor levemente ácido, característico deste tipo de queijo. O desenvolvimento de acidez se inicia durante a fase de elaboração no tanque e tem importância fundamental na qualidade de queijo devido a: 1) Controle de contaminação: bactérias do fermento transformam a lactose em ácido láctico, evitando que a lactose seja utilizada como substrato para fermentações indesejáveis e, ao mesmo tempo, com o abaixamento do pH, inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis; 2) Formação de sabor: em queijos frescos, o ácido láctico formado durante a elaboração é um dos principais responsáveis pelo sabor do queijo; 3) Formação de corpo e textura do queijo: a formação de ácido láctico regula o processo de desmineralização da coalhada, que afeta o teor final de cálcio do queijo e, conseqüentemente, seu corpo e textura; 4) Melhoria na atuação do coalho: o coagulante tem seu pH ideal por volta de 4,1, por isso a adição de fermento ao leite melhora a atuação do coalho (FURTADO, 1990).

O acúmulo do ácido láctico provoca o abaixamento do pH e o aparecimento do sabor ácido característico no queijo. Entretanto, um excesso na produção de ácido láctico pode conduzir a um sabor muito ácido no queijo (CASAGRANDE & WOLFSCHOON-POMBO, 1988)

Outra reação bioquímica de grande importância para a textura do queijo Minas Frescal é a proteólise, ou seja, a hidrólise enzimática das proteínas. A proteólise em queijos é afetada por inúmeros fatores, incluindo atividade residual do coagulante, proteases naturais do leite, como a plasmina, proteinases e peptidases liberadas pelos microrganismos do fermento láctico, enzimas de microrganismos presentes no queijo, como contaminantes e/ou sobreviventes à pasteurização, taxas de umidade, pH, caseína e sal na umidade (ISEPON, 1995). O queijo Minas Frescal é um queijo consumido sem maturação, porém a tecnologia de fabricação e a proteólise que ocorre durante a sua vida útil influenciam decisivamente na consistência, sabor e durabilidade do produto, sobretudo quando são usados coagulantes microbianos e fermento láctico mesofílico (BONDZYSKI, citado por WOLFSCHOON-POMBO & LIMA, 1989). Quanto mais intensa for a proteólise, mais macia será a consistência do queijo e seu aroma mais pronunciado. No queijo Minas Frescal, a proteólise avançada, caracterizada por uma cor amarelada e uma consistência mole, é um atributo negativo da sua qualidade (WOLFSCHOON-POMBO, 1978). De acordo com CREAMER & OLSON (1982), o amolecimento inicial da estrutura dos queijos está relacionado à hidrólise da  $\alpha_{s1}$ -caseína, liberando  $\alpha_{s1-1}$  caseína, causada, principalmente, pela ação do coagulante.

A intensidade da proteólise dos queijos pode ser mensurada através de índices chamados de “extensão” e “profundidade”. O índice de extensão da proteólise se

caracteriza pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis (NS) acumuladas durante o processo e expressas como porcentagens do nitrogênio total (NT).

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

A determinação analítica é baseada na precipitação isoelétrica da caseína em pH 4,6 em uma amostra diluída do queijo, e na quantificação das substâncias solúveis através do método de Kjeldahl. O coalho é responsável pela produção de grande parte do nitrogênio solúvel em pH 4,6 e somente por uma pequena parcela do nitrogênio solúvel em TCA 12% (FOX, 1988). Portanto, a extensão da proteólise deve-se, principalmente, à ação proteolítica do coalho sobre as caseínas do leite (DESMAZEAUD & GRIPON, 1977). No Minas Frescal, devido ao curto tempo de estocagem refrigerada, o coalho é o principal responsável pela proteólise primária do queijo.

A profundidade da proteólise abrange as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, acumuladas durante o processo. Ela pode ser quantificada através do teor de nitrogênio não protéico (NNP), solúvel em ácido tricloroacético, ou pela determinação direta dos aminoácidos produzidos e expressos como percentual da proteína total (NT).

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

Entende-se por NNP aquelas substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular que não precipitam na presença de ácido tricloroacético a 12% e que, conseqüentemente, são quantificadas nos respectivos filtrados (WOLFSCHOON-POMBO, 1989).

As proteinases e peptidases do fermento láctico atuam sobre os peptídeos liberados, principalmente pelo coalho, produzindo aminoácidos e compostos de baixo peso molecular. Logo, o índice de profundidade de proteólise relaciona-se à atividade proteolítica do fermento durante a estocagem refrigerada do queijo (O'KEEFFE *et al*, 1978).

#### **4. Qualidade microbiológica**

DORNELLAS (1997), avaliou o desempenho de três diferentes coagulantes, fabricando queijos com a utilização de ácido láctico ou de fermento láctico (1,0%) e concluiu que os diferentes tratamentos não interferiram no rendimento de fabricação. Foi constatado também que o uso de ácido láctico pode ser uma boa solução para os problemas de conservação do produto, porém o produto obtido com acidificação direta mostrou-se mais susceptível à contaminações microbianas. Em outro estudo, LOURENÇO NETO (1998), comparando o uso de ácido láctico associado a 0,1% de culturas termofílicas com queijos fabricados exclusivamente com ácido láctico concluiu que, em princípio, o uso dessas culturas pode vir a se constituir numa ferramenta importante para o controle da microbiota contaminante do queijo e que, com relação aos atributos sensoriais não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

Estudos avaliando a qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal no Brasil, mostram que, grande parte dos produtos analisados encontra-se fora dos padrões permitidos pela legislação brasileira. RAIMUNDO *et al* (1991) analisaram amostras de queijo Minas Frescal disponíveis no comércio do Rio de Janeiro, determinando que apenas 44% delas apresentavam condições microbiológicas aceitáveis. HOFFMANN *et al* (1994) e RODRIGUES *et al* (1995), em pesquisa realizada na região de São José do Rio Preto-SP e

Viçosa-MG, respectivamente, encontraram 100% das amostras de Minas Frescal fora dos padrões.

A legislação vigente no Brasil segue as normas estabelecidas pelo MERCOSUL (Portaria 146 de 07.03.1996), onde, o Minas Frescal é por definição um queijo “de muito alta umidade”. A Tabela 1 apresenta os padrões microbiológicos exigidos para o queijo Minas frescal fabricado com fermento láctico e a Tabela 2, para o queijo Minas Frescal fabricado sem fermento. A legislação brasileira prevê uma maior tolerância a alguns contaminantes, como coliformes termotolerantes (45°C) e estafilococos, para os queijos fabricados somente com ácido láctico, pois eles não possuem a proteção contra contaminantes conferida pelo uso do fermento (Brasil – MAARA, 1996).

Além dos problemas microbiológicos, que podem estar relacionados à tecnologia de fabricação, procedimentos de higiene e sanitização na fábrica, levando-se em conta o pessoal, os equipamentos e as instalações, ou ainda à cadeia de frio, desde a embalagem até o consumidor, o Minas Frescal enfrenta também, um problema de identidade, ou seja, a composição química deste queijo varia bastante com a região e, até mesmo com a indústria que o produz.

Segundo um trabalho realizado por SAITO & SCHIFTAN (1978), onde foi estudada a composição de queijo Minas Frescal fabricado no estado de São Paulo, a porcentagem de amostras fora dos padrões regulamentares para umidade e gordura, indica necessidade de maior frequência das análises para controle de qualidade nos estabelecimentos industriais. As variações obtidas nos índices de acidez, sal e cinzas dos queijos comerciais sugerem providências de ordem tecnológica e estudos para o estabelecimento de padrões.

TABELA 1. Queijos de muita alta umidade com bactérias lácticas em forma viável e abundante (Umidade>55%)

Microorganismo	Critério e Aceitação			
	n	c	m	M
Coliformes/g (30°C)	5	3	100	1.000
Coliformes/g (45°C)	5	2	10	100
Estafilo coagulase positiva	5	2	10	100
Fungos e Leveduras/g	5	2	500	5000
<i>Salmonella ssp</i>	5	0	0	
<i>Listeria monocitogenes</i>	5	0	0	

Fonte: Portaria nº 146, de 7 de março de 1996 - MAARA

TABELA 2. Queijos de mais alta umidade sem bactérias lácticas em forma viável e abundante (Umidade>55%)

Microorganismo	Critério e Aceitação			
	n	c	m	M
Coliformes/g (30°C)	5	2	100	1000
Coliformes/g (45°C)	5	2	50	500
Estafilo coagulase positiva	5	1	100	500
Fungos e Leveduras/g	5	2	500	5000
<i>Salmonella ssp</i>	5	0	0	
<i>Listeria monocitogenes</i>	5	0	0	

Fonte: Portaria nº 146, de 7 de março de 1996 - MAARA

Levando-se em consideração a importância econômica do queijo Minas Frescal no mercado brasileiro, estudos têm de ser realizados buscando-se uma tecnologia de fabricação

que proporcione um queijo dentro dos padrões microbiológicos, com composição físico-química padronizada e maior vida de prateleira, sem comprometer o rendimento de fabricação.

## 5. Referências bibliográficas

ALAIS, C. **Science du Lait**. Chimia. 2ª edição, cap. 28, p. 597-604, 1974.

BRASIL. MAARA – Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária.

Portaria nº 146, de 7 de março de 1996 consta do item 2 Descrição do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial**, 11 de mar. De 1996. P. 3977-3986.

CASAGRANDE, H.C.; WOFSCHOON-P, A.F. Fermentação da lactose no queijo Minas

Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v 43, n.258, p. 38 – 40, 1988.

CREAMER, L.K., OLSON, N.F. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese.

**Journal of Food Science**. v. 47, p.631, 1982.

DESMAZEAUD, M. J.; GRIPON, J. C. general mechanism of protein breakdown during

cheese ripening. **Milchwissenschaft**. Kiel, v. 32, p. 731-734, 1977.

DORNELLAS, J. R. F. Efeito do Tipo de Coagulante e Acidificante no Rendimento,

Proteólise e “Shelf Life” do Queijo Minas Frescal. **Dissertação de mestrado** – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1997.

FOX, P.F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. **Biotechnology**

**and Applied Biochemistry**. San Diego, v. 10, p. 522-535, 1988.

- FURTADO, M. M.; SOUZA, H. M. ; MUNCK, A. V. A fabricação do queijo Minas Frescal sem o emprego de culturas lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v 35 n 207, p 15-21, 1980a.
- FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON-POMBO-P, A.F.; SOUZA, H. M. ; MUNCK, A. V.. Estudo conclusivo a respeito da fabricação do queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v 35 n 208, p 13-16, 1980b.
- FURTADO, M.M. Defeitos específico de algumas variedades de queijos. In: **A arte e a ciência do queijo**. 2<sup>a</sup> Edição. São Paulo: Globo, 1990. cap. 9, p. 239-279. (Publicação Globo Rural).
- FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. Queijo Minas Frescal. In **Tecnologia de Queijos**. 1<sup>a</sup> Edição. p. 73-75, 1994.
- GIGANTE, M.L.; ROIG, S.M. Substituição de gordura láctea por gordura vegetal em queijo Minas Frescal. **Anais do XXXII Semana do Laticinista**. EPAMIG/ILCT. p. 77– 84, 1991.
- HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VENTURIM, T.M.; POSSEBON, A. Qualidade microbiológica de queijo tipo “Minas Frescal” e queijos condimentados comercializados na região de São José do Rio Preto. **Anais do XXXII Semana do Laticinista**. EPAMIG/ILCT. p. 61– 64, 1991.
- ISEPON,J.S.; OLIVEIRA, J.A. Variação do índice de proteólise na aceitabilidade do queijo tipo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.15, n.1, p. 1 – 5, 1995.
- ISEPON,J.S.; OLIVEIRA, J.A. Influência do emprego de culturas lácticas nas características do queijo tipo Minas Frescal. **Anais do XIII Congresso Nacional de Laticínios**. EPAMIG/ILCT. p. 287 – 290, 1995.

- LOURENÇO NETO, J.P.M. O uso de culturas lácticas na fabricação de Minas Frescal como alternativa de melhoria de qualidade. **I Seminário Internacional “Queijos Frescos”**. Atibaia, 1998.
- MORTENSEN, H. MD Foods do Brasil – A threshold to South America. **Scandinavian Dairy Information**. Aarhus, Denmark, v.6, n.2, p.26-27, 1992.
- O’KEEFFE, A.M.; FOX, P.F.; DALY, C. Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. **Journal of Dairy Research**. London, v. 45, p. 465-477, 1978.
- OLIVEIRA, J.S. **Queijo: Fundamentos Tecnológicos**. 2ª Edição. São Paulo: Editora da UNICAMP, Ícone Editora LTDA, 1986, 146p.
- RAIMUNDO, S.M.C.; FAVARIN, V.; ROBBS, P.G.; SILVA, P.P.O.; HAUA, M.J. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal no comércio do Rio de Janeiro. **Anais do XXXII Semana do Laticinista**. EPAMIG/ILCT. p. 169– 172, 1991.
- RODRIGUES, F.T.; VIEIRA, M.D.; SANTOS, J.L.; PIERRE, S.J.; ARAÚJO, W.C.; ANDRADE, N.J.; BRANDÃO, S.C.C. Características microbiológicas de queijos tipo Minas Frescal comercializados em Viçosa-MG. **Anais do XIII Congresso Nacional de Laticínios**. EPAMIG/ILCT. p. 233 – 235, 1995.
- SAITO, T.; SCHIFTAN, T.Z. Estudos da composição de queijo Minas Frescal, fabricado no estado de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 33, n. 199, p. 29-37, 1978.
- RODRIGUES, W.S.; BRANDÃO, S.C.C. Tecnologia para a fabricação de queijo Minas Frescal que não dessora, usando leite adicionado de “Dairy-Lo”. **Anais do XIII Congresso Nacional de Laticínios**. EPAMIG/ILCT. p. 215 – 217, 1995.

- SOUZA, R.D.N.; ANTUNES, L.A.F.; SILVA, R.S.F. Produção de queijo Minas Frescal contendo proteína de soja. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 12, n. 2, p. 145-152, 1992.
- TADINI, C.C. Utilização de Caseinato de Cálcio na produção de queijo Minas Frescal. **Anais do XII Congresso Nacional de Laticínios**. EPAMIG/ILCT. p. 189 – 197, 1994
- VAN DENDER, A.G.F.; MORENO, I. Estudos de processos alternativos para fabricação de queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 47, n. 279/281, p. 76-77, 1992.
- VAN DENDER, A.G.F. Contribuição ao estudo do uso de ultrafiltração na fabricação de queijo Minas Frescal. **Tese de Doutorado**. FEA-UNICAMP, Campinas, 1995.
- VEISSEYRE, R. **Lactologia Técnica**. Editorial ACRIBIA, Zaragoza. 2ª edição, 629p, 1988.
- VIEIRA, S.D.A.; GOUDÉDRANCHE, H.; DUCRUET, P.; MAUBOIS, J.-L. Éléments de fabrication d'un nouveau fromage brésilien de type "Minas Frescal" par le procédé M.M.V. **La Technique Laitière**, Rennes, France, 978: 17-20, juil/août, 1983.
- VIEIRA, S.D.A.; GOUDÉDRANCHE, H.; DUCRUET, P.; MAUBOIS, J.-L. Parâmetros para a fabricação de queijo Minas Frescal por meio de ultrafiltração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 39, n. 235, p. 53-58, 1984.
- WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; FURTADO, M. M.; MUNCK, A. V. Estudo da fabricação do queijo Minas Frescal com ácido láctico em substituição do fermento láctico, **Anais do V Congresso Nacional de Laticínios**. EPAMIG/ILCT. p 160 –182, 1978.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; CASAGRANDE, H.R.; LOURENÇO NETO, J.P.M.;  
MUNCK, A.V. Alterações no Queijo Minas Frescal durante o período de  
armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v 39, n.233, p.  
3-9,. 1984.

WOLFSCHOON-POMBO., LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise no queijo  
Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v 44, n.261/266,  
p. 50 - 54,. 1989.

## **Capítulo 2**

### ***RENDIMENTO DE QUEIJO MINAS FRESCAL FABRICADO COM ÁCIDO LÁTICO E DIFERENTES PROPORÇÕES DE FERMENTO LÁTICO MESOFÍLICO<sup>1</sup>***

---

<sup>1</sup> Trabalho enviado para publicação à Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**RENDIMENTO DE QUEIJO MINAS FRESCAL FABRICADO COM ÁCIDO  
LÁTICO E DIFERENTES PROPORÇÕES DE FERMENTO LÁTICO  
MESOFÍLICO<sup>2</sup>**

Alessandra C. CAMPOS, Walkíria H. VIOTTO<sup>2\*</sup>

**RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo avaliar o rendimento e a recuperação de gordura e proteína do queijo Minas Frescal fabricado pela combinação de ácido lático com diferentes proporções (zero, 0,1 e 0,5%) de fermento lático mesofílico. Os ensaios foram realizados em triplicata, resultando em nove experimentos. A composição físico-química do leite, soro e queijo foi determinada. O aumento da proporção de fermento lático não influenciou a composição dos queijos, com exceção do pH e do teor de cálcio que diminuíram levemente com o aumento da concentração de fermento lático, mas sem apresentar diferenças significativas ( $p=0,05$ ). A quantidade de fermento lático não influenciou as recuperações de gordura e proteína e o rendimento dos queijos ( $p=0,05$ ). Entretanto, algumas tendências puderam ser observadas. Houve perdas maiores de sólidos totais, gordura, proteína e NNP e menor perda de sal no soro de queijos fabricados com 0,5% de fermento lático. A recuperação de gordura e proteína foi maior para os queijos fabricados com zero e 0,1% de cultura, diferindo dos queijos fabricados com 0,5%, que apresentaram menor recuperação

<sup>1</sup>Recebido para publicação em

<sup>2</sup>Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, Departamento de Tecnologia de Alimentos, CP 6121, 13.083-970 Campinas, S.P. (e-mail: walkiria@fea.unicamp.br)

<sup>3</sup> A quem a correspondência deve ser enviada

de gordura e proteína. O aumento da proporção de cultura láctica empregada resultou em diminuição do rendimento de fabricação do queijo Minas Frescal.

**Palavras-chave:** Minas Frescal, fermento, ácido láctico, rendimento, composição.

## SUMMARY

**YIELD OF MINAS FRESCAL CHEESE USING LACTIC ACID AND DIFFERENT STARTER PROPORTIONS.** The objectives of this work were to determine the fat and protein recoveries and yield of Minas Frescal cheese made by the combination of lactic acid and different proportions of mesophilic starter (zero, 0,1 e 0,5%). Three vats of chese were made for each treatment, resulting in nine experiments. Changes in pH and titrable acidity of milk and whey were monitorized during the cheese making. Chemical composition of milk, whey and cheese was determined. Increase of starter proportion did not affect cheese composition, with exception to the pH and calcium content that decreased slightly as the starter proportion increased, but did not show statistical significant difference. The different proportions of starter did not affect the fat and protein recoveries and cheese yield ( $p=0,05\%$ ). However, there were some trends. Cheese manufactured with 0,5% of starter presented highest losses of total solids, fat, protein and NNP in whey. The fat and protein recoveries were higher for cheeses made with zero and 0,1% of culture. However, cheeses manufactured with 0,5% showed low recovery of fat and protein. Cheese yield decreased with increasing proportion of starter used in Minas Frescal cheesemaking.

**Keywords:** Minas Frescal, starter, lactic acid, yield, composition.

## 1- INTRODUÇÃO

Queijo Minas Frescal é um produto que possui ampla aceitação no mercado brasileiro, podendo ser encontrado em todo o país. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, a produção nacional de queijo Minas Frescal aumentou de 16,1 t em 1993 para 25,6 t em 1997, sendo atualmente o terceiro queijo mais produzido no país.

Um dos principais fatores que garantem a viabilidade econômica da produção de queijos é o rendimento. Os principais elementos que afetam esse parâmetro são: composição do leite (principalmente gordura e proteína), porcentagem de transição (ou recuperação) dos constituintes do leite para o queijo e a porcentagem de umidade retida [4]. Também a qualidade do leite, aditivos, como coalho e fermento láctico e tecnologia de fabricação são determinantes para o rendimento de queijos [9].

Devido a um possível aumento no rendimento de fabricação, grande parte das fábricas tem substituído o fermento láctico mesofílico por ácido láctico no processo de fabricação do Minas Frescal. Essa substituição poderia implicar em um maior rendimento da fabricação, pois a menor acidificação do queijo aumentaria sua capacidade de retenção de água [12]. Entretanto, com essa substituição, os queijos deixam de ter a proteção contra microrganismos contaminantes conferida pelo fermento.

Esse trabalho avaliou o uso combinado de ácido láctico e diferentes proporções de fermento láctico mesofílico no rendimento do queijo Minas Frescal em comparação com um padrão, fabricado somente com ácido láctico.

O uso do ácido láctico foi mantido, pois com o abaixamento do pH deve haver uma melhor atuação do coalho, formando uma coalhada mais firme que deve reter mais elementos do leite. O fermento foi utilizado com o objetivo principal de conferir proteção

ao queijo contra microrganismos contaminantes. Para evitar alterações indesejáveis, como proteólise e acidificação intensas, o fermento foi empregado em baixas proporções: 0,1% e 0,5%.

O rendimento de fabricação foi avaliado para cada tratamento. A acidificação, a proteólise e a proteção contra microrganismos contaminantes foram avaliados para cada tratamento durante os 21 dias de armazenamento refrigerado e serão apresentados em trabalhos posteriores.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Fabricação do Queijo

Leite proveniente da granja leiteira Fazenda São Francisco – Sheffá e da Cooperativa Agropecuária de Campinas, foi padronizado de forma a manter a relação caseína/gordura igual a 0,8. O leite padronizado era pasteurizado a 72°C por 15 s, resfriado a 5°C e armazenado em latões de 50 litros, em câmara fria a 5°C durante a noite. No dia seguinte, cerca de 100 litros de leite eram aquecidos a 37°C em tanque encamisado, pesados e transferidos para o tanque de fabricação. Os queijos foram processados segundo técnica descrita por FURTADO, LOURENÇO NETO [7].

Na fabricação dos queijos foi utilizado ácido láctico industrial (85%, marca Synth), na proporção de 0,025% e diferentes proporções de fermento láctico mesofílico: zero, 0,1 e 0,5%. A cultura utilizada foi a R-703, fornecida pela Chr. Hansen, composta de *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*. O ácido láctico foi previamente diluído em água destilada a 2,5%, para prevenir precipitação de proteínas [6]. Para a coagulação foi utilizado coalho Chymax, fornecido pela Chr. Hansen.

A salga foi realizada na massa, antes da enformagem. O sal (marca Lebre) foi diluído em 4 litros de água, na proporção de 2% do peso do leite.

Todo o soro retirado foi homogeneizado e pesado. Após 24 horas de permanência na câmara de refrigeração, os queijos foram pesados (cada queijo apresentava aproximadamente 1 kg), sendo então embalados em sacos plásticos. Para cada tratamento foram conduzidas três repetições.

## 2.2. Análises do leite, soro e queijo

pH e acidez titulável [3] do leite e soro foram acompanhados durante o processo de fabricação do queijo. O teor de gordura do leite e soro foi determinado pelo método modificado de extração com éter Mojonnier [2]. Na determinação de gordura em queijos usou-se o método volumétrico de Gerber [8]. Para as análises de nitrogênio total [2], nitrogênio não caseico [11] e nitrogênio não protéico [1] foi utilizado o método de Kjeldahl [2], sendo os valores de nitrogênio multiplicados pelo fator de conversão 6,38 para obtenção dos valores equivalentes de proteína. Sólidos totais em leite, soro e queijo foram determinados por método gravimétrico [2]. O conteúdo de sal no queijo foi determinado pelo método de Volhard [10]. O teor de cálcio foi determinado por digestão úmida do queijo, seguida de titulação com EDTA, na presença de murexida [12].

## 2.3. Cálculos de Recuperação e Rendimento

Recuperação de Gordura e Nitrogênio: A porcentagem de recuperação (%R) de gordura e nitrogênio foi calculada para soro e queijo, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\%R \text{ componente no produto} = \frac{\text{peso produto} \times \% \text{ componente produto}}{\text{peso leite} \times \% \text{ componente leite}} \quad (1)$$

Sendo o produto o soro ou o queijo e, o componente a gordura ou o nitrogênio.

A recuperação total (RT) de gordura ou nitrogênio também foi calculada:

$$RT = \%R \text{ soro} + \%R \text{ queijo} \quad (2)$$

A recuperação total dificilmente será igual a 100% devido ao acúmulo dos erros experimentais, tanto das determinações de gordura e proteína, quanto das medidas de peso. Para neutralizar pequenas diferenças ocorridas de um tanque para outro, foram calculadas também as porcentagens relativas de recuperação de gordura e nitrogênio no soro e queijo, normalizando os valores para 100%.

Rendimento: O rendimento do queijo foi calculado de acordo com a equação 3:

$$\text{rendimento} = \frac{\text{peso de queijo após embalagem}}{\text{peso de leite}} \quad (3)$$

Devido à variações nos teores de umidade e sal, foi calculado também o rendimento ajustado para todos os queijos. O rendimento ajustado (RAJ) foi calculado considerando-se o conteúdo desejado de sal de 1,5% e umidade de 60%.

$$RAJ = \frac{\text{rendimento} [100 - (\%umidade \text{ real} + \%sal \text{ real})]}{100 - (\%umidade \text{ desejada} + \%sal \text{ desejada})} \quad (4)$$

### **3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS**

O delineamento experimental foi do tipo aleatorizado em blocos. O fator estudado foi a porcentagem de fermento láctico empregada, sendo utilizado nos níveis zero, 0,1 e 0,5%. Esses três ensaios foram realizados em triplicata, resultando em nove experimentos.

Os resultados obtidos foram analisados através de Análise de Variância, utilizando-se o teste de Duncan para verificar diferenças entre as médias.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1. Composição do leite, soro e queijo

Composição do leite: valores de sólidos totais, gordura, proteína, caseína, NNP, caseína/proteína, caseína/gordura e pH, relativos aos leites utilizados na fabricação dos queijos são apresentados na *Tabela 1*. Não houve diferença significativa ( $p=0,05$ ) entre a composição físico-química dos leites usados para os diferentes tratamentos.

A padronização dos teores de caseína/gordura do leite, para todos os tratamentos, foi um fator importante para a obtenção de queijos com composições semelhantes.

**TABELA 1.** Média (n=3) da composição do leite usado na fabricação dos queijos com zero, 0,1 e 0,5% de fermento láctico.

Componente	% de fermento láctico		
	Zero	0,1	0,5
ST % <sup>1</sup>	11,33	11,11	11,03
Gordura %	3,06	3,01	3,01
Proteína %	3,02	3,02	3,01
Caseína %	2,34	2,31	2,29
NNP % <sup>2</sup>	0,14	0,15	0,14
C/PT <sup>3</sup>	81,35	80,34	79,86
C/G <sup>4</sup>	0,77	0,76	0,76
pH	6,60	6,60	6,61

<sup>1</sup> Conteúdo de Sólidos Totais

<sup>2</sup> Conteúdo de Nitrogênio Não Protéico

<sup>3</sup> Relação Caseína/Proteína Total

<sup>4</sup> Relação Caseína/Gordura

Composição do soro: Estatisticamente, não se verificou diferença significativa ( $p=0,05$ ) entre as composições dos soros resultantes dos três diferentes tratamentos (*Tabela 2*). Entretanto, algumas tendências puderam ser observadas: 1)O aumento da proporção de fermento láctico resultou em maior perda de sólidos do leite no soro; 2)O soro do queijo com 0,5% de cultura apresentou um maior teor de gordura, proteína, NNP e, conseqüentemente, de sólidos totais; 3)Como esperado, o pH de dessora diminuiu quando a porcentagem de fermento aumentou.

**TABELA 2.** Média ( $n=3$ ) da composição do soro obtido na fabricação dos queijos com zero, 0,1 e 0,5% de fermento láctico.

Componente	% de fermento láctico		
	Zero	0,1	0,5
ST % <sup>1</sup>	7,99	8,03	8,15
Gordura %	0,30	0,29	0,36
Proteína %	0,67	0,69	0,70
NNP % <sup>2</sup>	0,16	0,17	0,17
Sal %	2,27	2,23	2,19
pH(dessora)	6,31	6,27	6,25

<sup>1</sup> Conteúdo de Sólidos Totais

<sup>2</sup> Conteúdo de Nitrogênio Não Protéico

Composição do queijo: a *Tabela 3* mostra a composição dos queijos dois dias após a fabricação. A diferença na proporção de fermento utilizado não resultou em diferenças significativas ( $p>0,16$ ) na composição físico-química dos queijos. As porcentagens de gordura, sal e cálcio tenderam a diminuir com o aumento da proporção de cultura láctica. A dois dias da fabricação, todos os valores de pH apresentavam uma pequena diferença entre si, diminuindo conforme aumentou-se a proporção de fermento.

**TABELA 3.** Média (n=3) da composição dos queijos obtidos utilizando-se zero, 0,1 e 0,5% de fermento láctico.

Componente	% de fermento láctico		
	Zero	0,1	0,5
Umidade %	60,44	62,89	61,25
Gordura %	22,67	21,83	21,92
GBS <sup>1</sup>	57,28	58,91	57,35
Proteína %	15,96	15,45	15,99
Sal%	1,17	1,16	1,15
S/U <sup>2</sup>	1,94	1,84	1,86
Cálcio%	0,55	0,54	0,53
Ca/P <sup>3</sup>	3,45	3,51	3,33
pH	6,37	6,28	6,16

<sup>1</sup>Gordura em base seca

<sup>2</sup>Relação sal/umidade

<sup>3</sup>Relação Cálcio/proteína

#### 4.2. Recuperação de Gordura e Proteína e Rendimento do queijo

Recuperação de gordura: não foram verificadas diferenças significativas ( $p=0,05$ ) entre os tratamentos para este parâmetro. Entretanto, de acordo com a *Tabela 4*, pode-se observar que houve maior recuperação de gordura no soro proveniente da fabricação do queijo com 0,5% de cultura láctica, sendo que, para os outros tratamentos, zero e 0,1% de cultura, a perda foi menor. Esses resultados são consistentes com o maior teor de gordura no soro do queijo com 0,5% de fermento (*Tabela 2*).

Recuperação de proteína: similar ao ocorrido com a recuperação de gordura, não houve diferença significativa ( $p=0,05$ ) entre os tratamentos, mas, pode-se observar na *Tabela 5* que, houve uma maior recuperação de proteína para os queijos fabricados com zero e 0,1% de fermento.

**TABELA 4.** Média (n=3) da recuperação de gordura normalizada na fabricação dos queijos com zero, 0,1 e 0,5% de fermento láctico.

Recuperação de gordura (%)	% de fermento láctico		
	Zero	0,1	0,5
Soro	6,70	6,13	8,23
Queijo	93,30	93,87	91,77

**TABELA 5.** Média (n=3) da recuperação de proteína normalizada na fabricação dos queijos com zero, 0,1 e 0,5% de fermento láctico.

Recuperação de proteína (%)	% de fermento láctico		
	Zero	0,1	0,5
Soro	18,76	18,62	19,65
Queijo	81,24	81,38	80,36

Rendimento: não houve diferença significativa ( $p=0,05$ ) entre os valores de rendimento e rendimento ajustado (*Tabela 6*) para os diferentes tratamento. O queijo que apresentou maior rendimento foi o produzido utilizando-se 0,1% de cultura, sendo este também o que apresentou maior valor de umidade. Para o rendimento ajustado observou-se uma tendência de aumento conforme diminuiu-se a quantidade de fermento utilizado.

**TABELA 6.** Média (n=3) do rendimento da fabricação dos queijos com zero, 0,1 e 0,5% de fermento láctico.

	% de fermento láctico		
	Zero	0,1	0,5
Rendimento (kg queijo/100kg leite)	16,08	16,99	16,01
Rendimento ajustado	15,98	15,82	15,40

## 5. DISCUSSÃO

Para os três tratamentos, foi utilizada a mesma quantidade de ácido láctico. A cultura empregada era liofilizada, de uso direto no tanque, não produzindo ácido láctico suficiente para interferir na atividade inicial do coalho, ou seja, na fase de coagulação. Portanto, para os três tratamentos, foram fabricadas coalhadas muito semelhantes, não havendo diferenças na retenção de sólidos ou umidade até esta etapa.

Uma pequena diferença no pH do soro pode ser observada no momento da dessoragem. Queijos com maior porcentagem de fermento apresentaram pH do soro mais baixo em função da maior atuação das bactérias lácticas do fermento sobre a lactose do leite, produzindo ácido láctico. A acidificação mais intensa, provocada pelo aumento da porcentagem de fermento láctico, levou a uma maior desmineralização da coalhada, o que pode ser comprovado pelo menor teor de cálcio nesses queijos. Essa maior desmineralização no queijo com 0,5% de cultura pode ter levado à formação de uma rede protéica mais frágil, resultando em maiores perdas de sólidos do leite para o soro.

Estatisticamente, não houve influência no rendimento e na recuperação de gordura e proteína do queijo devido à diferença na proporção de fermento láctico utilizado. Pequenas mudanças no rendimento são difíceis de serem detectadas estatisticamente com pequeno número de experimentos. Outros experimentos com mais repetições seriam necessários para verificar as tendências observadas de menor recuperação de gordura e proteína e, conseqüentemente, de um menor rendimento de fabricação do queijo com 0,5% de cultura.

## 6 – CONCLUSÃO

Estatisticamente, o rendimento dos queijos não foi afetado pelas diferentes proporções de fermento láctico mesofílico utilizado ( $p=0,05$ ). Entretanto, queijos fabricados com 0,5% de cultura apresentaram maiores perdas de gordura e proteína no soro e, conseqüentemente, menor rendimento. Para os queijos produzidos com 0,1% de fermento e para os sem fermento, os valores de rendimento encontrados foram bastante semelhantes.

Portanto, seria muito interessante conhecer se a adição dessas pequenas proporções de fermento resultaria em maior segurança microbiológica do queijo Minas Frescal, proporcionando um queijo com alto rendimento e dentro dos padrões microbiológicos ditados pela legislação brasileira.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. **International Dairy Congress**, 15. London, 1959.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**, Washington, 16<sup>th</sup> Edição. 1995.
3. ATHERTON, H.V.; NEWLANDER, J.A. **Chemistry and testing of dairy products**. 4. ed. Westport: AVI, 396p, 1981.
4. BANKS, J. M.; BANKS, W.; MUIR, D.D.; WILSON, A.G. Cheese yield: composition does matter. **Dairy Industries International**, v. 46 n.5 p. 15-22, 1981.

5. BARBANO, D. M.; SHERBON, J.W. Cheddar cheese yields in New York. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1873-1883, 1984.
6. FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON-POMBO-P, A.F.; SOUZA, H. M. ; MUNCK, A.V. Estudo conclusivo a respeito da fabricação do queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do LL.C.T.** v. 35 n 208, p 13-16, 1980
7. FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. Queijo Minas Frescal. In **Tecnologia de Queijos**. 1ª Edição. p. 73-75, 1994.
8. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1985. **Normas Analíticas do IAL**. D. B. Rebocho (Ed.), São Paulo, S.P.
9. KAMMERLHNER, J. Rennet cheese yield. **Deutsche-Milchwirtschaft**. v. 45, n.3, p. 118-125, 1994.
10. RICHARDSON, G.H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products**. 15 ed. Am. Publ. Health Assoc., Washington, DC. ed. 1985.
11. ROWLAND, S.J. The determination of the casein content of milk. **Journal of Dairy Research**. v. 42, 1938.
12. TARAS, M.J. Standard methods for the examination of water and waste water. **American Public Health Association**, 1971.
13. WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; FURTADO, M. M.; MUNCK, A. V. Estudo da fabricação do queijo Minas Frescal com ácido láctico em substituição do fermento láctico. **Anais do V Congresso Nacional de Laticínios**. EPAMIG/ILCT. p 160 –182, 1978.

### **Agradecimentos**

Os autores do trabalho agradecem ao CNPq pela bolsa de estudos e à FAPESP, pelo auxílio financeiro ao projeto.

### **Capítulo 3**

## ***EFEITO DO USO COMBINADO DE ÁCIDO LÁTICO E DIFERENTES PROPORÇÕES DE FERMENTO LÁTICO MESOFÍLICO NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS FRESCAL<sup>1</sup>***

---

<sup>1</sup> Artigo redigido segundo normas da Revista Journal of Food Protection

**EFEITO DO USO COMBINADO DE ÁCIDO LÁTICO E DIFERENTES  
PROPORÇÕES DE FERMENTO LÁTICO MESOFÍLICO NA QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS FRESCAL**

ALESSANDRA C.CAMPOS, WALKÍRIA H.VIOTTO<sup>2</sup>

Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos-  
UNICAMP, CP 6121, 13.083-970 Campinas, S.P

**RESUMO**

Queijo Minas Frescal foi fabricado utilizando-se ácido lático e diferentes proporções de fermento láctico mesofílico (zero, 0,1% e 0,5%). Os tratamentos foram realizados em triplicata, resultando em nove experimentos. A composição físico-química dos queijos foi determinada dois dias após a fabricação. Durante 21 dias de armazenamento refrigerado, foram avaliadas a acidificação, através de análises de pH e acidez titulável, e a qualidade microbiológica, através de contagem total, contagem de coliformes 30°C e 45°C e contagem de bolores e leveduras. Com relação à acidificação, os queijos com fermento diferiram significativamente ( $p=0,05$ ) dos queijos sem fermento, observando-se diminuição do pH e aumento de acidez com o aumento da proporção de fermento. Após 13 dias de estocagem refrigerada, todos os queijos sem fermento estavam fora dos padrões da legislação brasileira para contagem de coliformes (30°C), independente da contaminação

---

<sup>2</sup> Professora do DTA-FEA-UNICAMP (e-mail: walkiria@fea.unicamp.br)

inicial. Os queijos com 0,5% de fermento mantiveram-se dentro dos padrões legais por todo o período de análises e, para os queijos com 0,1% de fermento, foram encontradas algumas contagens dentro e outras fora dos padrões, provavelmente, em função das diferentes contaminações iniciais. Os queijos sem fermento apresentaram-se fora dos padrões legais para bolores e leveduras a partir do sexto dia. Para os queijos com 0,1% de fermento, isso ocorreu após 13 dias e, para os queijos com 0,5%, após 20 dias de estocagem refrigerada. Portanto, a adição de pequenas proporções de fermento láctico resultou em melhor qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal, devido à proteção conferida pelos microrganismos da cultura láctica.

Palavras-chave: Minas Frescal, fermento, ácido láctico, contaminantes

## SUMMARY

Minas Frescal cheese was manufactured using lactic acid and different proportions of mesophilic starter (zero, 0,1% and 0,5%). Three trials were made for each treatment resulting in nine experiments. The cheese physical-chemical composition were made two days after manufacturing. Some analysis were made during twenty one days under refrigeration as the acidification – through pH and tritable acidity – and microbiological quality – through total count plate, coliforms (30°C and 45°C) and yeasts and moulds. Related to acification, the cultured cheese were significant different ( $p= 0,05$ ) from uncultured cheese, observing decreasead pH and increased acidity with the increasing of starter proportion. After thirteen days under refrigeration, the unculture cheese were out of the Brazilian specification for coliforms (30°C) independently of initial contamination. The

cheese with 0,5% of starter were within the Brazilian legislation during the whole analysis time and in the cheese with 0,1% of starter were found some counts within and some out of the legislation, probably due to the different initial contamination. The unculture cheese were out of the legislation for yeast and mould after the sixth day. For the cheese with 0,1% of starter this occurred after thirteen days and, for the ones with 0,5%, after twenty days of cool storage. Moreover, the addition of small proportions of starter resulted in better microbiological quality of Minas Frescal cheese, due to the protection given by starter microorganisms

## 1. INTRODUÇÃO

O Minas Frescal é considerado um queijo fresco, ou seja, que está pronto para o consumo logo após sua fabricação. É um queijo magro, que contém entre 10,0 e 24,9% de gordura, sendo, ainda, considerado um queijo de muito alta umidade, com um teor de umidade superior a 55% (4).

Por ser um queijo com elevado teor de umidade e altas taxas de lactose, o Minas Frescal é susceptível a transformações bioquímicas como a fermentação e a proteólise, normalmente responsáveis pelo aparecimento de alterações indesejáveis tais como: amarelamento da casca, amolecimento do corpo e sabor ácido intenso (6). Estas reações, que tornam o queijo inadequado ao consumo, ocorrem devido à ação de enzimas naturais do leite e/ou provenientes do coalho e do fermento láctico utilizados.

Devido à sua importância econômica, vários estudos têm sido realizados visando eliminar ou minimizar esses defeitos, que comprometem a qualidade e diminuem a vida útil do queijo (7, 19, 20, 21).

Atualmente, algumas fábricas ainda utilizam o método tradicional, adicionando 1,0% de cultura láctica mesofílica na fabricação do Minas Frescal. Entretanto, a maioria já substituiu o uso do fermento por ácido láctico. Muitas fábricas adotaram essa mudança pois com a utilização somente de ácido láctico, o queijo ficaria menos ácido, o que causaria uma maior retenção de água e, conseqüentemente, um maior rendimento. O menor nível de acidificação também deve conferir ao queijo Minas Frescal uma maior vida de prateleira no que se refere aos atributos organolépticos.

A produção de ácido láctico, pelos microrganismos de uma cultura láctica ativa, é considerada um passo crucial na prevenção do crescimento de bactérias patogênicas durante a fabricação, a maturação e a estocagem de queijos (18). A legislação brasileira prevê uma maior tolerância a alguns contaminantes, como coliformes (45°C) e estafilococos, para os queijos sem adição de fermento láctico (4).

Estudos avaliando a qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal no Brasil mostram que grande parte dos produtos analisados encontra-se fora dos padrões permitidos pela legislação brasileira (9, 14, 16).

Para se recuperar a proteção contra contaminantes, comprometida devido à eliminação do fermento láctico, a fabricação de queijo Minas Frescal necessita ser revista, visando um produto com melhores condições microbiológicas sem perder as vantagens nos níveis de rendimento e durabilidade advindas do uso do ácido láctico.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso combinado de ácido láctico e diferentes proporções de fermento láctico mesofílico na qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal em comparação a um padrão, fabricado somente com ácido láctico

O uso do ácido láctico foi mantido para se obter um melhor rendimento, já que com o abaixamento do pH há uma melhor atuação das enzimas do coalho, formando uma coalhada

mais firme que irá reter um maior número de elementos do leite. O fermento foi utilizado com o objetivo principal de conferir proteção ao queijo contra microrganismos contaminantes, sendo empregado em baixas proporções, 0,1% e 0,5%, para evitar alterações indesejáveis, como proteólise e acidificação intensas. A acidificação e a proteção contra microrganismos contaminantes foram avaliados para cada tratamento durante os 21 dias de armazenamento refrigerado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Fabricação de queijo

Leite proveniente de usinas de beneficiamento de leite da região de Campinas, foi padronizado de forma a manter a relação caseína/gordura igual a 0,8. O leite padronizado foi pasteurizado a 72°C por 15 s, resfriado a 5°C e armazenado em latões de 50 litros, em câmara fria a 5°C, durante a noite. No dia seguinte, cerca de 100 litros de leite foram processados segundo técnica descrita por Furtado & Lourenço Neto (8)

Na fabricação dos queijos foi utilizado ácido láctico industrial (85%), marca Synth, na proporção de 0,025% e diferentes proporções de fermento láctico mesofílico: zero, 0,1% e 0,5%. A cultura utilizada foi R-703®, fornecida pela Chr. Hansen, composta de *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*. O ácido láctico foi previamente diluído em água destilada a 2,5%, para prevenir precipitação de proteínas [7]. Para a coagulação do leite, foi utilizada quimosina obtida por fermentação Chymax®.

A salga foi realizada na massa, antes da enformagem. O sal (marca Lebre) foi diluído em 4 litros de água em ebulição, na proporção de 2% do peso do leite, resfriado a 37°C e adicionado à massa. Após 24 horas de permanência na câmara fria (2-5°C), os

queijos foram embalados em sacos plásticos e conduzidos novamente à câmara, até serem retirados para análise.

## **2.2 Análises do leite, soro e queijo**

A eficiência da pasteurização foi avaliada através dos testes de peroxidase e fosfatase (10). pH e acidez titulável (2) do leite foram acompanhados durante o processo de fabricação do queijo. Na determinação de gordura em queijos usou-se o método volumétrico de Gerber (10). Para as análises de nitrogênio total do queijo foi utilizado o método de Kjeldahl (1), sendo os valores de nitrogênio multiplicados pelo fator de conversão 6,38 para obtenção dos valores equivalentes de proteína total. A porcentagem de sólidos totais dos queijos foi determinada por método gravimétrico (1). O conteúdo de sal no queijo foi determinado pelo método de Volhard (15). O teor de cálcio foi determinado por digestão úmida do queijo, seguida de titulação com EDTA, na presença de murexida (20). Análises de pH (2) e acidez titulável (1) do queijo foram realizadas nos dias 2, 6, 13 e 20 de estocagem refrigerada.

## **2.3. Análises Microbiológicas do leite e queijo**

Avaliação da contagem total de mesófilos, coliformes a 30°C e coliformes a 45°C, no leite e nos queijos, foi realizada conforme Marshall (12). Para a contagem total, foi utilizado o método PCA (Plate Count Agar, marca Merck), em duplicata, nas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  para leite,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  para queijos com fermento láctico e  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  para queijos com ácido láctico. As placas foram incubadas à temperatura de 35°C por 48 horas. Para a contagem de microrganismos do grupo coliforme, foi utilizado o teste presuntivo NMP. As amostras foram incubadas a 35°C, por 48 horas, no caldo enriquecido LST (Lauryl Sulfate Tryptose, marca Merck). Para os tubos com presença de gás, após período de incubação, foi realizado o teste de confirmação BGB (Brilant Green

Bile, marca Merck) e EC (Escherichia Coli Broth, marca Merck). Para as amostras de queijo, foram realizadas também contagens de bolores e leveduras. Para tanto, foi utilizado o método de contagem em placa, com o meio PDA (Potato Dextrose Agar, marca Merck), com cloranfenicol. As diluições utilizadas foram  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  nos dias 2 e 6 e  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  nos dias 13 e 20 de análise. As placas inoculadas foram incubadas à temperatura de 22-25°C, por 5 dias.

Amostras de leite foram coletadas no tanque de cada tratamento. A preparação das amostras de leite e queijo foi realizada segundo Marshall (12).

### **3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS**

O delineamento experimental foi do tipo aleatorizado em blocos. O fator estudado foi proporção de fermento láctico (A), sendo utilizado nos níveis de zero, 0,1 e 0,5%. Esses três ensaios foram realizados em triplicata, resultando em nove experimentos.

Os resultados de composição foram analisados através de Análise de Variância, utilizando-se o teste de Duncan para verificar diferenças entre as médias. Para a avaliação do desenvolvimento de pH e acidez foi adotado um delineamento do tipo split-plot, sendo que a sub-parcela foi obtida pela incorporação do fator tempo de armazenamento refrigerado (B). As análises foram realizadas nos dias 2, 6, 13 e 20 de armazenamento refrigerado. O teste F-ANOVA foi usado para testar as diferenças entre tratamentos, entre tempos e a interação tempo por tratamento. Foi utilizado o teste de Duncan, de comparações múltiplas, para agrupar tratamentos e/ou tempos com médias cujas diferenças não foram estatisticamente significativas.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a composição físico-química dos queijos fabricados com ácido láctico e diferentes proporções de fermento láctico mesofílico, dois dias após a fabricação. A proporção de fermento láctico não afetou significativamente ( $p>0,16$ ) a composição do queijo.

TABELA 1. Média (n=3) da composição dos queijos fabricados com zero, 0,1 e 0,5% de fermento láctico.

Componente	% de fermento láctico		
	Zero	0,1%	0,5%
Umidade %	60,44	62,89	61,25
Gordura %	22,67	21,83	21,92
GBS <sup>1</sup>	57,28	58,91	57,35
Proteína %	15,96	15,45	15,99
Sal%	1,17	1,16	1,15
S/U <sup>2</sup>	1,94	1,84	1,86
Cálcio%	0,55	0,54	0,53
Ca/P <sup>3</sup>	3,45	3,51	3,33
pH	6,37	6,28	6,16

<sup>1</sup> Gordura em base seca

<sup>2</sup> Sal/Umidade

<sup>3</sup> Cálcio/proteína

Os resultados dos testes de fosfatase (-) e peroxidase (+) do leite pasteurizado indicaram que a pasteurização foi eficiente para todos os tratamentos.

Os valores de pH e acidez dos leites pasteurizados utilizados nos processamentos (Tabelas 2 e 3), estão dentro dos padrões legais e não apresentaram diferença significativa entre si ( $p=0,05$ ).

TABELA 2. Análise de pH ( $n=3$ ) do leite pasteurizado utilizado nos processamentos e dos queijos nos dias 2,6,13 e 20 de armazenamento refrigerado.

	Leite	QueijoD2	QueijoD6	QueijoD13	QueijoD20
Zero	6,62	6,37	6,38	6,30	6,28
0,1%	6,60	6,28	6,09	5,55	5,44
0,5%	6,61	6,16	5,95	5,34	5,22

TABELA 3. Análise de acidez ( $n=3$ ) do leite pasteurizado utilizado nos processamentos e dos queijos nos dias 2,6,13 e 20 de armazenamento refrigerado.

	Leite	QueijoD2	QueijoD6	QueijoD13	QueijoD20
Zero	15,78	0,12	0,13	0,13	0,17
0,1%	15,51	0,13	0,17	0,46	0,51
0,5%	15,40	0,24	0,23	0,55	0,65

Acidez e pH apresentaram interação tempo\*tratamento ( $p=0,08$  e  $p=0,0091$ , respectivamente), conforme mostram os resultados da Tabela 4. O pH dos queijos fabricados sem fermento manteve-se estável durante os 20 dias de armazenamento refrigerado. Esses queijos apresentaram um leve aumento de acidez na última semana de análise, provavelmente, devido à atuação de microrganismos contaminantes. Para os queijos fabricados com adição de cultura láctica, o pH diminuiu e a acidez aumentou durante

os 20 dias de análise. Nos queijos fabricados com 0,5% de fermento, as mudanças no pH e acidez foram mais acentuadas, apesar de não diferirem significativamente ( $p=0,05$ ) dos queijos com 0,1% de cultura. Entretanto, os queijos com fermento apresentaram diferença significativa no pH e acidez ( $p=0,05$ ) quando comparados aos queijos sem fermento.

Nos queijos com fermento, houve uma acidificação menos intensa após os primeiros 14 dias de armazenamento refrigerado dos queijos. Isso ocorreu, provavelmente, devido à queda no teor de lactose disponível após esse período e, também à uma inibição das bactérias lácticas devido ao baixo pH e alto teor de ácido lático do queijo.

TABELA 4. Quadrado médio e probabilidades para valores de pH e acidez titulável durante 21 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	Acidez titulável			pH	
	GL	P	QM	P	Ms
Tratamentos	2	0,0232	0,243	0,0014	1,436
Erro (a)	4		0,022		0,028
Tempo	3	0,002	0,184	0,0001*	0,835
Interação (tempo*tratamento)	6	0,0873	0,036	0,0091	0,151
Erro (b)	18		0,016		0,037
R <sup>2</sup>			0,837		0,913

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

Conforme pode ser observado na Tabela 5, para os três tratamentos, a contagem total, no último dia de análise, estava em torno de  $10^7$  e  $10^8$  ufc/g. Para os queijos fabricados com adição de fermento, o número de microrganismos do queijo, durante o

armazenamento refrigerado, foi resultado da multiplicação das bactérias do fermento láctico e, em menor parte, dos microrganismos da flora contaminante. Para os queijos fabricados somente com adição de ácido láctico, a contagem total em placa indicou, basicamente, presença de microrganismos contaminantes.

TABELA 5. Contagem Total (ufc/ml) do leite pasteurizado utilizado nos processamentos e dos queijos (ufc/g) nos dias 2, 6, 13 e 20 de armazenamento refrigerado.

(%) fermento	Leite	QueijoD2	QueijoD6	QueijoD13	QueijoD20
Zero	$5,30 \times 10^3$	$1,80 \times 10^4$	$1,10 \times 10^5$	$1,05 \times 10^6$	$3,60 \times 10^7$
0,1	$5,30 \times 10^3$	$1,50 \times 10^6$	$3,40 \times 10^7$	$2,40 \times 10^8$	$2,70 \times 10^8$
0,5	$6,70 \times 10^3$	$1,90 \times 10^6$	$4,80 \times 10^7$	$1,60 \times 10^8$	$2,10 \times 10^8$
Zero	$1,47 \times 10^6$	$1,07 \times 10^7$	$1,45 \times 10^7$	$1,35 \times 10^8$	$7,10 \times 10^8$
0,1	$8,25 \times 10^5$	$7,90 \times 10^6$	$9,20 \times 10^6$	$5,85 \times 10^8$	$1,82 \times 10^8$
0,5	$6,45 \times 10^5$	$1,71 \times 10^7$	$2,23 \times 10^7$	$3,28 \times 10^8$	$7,10 \times 10^8$
Zero	$6,85 \times 10^3$	$1,17 \times 10^5$	$8,55 \times 10^4$	$1,56 \times 10^7$	$2,21 \times 10^7$
0,1	$(2,00 \times 10^2)^*$	$3,07 \times 10^7$	$4,20 \times 10^7$	$4,90 \times 10^7$	$3,10 \times 10^7$
0,5	$(5,00 \times 10^2)^*$	$2,30 \times 10^6$	$8,80 \times 10^7$	$1,20 \times 10^8$	$1,44 \times 10^8$

\*Valores estimados

Os resultados das análises de coliformes (30°C) nos leites e nos queijos são mostrados na Tabela 6. Em três processamentos o leite apresentou contagem de coliformes (30°C) superior à permitida pela legislação brasileira, que é de  $NMP < 10 \text{ ufc/ml}$ .

A contaminação inicial dos queijos por coliformes (30°C) foi devida, provavelmente à contaminação ocorrida durante o armazenamento do leite pasteurizado, fabricação e embalagem do queijo, originária de latões, equipamentos, e manipulação.

Portanto, as contagens iniciais dos queijos podem ser relacionadas com a contagem do leite pasteurizado; quanto mais elevadas as contagens de coliformes (30°C) no leite, mais elevadas também as contagens nos queijos no dia 2.

Os queijos fabricados somente com ácido láctico foram os que apresentaram maior crescimento de coliformes (30°C) durante os 20 dias de estocagem refrigerada. Esses queijos não apresentaram nenhuma redução nas contagens desses microrganismos durante o período de análises (Tabela 6).

TABELA 6. Análise de coliformes 30°C (NMP/ml) do leite pasteurizado utilizado nos processamentos, e dos queijos (NMP/g) nos dias 2,6,13 e 20 de armazenamento refrigerado.

	Leite	QueijoD2	QueijoD6	QueijoD13	QueijoD20
Zero	$4,00 \times 10^{-1}$	$2,30 \times 10^1$	$4,60 \times 10^2$	$1,10 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^5$
0,1%	$1,10 \times 10^2$	$2,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$
0,5%	$4,00 \times 10^{-1}$	<3	$4,30 \times 10^1$	$2,40 \times 10^3$	$9,30 \times 10^1$
Zero	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$4,60 \times 10^4$	$>1,10 \times 10^6$	$>1,10 \times 10^7$
0,1%	$7,50 \times 10^0$	$4,60 \times 10^2$	$3,90 \times 10^2$	$2,40 \times 10^4$	$7,50 \times 10^3$
0,5%	$4,30 \times 10^0$	$9,30 \times 10^1$	$2,40 \times 10^2$	$3,90 \times 10^3$	$4,00 \times 10^2$
Zero	<3	$4,30 \times 10^1$	$1,10 \times 10^2$	$2,40 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$
0,1%	$2,40 \times 10^1$	$>1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$2,40 \times 10^3$
0,5%	$2,40 \times 10^0$	$2,40 \times 10^2$	$2,40 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$	$4,60 \times 10^2$

Para os queijos com adição de 0,1% de fermento podemos observar que, quando a contaminação inicial por coliformes (30°C) foi baixa, ele apresentou um aumento nas contagens até o dia 13 de armazenamento, e então, diminuiu. Quando a contaminação

inicial mostrou-se alta ( $10^4$ ), houve um pequeno aumento no dia 6 de armazenamento e, a partir daí, as contagens mantiveram-se estáveis.

Os queijos fabricados com 0,5% de cultura láctica apresentaram os menores níveis de contaminação e desenvolvimento desses microrganismos. Para as três repetições, as contagens mantiveram-se baixas durante a estocagem refrigerada, com um leve aumento até o dia 13 e, a partir daí, houve uma redução no número de microrganismos.

Ao final de 13 dias de análise, todos os queijos sem fermento estavam fora dos padrões da legislação brasileira para contagem de coliformes ( $30^\circ\text{C}$ ), independente da população inicial. Os queijos com 0,5% de fermento mantiveram-se dentro dos padrões legais por todo o período armazenamento e, para os queijos com 0,1% foram encontradas algumas contagens dentro e outras fora dos padrões, provavelmente, em função das diferentes contaminações iniciais e/ou contaminação durante a manufatura.

Os resultados das análises de coliformes ( $45^\circ\text{C}$ ) nos leites e nos queijos são apresentados na Tabela 7. Somente uma repetição do queijo com 0,1% e uma repetição do queijo com 0,5% apresentaram valores de coliformes ( $45^\circ\text{C}$ ) maiores que 3 NMP/g. Em ambos os casos ocorreram reduções das contagens com o tempo de armazenamento refrigerado do queijo. Em nenhum dos processamentos dos queijos sem fermento houve contaminação inicial por coliformes ( $45^\circ\text{C}$ ).

Todos os queijos apresentaram aumento nas contagens de bolores e leveduras com o tempo, sendo que, as maiores contagens foram observadas para o queijo sem fermento e, as menores, para o queijo com adição de 0,5% de fermento (Tabela 8).

Os queijos sem fermento apresentaram-se fora dos padrões legais para bolores e leveduras, a partir do sexto dia. Para os queijos com 0,1% de fermento isso ocorreu após o dia 13 de fabricação e, para os queijos com 0,5%, após o dia 20.

TABELA 7. Análise de coliformes 45°C (NMP/g) do leite pasteurizado utilizado nos processamentos e dos queijos nos dias 2, 6, 13 e 20 de armazenamento refrigerado.

	Leite	QueijoD2	QueijoD6	QueijoD13	QueijoD20
Zero	<0,3	<3	<3	<3	<3
0,1%	<0,3	<3	<3	<3	<3
0,5%	<0,3	<3	<3	<3	<3
Zero	<0,3	<3	<3	<3	<3
0,1%	<0,3	<3	<3	<3	<3
0,5%	<0,3	<3	<3	<3	<3
Zero	<0,3	<3	<3	<3	<3
0,1%	24	28	210	90	7
0,5%	<0,3	43	4	4	<3

Para todos os microrganismos contaminantes estudados, as maiores taxas de crescimento foram encontradas nos queijos onde não se utilizou fermento láctico, deixando clara a ação protetora do fermento láctico. Entretanto, não está bem elucidado ainda, quais metabólitos e, que mecanismos de inibição estão envolvidos nesse processo. Segundo Northolt (13), no começo da fermentação, a ação inibitória é devida à produção, por parte dos microrganismos do fermento, de compostos antimicrobianos e peróxidos, além da queda no potencial de oxido-redução. Mais tarde, a produção de ácido láctico, abaixando o pH do queijo, vai contribuir para a inibição dos contaminantes. No presente estudo, a ação dos compostos antimicrobianos não é de grande importância, pois, o fermento utilizado é do tipo 'O', cuja principal bacteriocina é a nisina, que não tem efeito inibidor sobre microrganismos Gram negativos.

TABELA 8. Contagem de bolores e leveduras (ufc/g) dos queijos nos dias 2,6,13 e 20 de armazenamento refrigerado.

	QueijoD2	QueijoD6	QueijoD13	QueijoD20
Zero	<10*	1,50x10 <sup>4</sup>	9,30x10 <sup>5</sup>	1,50x10 <sup>7</sup>
0,1%	1,55x10 <sup>2</sup>	2,40x10 <sup>4</sup>	4,60x10 <sup>6</sup>	2,70x10 <sup>7</sup>
0,5%	35*	1,50x10 <sup>5</sup>	1,60x10 <sup>6</sup>	4,85x10 <sup>6</sup>
Zero	1,00x10 <sup>0</sup>	7,40x10 <sup>4</sup>	7,90x10 <sup>6</sup>	2,45x10 <sup>7</sup>
0,1%	1,00x10 <sup>0</sup>	8,00x10 <sup>1</sup>	9,30x10 <sup>4</sup>	7,00x10 <sup>5</sup>
0,5%	0	2,00x10 <sup>1</sup>	6,00x10 <sup>1</sup>	1,29x10 <sup>4</sup>
Zero	2,20x10 <sup>2</sup>	9,33x10 <sup>3</sup>	7,50x10 <sup>5</sup>	4,60x10 <sup>6</sup>
0,1%	5,40x10 <sup>2</sup>	1,11x10 <sup>3</sup>	7,20x10 <sup>3</sup>	7,65x10 <sup>3</sup>
0,5%	4,30x10 <sup>2</sup>	3,00x10 <sup>1</sup>	1,90x10 <sup>3</sup>	4,30x10 <sup>3</sup>

\*Valores estimados

Trabalhos realizados por Sorrells *et al* (17) e Brackett (3) sugerem que os ácidos orgânicos possuem diferentes efeitos como inibidores. O poder como antimicrobiano está ligado à força do ácido. As moléculas não dissociadas, ao contrário dos íons, passam através da membrana bacteriana e têm um efeito intracelular. O ácido láctico possui um valor de  $pK_a=3,86$ , tendo um grau de dissociação de 94% a um pH em torno de 5,0. Por isso, se comparado a outros ácidos orgânicos como o acético, propiônico e o sórbico, o ácido láctico é o que apresenta as menores taxas de inibição.

No presente trabalho, desde os primeiros dias de estocagem refrigerada, as contagens já se apresentavam maiores para os queijos fabricados somente com ácido láctico, em relação aos queijos fabricados com adição de fermento. Isso mostra que, mesmo quando o pH ainda estava alto, houve uma certa inibição dos contaminantes nos queijos com

fermento. Essa inibição mostrou-se acentuada após 14 dias de armazenamento refrigerado, quando houve queda do pH, podendo ser observado, inclusive, uma diminuição nas contagens de coliformes (30°C) e de coliformes (45°C). Essa proteção conferida pelo fermento deve-se, nos primeiros dias de armazenamento, à competição pelos nutrientes. Já, com o aumento do tempo de estocagem, a diminuição do pH deve também ter contribuído para uma menor contagem de contaminantes no queijo com fermento,

Outro fator que pode influenciar o desenvolvimento da microbiota de um queijo, é a sua relação sal/umidade (S/U). De acordo com Lawrence & Gilles (11), a partir de um determinado valor de S/U (em torno de 4,9%, dependendo da sensibilidade ao sal que os microrganismos do fermento utilizado apresentarem), a produção de ácido é progressivamente diminuída, devido à inibição das bactérias do fermento.

Não houve diferença significativa ( $p=0,05$ ) entre os valores de S/U para os diferentes tratamentos, entretanto, pode ser observado uma tendência de aumento da relação S/U com a diminuição das proporções de fermento adicionado (Tabela 1). Como as maiores contagens de contaminantes foram observadas nos queijos fabricados sem adição de fermento e, estes foram os que apresentaram as menores relações S/U, pode-se concluir que, nos teores utilizados neste trabalho, o sal não teve nenhuma ação como inibidor microbiano.

Em resumo, o uso de fermento láctico na fabricação do queijo Minas Frescal, mesmo que em pequenas proporções (0,1% e 0,5%), é fundamental para garantir um produto seguro do ponto de vista de saúde pública.

Por ser um queijo fabricado com alto grau de manipulação e que apresenta elevada umidade, alta taxa de lactose e baixo teor de sal, o Minas Frescal é altamente susceptível a contaminações, daí a necessidade da utilização de culturas lácticas que confirmam proteção ao

queijo. Havendo uma contaminação inicial, seu desenvolvimento será maior nos queijos onde não houver a competição dos microrganismos do fermento.

Apesar dos queijos com 0,5% de fermento apresentarem as menores contagens de coliformes, bolores e leveduras, a utilização de 0,1% também mostrou-se eficiente como um meio para se melhorar a qualidade microbiológica dos queijos, aumentando assim sua vida útil.

Levando-se em consideração que a utilização de 0,1% de cultura lática não diminui o rendimento do queijo (5), essa parece ser uma boa opção para se conseguir um queijo Minas Frescal com alto rendimento e adequadas condições microbiológicas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**, Washington, 16<sup>th</sup> Edição. 1995.
2. ATHERTON, H.V.; NEWLANDER, J.A. **Chemistry and testing of dairy products**. 4. ed. Westport: AVI, 396p, 1981.
3. BRACKETT, R.E. Effects of various acids on growth and survival of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Food Protection**. v. 50, p. 598-601, 1987.
4. BRASIL. MAARA – Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996 consta do item 2 Descrição do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial**, 11 de mar. 1996. p. 3977-3986.

5. CAMPOS, A. C.; VIOTTO, W.H. Rendimento de Queijo Minas Frescal fabricado com ácido láctico e diferentes proporções de fermento láctico. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 54, n. 309, p. 105-109, 1999.
6. DORNELLAS, J.R.F. **Efeito do Tipo de Coagulante e Acidificante no Rendimento, Proteólise e “Shelf Life” do Queijo Minas Frescal**. Campinas, 1997. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
7. FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON-POMBO-P, A.F SOUZA, H.M.; MUNCK, A.V. Estudo conclusivo a respeito da fabricação do queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 35, n 208, p. 13-16, 1980
8. FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. Queijo Minas Frescal. In **Tecnologia de Queijos**. 1ª Edição. p. 73-75, 1994.
9. HOFFMANN, F.L., GARCIA-CRUZ, C.H., VENTURIM, T.M., POSSEBON, A. Qualidade microbiológica de queijo tipo “Minas Frescal” e queijos condimentados comercializados na região de São José do Rio Preto. **Anais do XXXII Semana do Laticinista**. EPAMIG/ILCT. p. 61– 64, 1991.
10. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1985. **Normas Analíticas do IAL**. D. B. Rebocho (Ed.), São Paulo, S.P.
11. LAWRENCE, R.C.; GILLES, J. Factors that determine the pH of young Cheddar cheese. **New Zeland Journal of Dairy Science and Technology**. v. 17, p. 1-14, 1982.
12. MARSHALL, R. T. Standard methods for the examination of dairy products. **APHA**. 16<sup>th</sup> Edition, 1992.

13. NORTHOLT, M.D. Grow and inactivation of pathogenic micro-organisms during manufacture and storage of fermented dairy products. A Review. **Netherlands Milk and Dairy Journal**. v. 38, p. 135-150, 1984.
14. RAIMUNDO, S.M.C., FAVARIN, V., ROBBS, P.G., SILVA, P.P.O., HAUA, M.J. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal no comércio do Rio de Janeiro. **Anais do XXXII Semana do Laticinista**. EPAMIG/ILCT. p. 169– 172, 1991.
15. RICHARDSON, G.H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products**. 15 ed. Am. Publ. Health Assoc., Washington, DC. ed. 1985.
16. RODRIGUES, F.T., VIEIRA, M.D., SANTOS, J.L., PIERRE, S.J., ARAÚJO, W.C., ANDRADE, N.J., BRANDÃO, S.C.C. Características microbiológicas de queijos tipo Minas Frescal comercializados em Viçosa-MG. **Anais do XIII Congresso Nacional de Laticínios**. EPAMIG/ILCT. p. 233 – 235, 1995.
17. SORRELLS, K.M.; ENIGL, D.C.; HATFIELD, J.R. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. v. 52, p. 571-573, 1989.
18. SPAHR, U.; URL, B. Behaviour of pathogenic bacteria in cheese – a synopsis of experimental data. **Bulletin of the IDF 298**. p. 2-16, 1994.
19. VAN DENDER, A.G.F.; MORENO, I. Estudos de processos alternativos para fabricação de queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 47, n. 279/281, p. 76-77, 1992.
20. TARAS, M.J. Standard methods for the examination of water and waste water. **American Public Health Association**, 1971.

21. WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; FURTADO, M. M.; MUNCK, A. V. Estudo da fabricação do queijo Minas Frescal com ácido láctico em substituição do fermento láctico, **Anais do V Congresso Nacional de Laticínios**. EPAMIG/ILCT. p 160 – 182, 1978.
22. WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; CASAGRANDE, H. R., NETO, J. P. M. L.; MUNCK, A.V. Alterações no Queijo Minas Frescal durante o período de armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v 39, n.233, p. 3-9, 1984.

**Capítulo 4**

***PROTEÓLISE E PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE QUEIJO  
MINAS FRESCAL FABRICADO COM ÁCIDO LÁTICO E  
DIFERENTES PROPORÇÕES DE FERMENTO LÁTICO  
MESOFÍLICO<sup>1</sup>***

**PROTEÓLISE E PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL  
FABRICADO COM ÁCIDO LÁTICO E DIFERENTES PROPORÇÕES DE  
FERMENTO LÁTICO MESOFÍLICO**

Alessandra C. CAMPOS, Walkíria H. VIOTTO

**RESUMO**

O uso combinado de ácido lático com diferentes proporções de fermento lático mesofílico (0,1 e 0,5%) na fabricação do queijo Minas Frescal foi avaliado e comparado a um padrão, fabricado somente com ácido lático. Os tratamentos foram realizados em triplicata, resultando em nove experimentos. Após dois dias da fabricação foi determinada a composição físico-química dos queijos. Acidificação, proteólise e propriedades reológicas foram avaliadas semanalmente durante 21 dias de armazenamento refrigerado. Os queijos com fermento apresentaram maior acidificação (acidez titulável e pH) e profundidade de proteólise (NS TCA12%/NT), enquanto os queijos sem fermento apresentaram maiores níveis de extensão de proteólise (NSpH4,6/NT). Maior acidificação e profundidade de proteólise foram devidas à atuação das enzimas do fermento adicionado. Os maiores índices de extensão da proteólise do queijo sem fermento, confirmados por eletroforese, foram relacionados à alta umidade, ao alto desenvolvimento de contaminantes (bolores e leveduras) e à ação da plasmina. Com relação aos índices reológicos, os queijos sem fermento exibiram, durante os 21 dias de análise, maiores valores de tensão na ruptura ( $\sigma_{rup}$ ), módulo de elasticidade (E) e trabalho na ruptura ( $W_{rup}$ ), além de menores valores

---

<sup>1</sup> Artigo redigido segundo normas da Revista *Milchwissenschaft*

para deformação de Hencky na ruptura ( $\epsilon_{rup}$ ). Esses resultados indicaram que o fermento atua sobre o queijo, provocando o amolecimento da textura e a diminuição da elasticidade com o tempo de armazenamento refrigerado.

## SUMMARY

The combined usage of lactic acid in different proportions of mesophilic starter (0,1 and 0,5%) in Minas Frescal cheese manufacturing was evaluated against a standard made only with lactic acid. There were made three trial for each treatment resulting in nine experiments. After two days of manufacturing was determined the cheese phisico chemical composition. Acidification, proteolysis and reological properties were evaluated weekly during 21 days under refrigeration. The cultured cheese presented more acidification (titrable acidity and pH) and soluble nitrogen at 12% TCA, while the unculture cheese had higher soluble nitrogen levels at pH 4.6. The higher acidification and soluble nitrogen level were due to the added starter enzyme activity. The higher levels of unculture cheese soluble nitrogen, confirmed by the eletrophoresis, were related to the high moisture, to the contaminants development (yeasts and molds) and to plasmine action. Related to reological levels the uncultured cheese showed, during the 20 days of analysis, higher stress at fracture ( $\sigma_f$ ) values, deformability modulus (E) and work up at fracture ( $W_f$ ), besides the lower values of Hencky strain at fracture ( $\epsilon_f$ ). These results indicated that the starter acts over the cheese, making it with a soft texture and a decreased elasticity under the refrigeration timing.

## 1. Introdução

O Minas Frescal, apesar de ser um queijo consumido sem maturação, sofre transformações bioquímicas durante o tempo que fica sob estocagem refrigerada, sendo essas, semelhantes às reações que ocorrem em um queijo maturado. Devido à elevada umidade e às altas concentrações de lactose nesse queijo, essas reações ocorrem de forma intensa desde a fabricação, podendo causar alterações indesejáveis como amarelamento da casca, amolecimento do corpo e sabor ácido intenso (5). Um leve sabor ácido é desejável neste tipo de queijo, entretanto, se em excesso, diminui a sua vida útil.

A textura e o comportamento reológico de um queijo estão relacionados à composição, microestrutura e hidrólise das proteínas que ocorre durante o período de armazenamento (16). A proteólise em queijos é afetada pela natureza e atividade específica das enzimas proteolíticas, pela composição físico-química do queijo e condições de maturação, principalmente a temperatura (6). Tanto na glicólise quanto na proteólise, as enzimas atuantes são naturais do leite e/ou provenientes do coalho e fermentos adicionados.

Tentando aumentar a vida de prateleira desses queijos, reduzida devido a essas transformações e, também visando um aumento no rendimento (17), a maioria dos fabricantes modificou a tecnologia de fabricação, substituindo a utilização de 1,0% de fermento láctico mesofílico pela adição de ácido láctico. Entretanto, com essa modificação, os queijos perderam a proteção contra microrganismos contaminantes, proveniente do uso do fermento.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do uso combinado de ácido láctico e diferentes proporções de fermento láctico mesofílico (zero, 0,1 e 0,5%), nas características físico-químicas e propriedades reológicas do queijo Minas Frescal.

O uso do ácido láctico foi mantido para obter-se um melhor rendimento, já que, com o abaixamento do pH, há uma melhor atuação das enzimas do coalho, formando uma coalhada mais firme que irá reter um maior número de elementos do leite. O fermento foi utilizado com o objetivo principal de conferir proteção ao queijo contra microrganismos contaminantes, sendo empregado em baixas proporções para evitar alterações indesejáveis, como proteólise e acidificação intensas. A acidificação, a proteólise e o comportamento reológico, foram avaliados, semanalmente, durante 21 dias de armazenamento refrigerado.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Fabricação de queijo

Leite proveniente da granja leiteira Fazenda São Francisco – Sheffa e da Cooperativa Agropecuária de Campinas, foi padronizado de forma a manter a relação caseína/gordura igual a 0,8. O leite padronizado foi pasteurizado a 72°C por 15 s, resfriado a 5°C e armazenado em latões de 50 litros, em câmara fria a 5°C, durante a noite. No dia seguinte, cerca de 100 litros de leite foram processados segundo técnica descrita por FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994 (10).

Na fabricação dos queijos foi utilizado ácido láctico industrial (85%), marca Synth, na proporção de 0,025% e diferentes proporções de fermento láctico mesofílico: zero, 0,1% e 0,5%. A cultura utilizada foi a R-703, fornecida pela Chr. Hansen, composta de *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*. O ácido láctico foi previamente diluído em água destilada a 2,5%, para prevenir precipitação de proteínas (9). Para a coagulação foi utilizado coalho Chymax, fornecido pela Chr. Hansen.

A salga foi realizada na massa, antes da enformagem. O sal (marca Lebre) foi diluído em 4 litros de água em ebulição, na proporção de 2% do peso do leite.

Após 24 horas de permanência na câmara de refrigeração (2-5°C), os queijos foram embalados em sacos plásticos e conduzidos novamente à câmara, até serem retirados para análise. Para cada tratamento foram conduzidas três repetições.

## *2.2 Análises do leite, soro e queijo*

Na determinação de gordura em queijos usou-se o método volumétrico de Gerber (11). Para as análises de nitrogênio total foi utilizado o método de Kjeldahl (1), sendo os valores de nitrogênio multiplicados pelo fator de conversão 6,38 para obtenção dos valores equivalentes de proteína. O teor de sólidos totais em queijo foi determinado por método gravimétrico (1). O conteúdo de sal no queijo foi determinado pelo método de Volhard (12). O teor de cálcio foi determinado por digestão úmida do queijo, seguida de titulação com EDTA, na presença de murexida (14).

Análises de pH (2) e acidez titulável (1) do queijo foram realizadas nos dias 2, 6, 13 e 20 de estocagem refrigerada.

A extensão e a profundidade da proteólise do queijo foram obtidas determinando-se os teores de nitrogênio solúvel em tampão acetato pH 4,6 e em TCA 12%, nos dias 2, 7, 14 e 21 de armazenamento refrigerado. Os teores de nitrogênio solúvel (NS) determinados pelo método macro Kjeldahl foram convertidos em proteína solúvel através da multiplicação destes pelo fator de conversão ( $N \times 6,38$ ). Os resultados foram expressos como porcentagem dos teores de proteína total (1). Todos os testes foram realizados em triplicata.

### 2.3. Análises reológicas dos queijos: Compressão Uniaxial

Testes de compressão uniaxial foram realizados em um texturômetro TA-XT2I, da Texas Instruments, ajustado com uma célula de carga de 25 kg. Para a preparação das amostras foram retirados seis cilindros de 35 mm de altura por 35 mm de diâmetro de cada queijo, não sendo utilizados o centro e as bordas. As amostras foram então embaladas em filme de PVC e mantidas refrigeradas, sendo a temperatura das amostras para a análise de 10°C. A geometria usada nos ensaios foi uma placa de acrílico de 35 mm de diâmetro. Antes da compressão, a placa foi lubrificada com silicone de baixa viscosidade para evitar atrito entre a amostra e a geometria. Amostras dos queijos foram comprimidas até 80% de sua altura com uma velocidade de compressão de 1 mm/s. Todas as determinações foram realizadas em 6 replicatas.

#### 2.3.1. Análise dos dados

A partir dos dados obtidos de força e distância, foi calculada a deformação de Hencky ( $\varepsilon_H$ ) através da equação (1):

$$\varepsilon_H = -\ln\left(\frac{H_0 - v \times t}{H_0}\right) \quad (1)$$

onde  $H_0$  é a altura da amostra antes da deformação,  $v$  é a taxa linear de compressão e  $t$  é o tempo contado a partir do contato entre a placa superior e a amostra.

Assumindo deformação cilíndrica e volume constante, calculou-se a tensão ( $\sigma$ ):

$$\sigma = \frac{F(t)}{A_0} \times \frac{H(t)}{H_0} \quad (2)$$

onde  $A_0$  é a área inicial da amostra e  $F(t)$  e  $H(t)$  são a força e a altura da amostra no tempo  $t$ .

Através dos valores de  $\sigma$  e  $\varepsilon_H$  calculados, obteve-se a curva tensão-deformação, a partir da qual foram determinadas as propriedades mecânicas do queijo Minas Frescal.

Tensão na ruptura ( $\sigma_{rup}$ ) foi determinada como a tensão no primeiro ponto máximo da curva  $\sigma$ - $\varepsilon_H$  e, deformação na ruptura ( $\varepsilon_{rup}$ ) como a correspondente deformação. O módulo de elasticidade (E) foi determinado como o coeficiente linear da parte inicial da curva, quando esta apresentou comportamento linear. Trabalho na ruptura ( $W_{rup}$ ) foi determinado como a área sob a curva  $\sigma$ - $\varepsilon_H$  até o ponto de ruptura. Para facilitar o cálculo do trabalho na ruptura, a curva  $\sigma$ - $\varepsilon_H$  foi ajustada para um polinômio de grau 10, com ordenada na origem (15).

$$\sigma_r = \sum_{i=1}^{10} a_i \varepsilon^i \quad (3)$$

e o trabalho na ruptura foi calculado como:

$$W_r = \int_0^{\varepsilon} \sigma_r d\varepsilon \quad (4)$$

#### 2.4. Eletroforese em Uréia-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) (gel de separação a 12,5% e de concentração a 4%) foi realizada usando-se uma unidade vertical Protean II xi (Bio-Rad), de acordo com uma modificação do método descrito por FARKYE et al. (7). Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB), seguindo-se metodologia descrita por BLAKESLEY & BOEZI, 1977 (3).

Os extratos para eletroforese foram preparados dissolvendo-se 100mg de amostra de queijo em 5mL de tampão, com aquecimento a 40°C durante 1 hora. O padrão foi obtido a partir de 50mg de caseinato de sódio dissolvido em 5mL de tampão. O tampão para

dissolução da amostra foi preparado usando-se 1,5g de trishidroximetil aminometano (TRIS), 98g de uréia, 0,8mL de ácido clorídrico concentrado, 1,4mL de 2-mercaptoetanol, 0,3g de azul de bromofenol, para um volume final de 200mL com água destilada.

Inicialmente o gel sofreu uma pré-corrída a 280V durante 30 a 40 minutos, para o equilíbrio do gel. A separação das amostras foi feita inicialmente a 280V e depois a 300V, até o corante indicador (azul de bromofenol) atingir o final do gel (cerca de 4 a 5 horas). Os géis foram corados por imersão na solução corante durante 1 noite e descorados com água destilada.

### **3. Planejamento Experimental e Análise Estatística dos Resultados**

O delineamento experimental foi do tipo aleatorizado em blocos. O fator estudado foi porcentagem de fermento láctico (A), nos níveis de zero, 0,1 e 0,5%. Os três ensaios foram realizados em triplicata, resultando em nove experimentos.

Os resultados de composição foram analisados através de Análise de Variância, utilizando-se o teste de Duncan para verificar diferenças entre as médias.

Para a avaliação do desenvolvimento de pH e acidez, da proteólise e do comportamento reológico do queijo foi adotado um delineamento do tipo split-plot, sendo que a sub-parcela foi obtida pela incorporação do fator tempo de armazenamento refrigerado (B). As análises de acidez e pH foram realizadas nos dias 2, 6, 13 e 20 e de proteólise e reologia nos dias 2, 7, 14 e 21 de armazenamento refrigerado.

O teste F-ANOVA foi usado para testar as diferenças entre tratamentos, entre tempos e a interação tempo por tratamento.

Foi utilizado o teste de Duncan, de comparações múltiplas, para agrupar tratamentos e/ou tempos com médias cujas diferenças não foram estatisticamente significativas.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Composição

A variação na proporção de cultura láctica utilizada não resultou em diferenças significativas ( $p > 0,16$ ) na composição físico-química dos queijos (*Tabela 1*).

Os valores de composição encontrados podem ser considerados normais para o queijo Minas Frescal e, a semelhança entre as composições dos queijos fabricados através dos diferentes tratamentos é função da padronização dos teores de caseína/gordura do leite utilizado.

<b>TABELA 1. Média (n=3) da composição dos queijos obtidos utilizando-se zero, 0,1 e 0,5% de fermento láctico</b>			
Componente	% de fermento láctico		
	Zero	0,1	0,5
Umidade %	60,44	62,89	61,25
Gordura %	22,67	21,83	21,92
GBS <sup>1</sup>	57,28	58,91	57,35
Proteína %	15,96	15,45	15,99
Sal%	1,17	1,16	1,15
S/U <sup>2</sup>	1,94	1,84	1,86
Cálcio%	0,55	0,54	0,53
Ca/P <sup>3</sup>	3,45	3,51	3,33
pH	6,37	6,28	6,16
<sup>1</sup> Gordura em base seca			
<sup>2</sup> Sal/Umidade			
<sup>3</sup> Cálcio/proteína			

O valor de sal/umidade (S/U) é comumente baixo para esse tipo de queijo, não interferindo nas transformações sofridas pelo queijo durante sua vida de prateleira.

#### 4.2. Evolução do pH e acidez

As Figuras 1 e 2 mostram a evolução do pH e acidez titulável, respectivamente, durante 20 dias de armazenamento refrigerado.

Para acidez e pH foram observadas interações tempo\*tratamento ( $p=0,083$  e  $p=0,0091$ , respectivamente), como pode ser observado na Tabela 2.

O pH dos queijos fabricados sem fermento manteve-se estável durante os 20 dias de estocagem. Esses queijos apresentaram um leve aumento de acidez na última semana de análise, provavelmente, devido à atuação de microrganismos contaminantes.

Para os queijos fabricados com adição de cultura láctica, o pH diminuiu e a acidez aumentou durante os 20 dias de análise. Os queijos com 0,5% de fermento apresentaram mudanças mais acentuadas, porém não diferiram significativamente ( $p=0,05$ ) dos queijos com 0,1% de cultura. Entretanto, os queijos com fermento apresentaram diferença significativa ( $p=0,05$ ) quando comparados aos queijos sem fermento.

Essas variações de pH e acidez estão diretamente ligadas à degradação da lactose residual nos queijos. As enzimas necessárias à ocorrência desse processo são fornecidas pela flora natural do leite, que resiste à pasteurização, e pelos microrganismos do fermento láctico (13). Conseqüentemente, os queijos que foram adicionados de fermento apresentaram uma maior acidificação, e como esperado, o queijo com 0,5% de cultura foi o que mostrou os maiores valores de acidez e os menores valores de pH.

Nos queijos com fermento, pode-se observar uma acidificação mais intensa nos primeiros 14 dias. Isso ocorreu, provavelmente, devido à escassez de substrato, ou seja, queda no teor de lactose disponível após esse período.

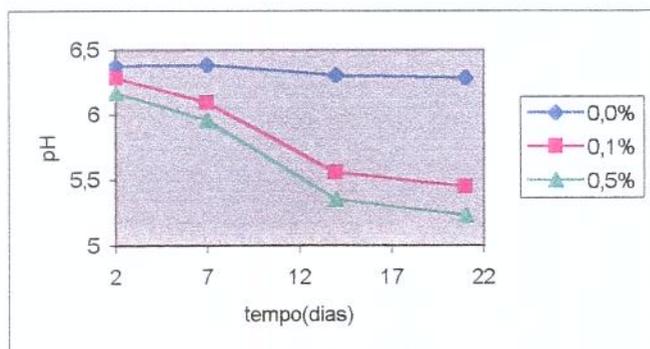


FIGURA 1. Evolução do pH durante a estocagem

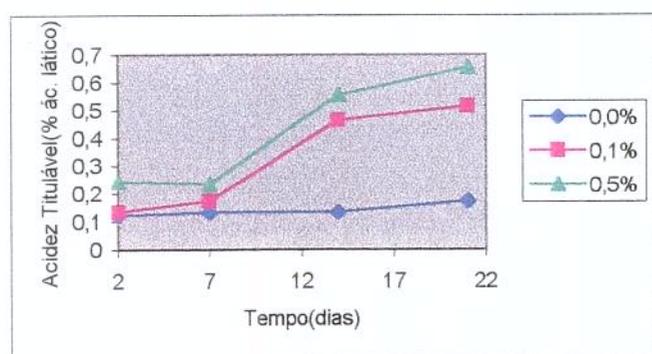


FIGURA 2. Evolução da acidez titulável durante a estocagem

TABELA 2. Quadrado médio e probabilidades para valores de pH e acidez titulável durante 21 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	Acidez titulável			pH	
	GL	P	QM	P	Ms
Tratamentos (T)	2	0,0232	0,243	0,0014	1,436
Erro (a)	4		0,022		0,028
Tempo (t)	3	0,002	0,184	0,0001	0,835
Interação (T*t)	6	0,0873	0,036	0,0091	0,151
Erro (b)	18		0,016		0,037
R <sup>2</sup>		0,837		0,913	

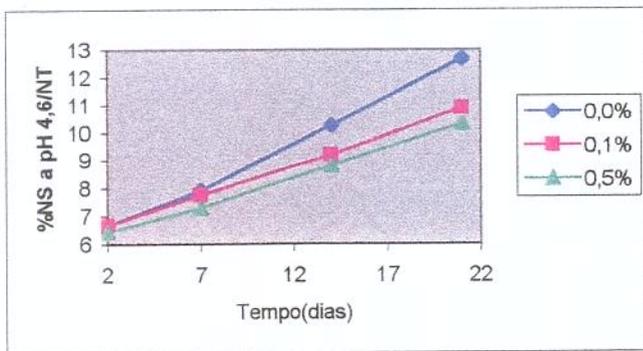
P = probabilidades; QM= quadrado médio; GL = graus de liberdade

### 4.3. Proteólise

A *Figura 3* mostra os níveis de extensão da proteólise durante os 21 dias de armazenamento refrigerado do queijo Minas Frescal. Para todos os tratamentos, houve um aumento nos índices de NS (pH 4,6)/NT neste período.

Os queijos fabricados sem adição de fermento, apresentaram extensão de proteólise mais intensa, diferindo significativamente ( $p=0,05$ ) dos queijos com fermento.

**FIGURA 3.** Evolução dos índices de NS (pH 4,6)/NT durante a estocagem.



A evolução dos índices de %NS (TCA12%)/NT durante a estocagem é apresentada na *Figura 4*. Houve aumento dos níveis de nitrogênio solúvel em TCA 12% com o tempo de armazenamento refrigerado do queijo ( $p=0,0001$ ).

Apesar dos tratamentos não apresentarem diferenças estatisticamente significativas entre si, foi observada uma tendência de aumento na profundidade da proteólise, conforme aumentou-se a proporção de fermento adicionado. Maior profundidade de proteólise se deve à presença das enzimas proteolíticas do fermento, que hidrolisam, principalmente, os peptídeos resultantes da ação do coalho sobre as caseínas, gerando pequenos peptídeos e aminoácidos livres (8).

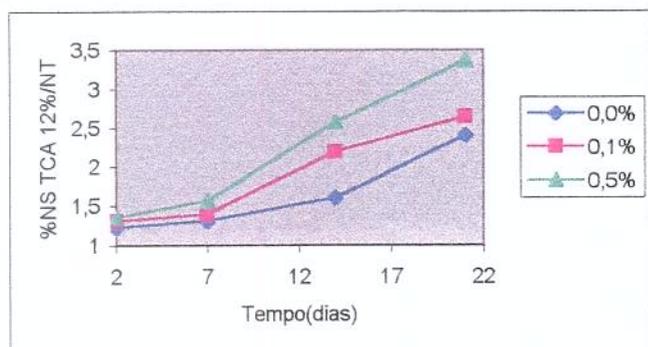


FIGURA 4. Evolução dos índices de NS (TCA 12%/NT) durante a estocagem

TABELA 5. Quadrado médio e probabilidades para os índices de proteólise durante 21 dias de armazenamento refrigerado.

Fatores	NSpH4,6		NSTCA12%		
	GL	P	QM	P	QM
Tratamentos (T)	2	0,0045	4,163	0,122	1,005
Erro (a)	2		0,150		0,269
Tempo (t)	3	0,0001	38,306	0,0001	4,414
Interação (T*t)	6	0,016	0,805	0,269	0,173
Erro (b)	18		0,225		0,123
R <sup>2</sup>		0,988		0,897	

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

Para os três tratamentos foi utilizada a mesma quantidade de coalho e, após dois dias da fabricação, não foram observadas diferenças significativas com relação à composição química. Entretanto, pode-se observar que, os queijos sem fermento apresentaram maiores índices de extensão da proteólise, em especial, depois dos 14 dias de estocagem, e apesar de pequena, a diferença foi estatisticamente significativa.

As diferenças entre as frações de nitrogênio solúvel a pH 4,6 obtidas, devem estar relacionadas à fatores como: 1) com o decorrer do tempo, os queijos sem fermento apresentaram menor acidificação, conseqüentemente, menor dessoragem e, por esse motivo, mantiveram uma maior umidade durante o armazenamento. Altas umidades favorecem a proteólise; 2) O pH mais alto dos queijos sem fermento pode ter favorecido a ação da plasmina, sobre a  $\beta$ - e a  $\alpha_{s2}$ -caseína; 3) o alto desenvolvimento de contaminantes que ocorreu nos queijos sem fermento, durante o período de estocagem, quando comparados aos queijos com fermento. Queijos sem fermento apresentaram altas contagens de bolores e leveduras. Esses microrganismos podem ter liberado enzimas proteolíticas, que atuando junto com o coalho residual, causaram uma proteólise mais intensa nesses queijos.

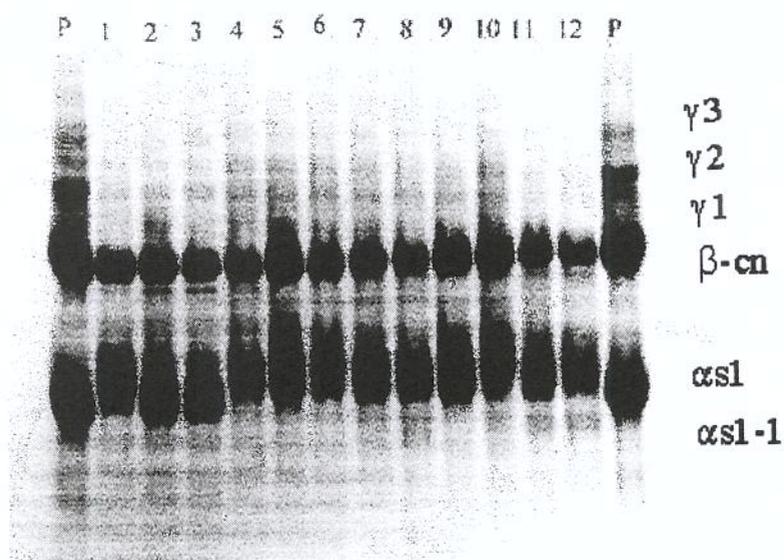
#### 4.4. Eletroforese

A *Figura 5* apresenta o eletroforetograma correspondente aos três tratamentos nos dias 2, 7, 14 e 21 de armazenamento refrigerado.

Durante o período avaliado, pode ser observado que a concentração de  $\alpha_{s1}$ -caseína diminuiu com a mesma intensidade para todos os queijos, com o aparecimento da  $\alpha_{s1-1}$  caseína. No queijo fabricado sem fermento, apareceram outras duas bandas não identificadas, de mobilidade eletroforética maior que a da  $\alpha_{s1-1}$  caseína.

A banda correspondente à  $\beta$ -caseína também diminuiu levemente para todos os queijos, mas somente para o queijo sem fermento aparecem as bandas correspondentes às  $\gamma$ -caseínas. Para os queijos sem fermento pode-se observar, já a partir do sétimo dia, uma banda de mobilidade maior que a  $\beta$ -caseína, o mesmo acontecendo para o queijo com 0,5% de fermento a partir do dia 14.

Em geral, os queijos sem fermento apresentaram maior número de bandas, como pode ser observado no eletroforetograma da Figura 5. Isso ocorreu, provavelmente, em função da ação de agentes proteolíticos como a plasmina e enzimas de microrganismos contaminantes, além do coagulante residual. Esse fato talvez possa explicar os maiores níveis de nitrogênio solúvel em pH 4,6 dos queijos fabricados somente com ácido láctico.



**FIGURA 5.** Eletroforetograma do queijo Minas Frescal nos dias 2, 7, 14 e 21 de estocagem refrigerada. (1, 2, 3 e 4 correspondem ao queijo sem fermento; 5, 6, 7 e 8 correspondem ao queijo com 0,1% de fermento; 9, 10, 11 e 12 correspondem ao queijo com 0,5% de fermento; P corresponde ao padrão caseinato de sódio).

#### 4.5. Reologia

O comportamento reológico dos queijos durante os 21 dias de armazenamento refrigerado está ilustrado nas Figuras 6, 7, 8 e 9.

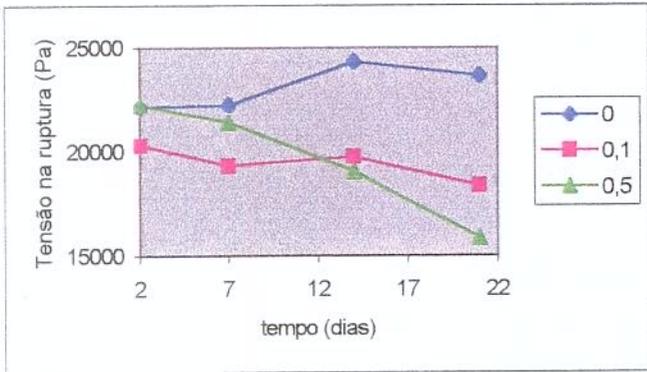


Figura 6. Variação da Tensão na ruptura durante a estocagem

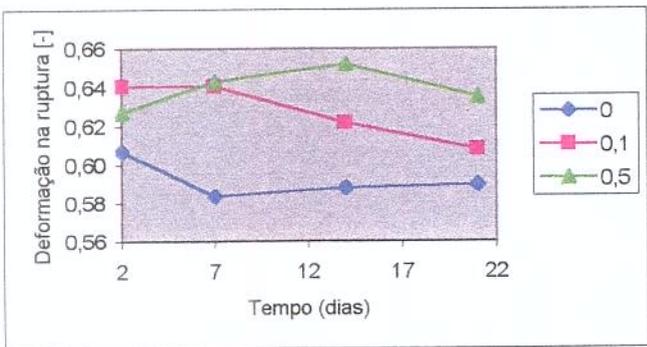


Figura 7. Variação da deformação de Hencky na ruptura durante a estocagem

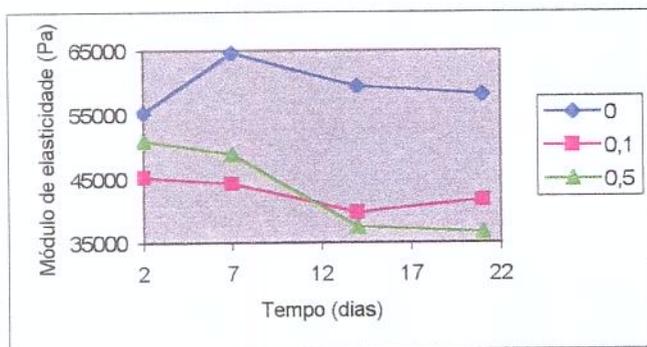


Figura 8. Variação do módulo de elasticidade durante a estocagem

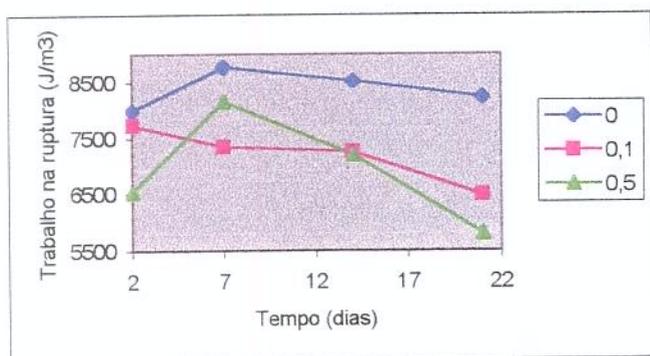


Figura 9. Variação do trabalho na ruptura durante a estocagem

Os resultados da análise estatística para os dados de reologia estão apresentados na Tabela 4.

Os valores de tensão na ruptura ( $\sigma_{rup}$ ), que estão relacionados à dureza do queijo, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) para as diferentes proporções de fermento. Entretanto, a tensão na ruptura foi afetada significativamente pelo tempo de armazenamento refrigerado ( $p=0,08$ ). Os queijos com fermento mostraram uma tendência de diminuição na dureza com o tempo, em especial o queijo com 0,5% de fermento (*Figura 5*). Esse amolecimento é provavelmente devido à proteólise realizada pelos microrganismos do fermento (*Figura 4*), que mostra comportamento similar à tensão na ruptura.

Queijos sem fermento apresentaram deformação máxima de Hencky ( $\epsilon_{Hrup}$ ) significativamente menor quando comparados aos queijos com 0,5% de fermento ( $p=0,05$ ), o que indica que o queijo sem fermento apresentou uma textura menos quebradiça (*Figura 6*). Os valores de tensão na ruptura obtidos são similares aos do queijo Feta (15), um queijo de consistência mole, porém a deformação na ruptura do queijo Minas Frescal foi duas vezes maior que a do queijo Feta. Isso significa que a elasticidade do Minas Frescal é muito superior à do queijo Feta, e pode sofrer maiores deformações sem rompimento.

O módulo de elasticidade (E), apresentou diferenças significativas ( $p=0,05$ ) entre os queijos com e sem fermento. O módulo de elasticidade depende fortemente da altura inicial da amostra e, por isso, cuidados especiais foram tomados no corte dessas, de maneira que a diferença de altura entre as amostras foi menor que 1%. Apesar do tempo não afetar significativamente ( $p=0,31$ ) os valores de E, pode-se observar que, para os queijos com fermento, o módulo de elasticidade diminuiu com o tempo (*Figura 7*), ou seja, a estrutura desses queijos foi afetada pela proteólise, devido ao alto número de ligações hidrolisadas (16). Para os queijos sem fermento, o módulo de elasticidade manteve-se constante, o que indica que as variações nas propriedades reológicas, do queijo Minas Frescal, estão relacionadas à ação do fermento.

Para o trabalho na ruptura ( $W_{rup}$ ), não foram observadas diferenças significativas ( $p=0,05$ ) entre os tratamentos, mas o tempo de armazenamento afetou esse parâmetro ( $p=0,01$ ). Houve uma diminuição dos valores de  $W_{rup}$  para todos os tratamentos durante o período de análise, o que significa que com o tempo, a energia necessária para triturar o queijo tornou-se menor (*Figura 8*). Os queijos com fermento apresentaram maior variação com o tempo que os queijos sem fermento, apesar de não terem mostrado diferença estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ), confirmando a influência da utilização de fermento nas propriedades mecânicas do queijo Minas Frescal.

De acordo com CREAMER & OLSON (4), o amolecimento inicial da estrutura dos queijos está relacionado à hidrólise da  $\alpha_{s1}$ -caseína, liberando  $\alpha_{s1-1}$  caseína, causada, principalmente, pela ação do coagulante. Porém, através dos resultados obtidos de nitrogênio solúvel em TCA 12%, que indicam a ação do fermento, e do comportamento reológico observado, fica evidente que, com o tempo, a proteólise causada pelos

microrganismos do fermento também tiveram um papel importante no amolecimento do queijo.

**TABELA 4. Quadrado médio e probabilidades para os índices reológicos durante 21 dias de armazenamento refrigerado.**

Fatores	$\sigma_{rup}$			$\epsilon_{Hrup}$		E		$W_{rup}$	
	GL	P	QM	P	QM	P	QM	P	QM
Tratamento (T)	2	0,1276	51027773	0,0064	0,0755	0,0407	952731866	0,1162	7067189
Erro (a)	4		14178971		0,0012		120435309		1827677
Tempo (t)	3	0,0851	17652647	0,7668	0,0005	0,3124	120336791	0,0119	5433501
Interação T*t	6	0,1893	11231802	0,8841	0,0005	0,734	54771539	0,5167	952688
Erro (b)	15		6610529		0,0014		92911618		1052270
R <sup>2</sup>		0,879		0,643		0,864		0,874	
P = probabilidades									
QM = quadrado médio									
GL = graus de liberdade									

A composição do queijo tem grande influência sobre as suas propriedades mecânicas. Após dois dias da fabricação, as composições dos queijos estudados foram bastante semelhantes (*Tabela 1*). Entretanto, somente a proteólise, acidificação e propriedades reológicas foram acompanhadas durante os 21 dias de análise. O conhecimento das mudanças na composição dos queijos durante os dias de armazenamento, que certamente afetaram a estrutura física dos queijos, seria de grande importância para uma melhor avaliação das propriedades mecânicas dos queijos.

## 5. Conclusão

A utilização de fermento láctico mesofílico, em pequenas proporções (0,1 e 0,5%), na fabricação do queijo Minas Frescal, em comparação a um padrão, fabricado somente com ácido láctico, não resultou em diferenças significativas na composição química dos queijos, mas influenciou na acidificação, na proteólise e, conseqüentemente nas propriedades mecânicas do queijo.

Os queijos fabricados somente com ácido apresentaram maior extensão de proteólise, provavelmente em função de crescimento de microrganismos contaminantes e da ação da plasmina.

Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa, a profundidade de proteólise foi mais intensa nos queijos com 0,5% de fermento. Isso pode explicar o comportamento reológico dos queijos, que tornaram-se mais macios e menos elásticos, requerendo menos energia para serem triturados, conforme aumentou-se a proporção de fermento láctico utilizado.

## 6. Referências bibliográficas

- (1) ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**, Washington, 16<sup>th</sup> Edição. 1995.
- (2) ATHERTON, H.V. NEWLANDER, J.A. **Chemistry and testing of dairy products**. 4. ed. Westport: AVI, 396p, 1981.
- (3) BLAKESLEY, R.W.; BOEZI, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, v. 82, p.580-582, 1977.

- (4) CREAMER, L.K., OLSON, N.F. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. **Journal of Food Science**. v. 47, p.631, 1982.
- (5) DORNELLAS, J. R. F. Efeito do Tipo de Coagulante e Acidificante no Rendimento, Proteólise e “Shelf Life” do Queijo Minas Frescal. **Dissertação de mestrado** – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1997.
- (6) EXTERKATE, F.A.; LAGERWERF, F.M.; HAVERCAMP, J.; SCHLKWIK, S. The selectivity of chymosin action on  $\alpha_{s1}$ - and  $\beta$ -caseins in solutions is modulated in cheese. **Internatinal Dairy Journal**. v. 7, p. 47-54, 1997.
- (7) FARKYE, N.Y.; KIELY, L.J.; ALLSHOUSE, R.D.; KINDSTEDT, P.S. Proteolysis in Mozzarella cheese during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1433-1438, 1991.
- (8) FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v. 72, p. 1379-1400, 1989.
- (9) FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON-POMBO-P, A.F.; SOUZA, H. M. ; MUNCK, A.V. Estudo conclusivo a respeito da fabricação do queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 35 n 208, p 13-16, 1980
- (10) FURTADO, M.M., LOURENÇO NETO, J.P.M. Queijo Minas Frescal. In **Tecnologia de Queijos**. 1ª Edição. p. 73-75, 1994.
- (11) INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1985. **Normas Analíticas do IAL**. D. B. Rebocho (Ed.), São Paulo, S.P.

- (12) RICHARDSON, G.H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products.**  
15 ed. Am. Publ. Health Assoc., Washington, DC. ed. 1985.
- (13) SHARPE, E. Lactic acid bacteria in the dairy industry. **Journal of Society of Dairy Technology.** v. 32, n. 1, p. 9-18, 1979.
- (14) TARAS, M.J. Standard methods for the examination of water and waste water.  
**American Public Health Association**, 1971.
- (15) WIUM, H., QVIST, K.B. Rheological properties of UF-Feta cheese determined by uniaxial compression and dynamic testing. **Journal of Texture Studies.** v. 28, p. 435-454, 1997.
- (16) WIUM, H., KRISTIANSEN, K.R., QVIST, K.B. Proteolysis and its role in relation to texture of Feta cheese made from ultrafiltered milk with different amounts of rennet. **Journal of Dairy Research.** v. 65, p. 665-674, 1998.
- (17) WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; FURTADO, M. M. , MUNCK, A. V. Estudo da fabricação do queijo Minas Frescal com ácido láctico em substituição do fermento láctico, **Anais do V Congresso Nacional de Laticínios.** EPAMIG/ILCT. p 160 -182, 1978.