

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**EFEITO DO TIPO DE COAGULANTE E
ACIDIFICANTE NO RENDIMENTO, PROTEÓLISE E
"SHELF LIFE" DO QUEIJO MINAS FRESCAL.**

José Raimundo F. Dornellas

Autor

Salvador M. Roig

Orientador

Carlos R. F. Grosso

Co-orientador

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

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
JOSÉ RAIMUNDO F. DORNELLAS
e aprovada pela Comissão
Julgadora em 01 de agosto de 1997.

CAMPINAS, 1997

Campinas, 01 de agosto de 1997.

Salvador Massagué
Prof. Dr. SALVADOR MASSAGUER
ROIG - Presidente da Banca



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T.º	Unicamp
N.º	D734e
V.º	Ex.
F.º	31690
PROG	282/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/09/97
N.º CPU	

CM-00101070-9

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

D734e Dornellas, José Raimundo F.
Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise e "shelf life" do queijo Minas Frescal / José Raimundo F. Dornellas. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Salvador M. Roig
Co-orientador : Carlos R. F. Grosso
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Queijo.* 2.Enzimas proteolíticas.* 3.Ácido láctico.*
4.Coagulantes.* 5.Coalhos.* I. Roig, Salvador Massaguer
II.Grosso, Carlos Raimundo Ferreira III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.Título.

BANCA EXAMINADORA



PROF. DR. SALVADOR MASSAGUER ROIG
(ORIENTADOR)



PROFa. Dra. WALKIRIA H. VIOTTO
(MEMBRO)



PROFa. Dra. ELIANA DE PAULA RIBEIRO
(MEMBRO)

Dra. ARIENE G. F. VAN DENDER
(MEMBRO)

NAVEGADORES ANTIGOS tinham uma frase gloriosa: "Navegar é preciso; viver não é preciso".

Quero para mim o espírito desta frase, transformada a forma para casar com o que eu sou: **Viver não é necessário; o que é necessário é criar.**

Não conto gozar a minha vida; nem gozá-la penso. Só quero torná-la grande, ainda que para isso tenha de ser o meu corpo e a minha alma a lenha desse fogo.

Só quero torná-la de toda a humanidade; ainda que para isso tenha de a perder como minha.

Cada vez mais assim penso. Cada vez mais ponho na essência anímica do meu sangue o propósito impessoal de engrandecer a pátria e contribuir para a evolução da humanidade.

É a forma que em mim tomou o misticismo da nossa raça.

Fernando Pessoa.

À minha mãe, que me nutriu com sua vida, seu corpo e seu amor,

Ao meu pai, anjo de mim de todas as horas,

Aos meus irmãos, companheiros de tantas caminhadas,

À todos os anjos que marcaram e marcam minha vida, de momentos, de histórias...

Ao Mauro, amigo de fé e companheiro de longa data,

À Carmen Odete Térreo, por sempre acreditar no meu trabalho, ser exemplo e estímulo,

DEDICO ESTE TRABALHO.

AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. Salvador Massaguer Roig, pela amizade e orientação deste trabalho.
- Ao prof. Dr. Carlos R. F. Grosso, pela amizade, compreensão, carinho, estímulo e imensuráveis esforços para a realização deste trabalho. Meu muito obrigado!
- Ao amigo Múcio M. Furtado, por todo o apoio recebido não só durante este trabalho, mas também, na longa caminhada desde o meu tempo de "menino".
- À profa. Dra. Walkiria H. Viotto pelos inúmeros esforços e auxílio científico durante os trabalhos práticos e teóricos.
- A prof. Mirna Lúcia Gigante, pela amizade e conforto durante o desenvolver do trabalho.
- À CAPES, pela bolsa de mestrado e apoio que possibilitou a realização do presente trabalho.
- Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões na conclusão deste trabalho.
- À Dra. Tereza , pela orientação na etapa de avaliação sensorial.
- Ao Prof. Dr. Ademir Petenate, pela orientação no delineamento estatístico deste trabalho.
- À FEA por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos funcionários da secretaria do Departamento de Tecnologia de Alimentos e da Biblioteca da FEA, pela amizade e apoio.
- Aos funcionários do Laboratório Geral , Ana Lourdes, Ana Maria, Alice, Bernadete, Alaíde e Nelson, pela colaboração, amizade, calor humano e incentivo.
- À Liane, por todo o apoio nas determinações de eletroforese.
- Aos funcionários do Laboratório de Leite e Derivados, Cláudia, Bete e Armando, pela colaboração, amizade, carinho e partilha de histórias, de momentos.
- Aos amigos do curso de pós-graduação, pelo intercâmbio cultural e comunhão de ideais.

-À Guida pela infinita ajuda durante os trabalhos de análise sensorial e por esta amizade, carinho e calorosa energia.

- Aos colegas Abel, Carolina , Marcos, Lully, que às vezes sem perceber ajudaram-me a prosseguir na busca da realização deste trabalho.

-À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho.

- Aos meus irmãos pela confiança e estímulo.

-Aos meus pais, por todo amor que houver nesta vida.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	I
Lista de Figuras.....	IV
Resumo.....	VI
Summary.....	VIII
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Revisão Bibliográfica.....	4
3.1. Queijo Minas Frescal e utilização de ácido láctico.....	4
3.2. Coalhos, coagulantes e a coagulação do leite.....	7
3.2.1. Coagulantes vegetais	9
3.2.2. Coagulantes microbianos	9
3.2.3. Coalho obtido por fermentação.....	10
3.2.4. Rendimento e cifra de transição em queijos.....	13
3.2.5. Alterações no queijo Minas Frescal durante o armazenamento.....	14
3.2.5.1. Lactose e pH.....	14
3.2.5.2. Proteínas	15
3.3. Efeito do teor de sal na proteólise.....	22
3.4. Determinação da textura em queijos.....	23
3.5. Determinação da cor em queijos.....	23
3.6. Análise sensorial em queijos.....	24
4 Material e Métodos	25
4.1. Material	25
4.1.1. Processo de fabricação do queijo Minas Frescal.....	25
4.2. Métodos	27
4.1.1. Determinação da força do coalho.....	27
4.2.2. Análises físico-químicas do leite pasturizado.....	28
4.2.2.1. Acidez Titulável.....	28
4.2.2.2. pH.....	29
4.2.2.3. Determinação do Teor de Gordura.....	29
4.2.2.4. Determinação do Teor de Sólidos Totais (EST).....	29
4.2.2.5. Determinação do Teor de Extrato Seco Desengordurado (ESD)	29
4.2.2.6. Determinação do Teor de Nitrogênio.....	29
4.2.2.7. Determinação do teor de Caseína em leite.....	30
4.3. Análises físico-químicas do soro.....	30
4.4. Análises físico-químicas do queijo.....	30
4.4.1. Determinação do Teor de Gordura	30
4.4.2. Determinação do Teor de Sal em queijo.....	31
4.4.3. Determinação do Teor de Umidade / Extrato Seco Total (EST).....	31
4.4.4. Determinação do Teor de Extrato Seco Desengordurado.....	31
4.4.5. Determinação do Teor de Nitrogênio	31
4.4.6. Proteólise.....	32
4.4.6.1. Nitrogênio Solúvel a pH 4,6 e em TCA 12%.....	32
4.4.6.2. Eletroforese.....	32
4.4.7. Determinação da Cor.....	33
4.4.8. Determinação Instrumental do perfil de Textura do queijo Minas frescal.....	33
4.5. Cálculos das porcentagens de transição de Gordura e Sólidos Totais do leite para o soro	34

4.6. Cálculo do rendimento de fabricação.....	35
4.7. Avaliação Sensorial.....	35
4.8. Análises Microbiológicas	36
4.9. Planejamento Experimental e Análise Estatística.....	37
5. Resultados e Discussões	38
5.1. Composição Físico-química do leite.....	38
5.2. Composição Físico-química do queijo	41
5.3. Composição Físico-química do soro.....	45
5.4. Rendimento	49
5.5. Cifras de transição	52
5.6. Proteólise	54
5.7. Eletroforese	61
5.8. Evolução do pH.....	70
5.9. Perda de soro durante estocagem.....	71
5.10 Avaliação Sensorial	73
5.11 Avaliação Microbiológica	77
5.12 Avaliação da Cor.....	80
5.12 Avaliação Instrumental da textura.....	83
6. Conclusões	84
7. Bibliografia Consultada	86

LISTA de TABELAS

Tabela 5.5.1.1. Composição físico-química do leite utilizado no processamento do coalho bovino com fermento láctico.....	38
Tabela 5.5.1.2. Composição físico-química do leite utilizado no processamento com coagulante microbiano e ácido láctico.....	39
Tabela 5.5.1.3. Composição físico-química do leite utilizado no processamento com coagulante microbiano e fermento láctico.....	39
Tabela 5.5.1.4. Composição físico-química do leite utilizado no processamento com coalho obtido por fermentação e ácido láctico.....	40
Tabela 5.5.1.5. Composição físico-química do leite utilizado no processamento com coalho obtido por fermentação e fermento láctico.....	40
Tabela 5.5.2.1. Composição físico-química do queijo produzido com coalho bovino e fermento láctico.....	42
Tabela 5.5.2.2. Composição físico-química do queijo produzido com coagulante microbiano e ácido láctico.....	42
Tabela 5.5.2.3. Composição físico-química do queijo produzido com coagulante microbiano e fermento láctico.....	43
Tabela 5.5.2.4. Composição físico-química do queijo produzido com coalho obtido por fermentação e ácido láctico.....	43

Tabela 5.5.2.5. Composição físico-química do queijo produzido com coalho obtido por fermentação e fermento láctico.....	44
Tabela 5.5.2.6. Composição média do queijo Minas Frescal	44
Tabela 5.5.3.1. Composição físico-química do soro produzido com coalho bovino e fermento láctico.....	46
Tabela 5.5.3.2. Composição físico-química do soro produzido com coagulante microbiano e ácido láctico	46
Tabela 5.5.3.3. Composição físico-química do soro produzido com coagulante microbiano e fermento láctico.....	47
Tabela 5.5.3.4. Composição físico-química do soro produzido com coalho obtido por fermentação e ácido láctico.....	47
Tabela 5.5.3.5. Composição físico-química do soro produzido com coalho obtido por fermentação e fermento láctico.....	48
Tabela 5.5.4.5. Resultados dos cálculos dos rendimentos de fabricação.....	50
Tabela 5.5.5.1. Tabela de cifras de transição.....	53
Tabela 5.5.10.1. Avaliação sensorial da textura.....	73
Tabela 5.5.10.2. Avaliação sensorial da aparência.....	74

Tabela 5.5.10.3. Avaliação sensorial hedônica global.....	75
Tabela 5.5.10.4. Avaliação sensorial do sabor.....	75
Tabela 5.5.10.5. Percentual de observações sobre o sabor amargo.....	76
Tabela 5.5.11.1. Resultados microbiológicos do leite utilizado no processamento.....	77
Tabela 5.5.11.1. Resultados microbiológicos do queijo na primeira semana de armazenagem.....	78
Tabela 5.5.11.2. Resultados microbiológicos do queijo na última semana de armazenagem.....	79
Tabela 5.5.12.1. Determinação Instrumental da Cor - Tratamento BOF.....	80
Tabela 5.5.12.2. Determinação Instrumental da Cor - Tratamento MICA.....	81
Tabela 5.5.12.3. Determinação Instrumental da Cor - Tratamento MICROF.....	81
Tabela 5.5.12.4. Determinação Instrumental da Cor - Tratamento CHA.....	82
Tabela 5.5.12.5. Determinação Instrumental da Cor - Tratamento CHF.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.5.6.1. Evolução do nitrogênio solúvel a pH 4,6 durante a armazenagem.....	54
Figura 5.5.6.2. Evolução do nitrogênio solúvel em TCA 12% durante a armazenagem.....	56
Figura 5.5.6.3. Degradação relativa da caseína durante a armazenagem	57
Figura 5.5.6.4. Comparação do poder proteolizante do coalho obtido por fermentação versus coagulante microbiano (expresso como NS a pH 4,6/NT).....	58
Figura 5.5.6.5. Comparação do poder proteolizante do coalho obtido por fermentação versus coagulante microbiano (expresso como NS em TCA 12%/NT).....	59
Figura 5.5.6.6. Efeito sinérgico entre enzimas do coagulante microbiano e fermento láctico.....	60
Figura 5.5.6.7. Efeito sinérgico entre enzimas do coalho obtido por fermentação e fermento láctico.....	61
Figura 5.5.7.1. Eletroforetograma em PAGE/uréia para BOF.....	65
Figura 5.5.7.2. Eletroforetograma em PAGE/uréia para MICA.....	66

Figura 5.5.7.3. Eletroforetograma em PAGE/uréia para MICROF.....	67
Figura 5.5.7.4. Eletroforetograma em PAGE/uréia para CHA.....	68
Figura 5.5.7.5. Eletroforetograma em PAGE/uréia para CHF.....	69
Figura 5.5.8.1. Evolução do pH durante a estocagem.....	70
Figura 5.5.9.1. Média da perda de soro nos diversos tratamentos durante a estocagem.....	72

Dissertação de Mestrado: EFEITO DO TIPO DE COAGULANTE E ACIDIFICANTE NO RENDIMENTO, PROTEÓLISE E "SHELF LIFE" DO QUEIJO MINAS FRESCAL.

Autor: José Raimundo Ferreira Dornellas

Orientador: Salvador M. Roig

Co-orientador: Carlos R. F. Grosso

RESUMO

Avaliou-se neste estudo o emprego de três agentes coagulantes (bovino , microbiano e obtido por fermentação de *E. coli* K12, modificada geneticamente) na fabricação do queijo Minas Frescal. Objetivou-se avaliar o "shelf life" do queijo Minas Frescal com o uso dos agentes coagulantes conjuntamente com o uso de fermento láctico e ácido láctico 85%. Cinco tratamentos repetidos em três dias diferentes, utilizando-se 50 litros de leite para cada tratamento, foram denominados da seguinte forma: BOF (coalho bovino e fermento láctico); MICA (coagulante microbiano e ácido láctico); MICROF (coagulante microbiano e fermento láctico); CHA (coalho obtido por fermentação e ácido láctico); CHF (coalho obtido por fermentação e fermento láctico). Avaliação do rendimento, proteólise, textura instrumental, cor, microbiologia e sensorial foi efetuada semanalmente, durante o período de um mês, para cada repetição. Não foram detectadas diferenças significativas para as porcentagens de transição de proteína, gordura e extrato seco total. Não foram observadas diferenças significativas no rendimento dos tratamentos, muito embora o rendimento em quilos de leite por quilos de queijo tenha sido maior para o coalho obtido por fermentação, o que sugere uma maior retenção de água no produto final. Os teores de Nitrogênio Solúvel a pH 4,6 e de nitrogênio Solúvel em TCA 12% (NNP), aumentaram significativamente durante o período de "shelf life" do produto ($p=0,0001$). Os dados sugerem que a variação do

teor de sal no queijo Minas Frescal influenciam os índices de maturação, o que pode ser justificado pela diferença de umidade encontrada entre as repetições. A análise eletroforética dos queijos mostrou maior degradação dos produtos fabricados com coagulante microbiano e fermento láctico (MICROF), seguido por coagulante microbiano com ácido láctico (MICA) , coalho bovino com fermento láctico (BOF), coalho obtido por fermentação com fermento láctico (CHF) e finalmente por coalho obtido por fermentação com ácido láctico (CHA). A degradação da α_{s1} -caseína ocorreu em todos os tratamentos, porém com menos intensidade em CHA. A β -caseína também apresentou proteólise , com decréscimo perceptível durante o experimento, menos para CHA, onde a β -caseína praticamente manteve-se intacta. Parece haver um efeito sinérgico acentuado entre o coagulante microbiano e o fermento láctico, com o primeiro fornecendo substratos de fácil acesso às enzimas do fermento láctico. O queijo processado com o coagulante mais utilizado no país (BOF), mostrou um padrão eletroforético onde a α_{s1} -caseína foi nitidamente proteolisada com o tempo. A β -caseína também foi proteolisada , com decréscimo perceptível durante o experimento. O coalho obtido por fermentação com fermento (CHF), apresentou desdobramento quase que total da α_{s1} -caseína. Estes resultados estão em concordância com os valores de NS a pH 4,6 e TCA 12%. MICROF, BOF, CHF, perderam sua forma física nos primeiros 15 dias de estocagem. A avaliação de textura instrumental para este queijo fica invalidada, devido a heterogeneidade do produto, provocando alta variabilidade entre repetições de um mesmo tratamento. Com relação ao sabor, os tratamentos utilizando coagulante microbiano, foram os únicos que não apresentaram diferença significativa durante o experimento. O ácido láctico mostrou ser uma boa alternativa para aumentar o "shelf life" do produto, quanto aparência e forma física, porém o queijo ficou mais exposto ao ataque de microorganismos contaminantes.

Palavras chaves: Minas Frescal; Coagulantes; Proteólise; Fermento Láctico; Ácido Láctico.

Effect of different coagulants and acidifiers in yield, proteolysis, and shelf life of Minas Frescal Cheese - typical Brazilian fresh cheese.

SUMMARY

Three coagulating agents (bovine, microbial and one obtained by fermentation using a genetically modified *E. coli* K12) were evaluated for their use in the processing of Minas cheese. The objective was to evaluate the shelf life of the cheeses using these coagulating agents together with mesophilic starter and 85% lactic acid. Cheeses were processed on three separate days using approximately 50kg milk for each batch and were denominated as follows: BOF (bovine coagulant plus mesophilic starter); MICA (microbial coagulant plus lactic acid); MICROF (microbial coagulant plus mesophilic starter); CHA (coagulant from fermentation plus lactic acid); CHF (coagulant from fermentation plus lactic acid). No significant differences were found in the percentage recoveries of the protein, fat and total dry matter. No significant differences were observed in the yields from the treatments although the yield of cheese per kilo of milk was greater using the coagulant obtained by fermentation, suggesting a greater water retention in the final product. The levels of nitrogen soluble at pH 4.6 and in 12% TCA (NNP), increased significantly during the shelf life of the products ($p=0,0001$). The data suggest that the differences in salt content of the cheeses influenced the indices of proteolysis, which could be justified by the difference in the moisture content found between replicates. With respect to the electrophoretic behaviour, the greatest protein degradation was shown by the microbial coagulant plus mesophilic starter (MICROF), followed by the microbial coagulant plus lactic acid (MICA), bovine coagulant plus mesophilic starter (BOF), coagulant obtained by fermentation plus

mesophilic starter (CHF) and finally the coagulant obtained by fermentation plus lactic acid (CHA). Degradation of α_{s1} -casein occurred with all the treatments but was less intense in CHA. The β -casein also showed proteolysis with a perceptible decrease during the experiment, except for CHA, in which the β -casein remained practically intact. There was apparently an accentuated synergistic effect between the microbial coagulant and the mesophilic starter, with the former providing substrates easily attacked by the enzymes of the latter. The cheese processed by the most commonly used combination in Brazil (BOF), showed an electrophoretic pattern in which the α_{s1} -casein was clearly proteolysed with time. The β -casein was also proteolysed, showing a perceptible decrease during the experiment. The coagulant obtained by fermentation plus mesophilic starter (CHF) resulted in almost complete degradation of the α_{s1} -casein. These results are in accordance with the values for nitrogen soluble at pH 4.6 and 12% TCA. MICROF, BOF, and CHF lost their physical form during the first 15 days of storage. The instrumental evaluation of the texture of these cheeses was invalidated on account of the heterogeneity of the products. The sensory evaluation determined the significant differences between the treatments with respect to time. The use of lactic acid was shown to be a good alternative to increase the shelf life of the products with respect to appearance and physical form, although it was the most liable to attack by contaminating microorganisms.

Key words: Coagulants, Fresh Minas Cheese; proteolysis; mesophilic starter ; lactic acid.

1. INTRODUÇÃO:

O queijo Minas Frescal é um dos produtos lácteos mais difundidos no Brasil e é considerado o único queijo genuinamente nacional. O produto possui ampla aceitação no mercado e pode ser encontrado em todo país, notadamente no estado de Minas Gerais. Sob o ponto de vista tecnológico, é um produto de fácil elaboração, apresenta elevado rendimento na fabricação e não é maturado, o que facilita grandemente seu escoamento e distribuição. (WOLFSCHOON-POMBO et alii, 1978).

Por ser um queijo de alta umidade, os fenômenos bioquímicos de proteólise causam alterações no seu corpo, tais como, amarelamento da casca e sabor acentuadamente ácido, acarretando um período de vida útil muito curto.

Modificações na tecnologia de fabricação tem sido adotadas para minorar estes defeitos, como substituição do fermento láctico por ácido láctico industrial. Porém, é conhecido, que não só as enzimas microbianas do fermento láctico possuem atividade proteolítica, possuindo o coalho importante papel na degradação proteica. Algumas enzimas dos coagulantes são mais proteolíticas do que outras e sua composição enzimática depende de sua fonte de produção (FOX, 1988).

Os coagulantes microbianos, por exemplo, são altamente proteolíticos (MICKELSEN & FISH, 1970), muitas vezes, causando sabor amargo no produto e no entanto, na prática são utilizados em larga escala para fabricação do produto, em alguns casos conjugados com ácido láctico ou mesmo com fermento láctico.

Os coalhos utilizados na indústria queijeira brasileira são produzidos à partir do abomaso de bovinos adultos e apresentam em média 80% de pepsina bovina e 20% de quimosina (RETTL et alii., 1992). A pepsina bovina é uma enzima mais proteolítica e menos específica que a quimosina, e em condições favoráveis pode hidrolizar excessivamente as caseínas, podendo causar diminuição no rendimento, sabor amargo e aumento de proteólise geral (VISSER, 1983; FOX, 1991).

Tradicionalmente, o coalho de vitelo é considerado o ideal para fabricação de queijos, porém na produção de queijo Minas Frescal, seu uso é quase nulo, sendo mais utilizados os coalhos bovinos e microbianos.

Técnicas avançadas de engenharia genética permitiram a produção de um coalho composto de 100% de quimosina. Este coalho é obtido através da fermentação por microorganismos transgênicos, possuindo como vantagens pureza, oferta constante, custo reduzido e elevado rendimento, já sendo utilizado em cerca de 60% das indústrias queijeiras americanas (BARBANO & RASMUSSEN, 1992).

O coalho obtido por fermentação (DNA recombinante) já foi testado experimentalmente em outros países, em muitas variedades de queijos. Seu desempenho em leite bovino, quando comparado ao uso de coalho de vitelo não apresentou significância em termos tecnológicos, porém se comparado ao coalho bovino apresenta significativos resultados em função do rendimento de produção (BARBANO & RASMUSSEN, 1992; BROOME & HICKEY, 1990; HICKS et alii, 1988).

No Brasil, seu uso é incipiente, e não existem referências de estudos do seu desempenho na fabricação de variedades brasileiras, com exceção do trabalho desenvolvido a nível de mestrado e apresentado junto à UNICAMP por

FOLEGATTI, (1994), onde se avaliou o desempenho do coalho obtido por fermentação na produção do queijo Prato.

2. OBJETIVOS:

Os objetivos do presente trabalho foram:

2.1 Avaliar o comportamento geral do coalho obtido por fermentação em comparação com coagulante microbiano e bovino na produção do queijo Minas Frescal e sua influência no rendimento, funcionalidade e nível de proteólise, assim como na conservação, e principais alterações no produto durante estocagem refrigerada por trinta dias.

2.2 Avaliar a influência das enzimas dos fermentos lácticos na conservação do produto.

2.3 Determinar os efeitos do uso do coalho genético, coagulante microbiano e bovino, associados ao fermento láctico, nas características sensoriais dos produtos.

2.4 Propor uma tecnologia alternativa para a produção do queijo Minas Frescal, baseada nos resultados do experimento.

3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA:

3.1. Queijo Minas Frescal e utilização de ácido láctico

Segundo o regulamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, queijo é o produto obtido do leite integral, padronizado, magro ou desnatado, coagulado natural ou artificialmente, adicionado ou não de substâncias permitidas no regulamento e submetido à manipulações necessárias para a formação das características próprias (RIISPOA, 1980).

Para fins de padronização os queijos devem ser classificados. O queijo Minas Frescal é um produto da coagulação enzimática, de massa crua, moldado em forma cilíndrica de diâmetro cerca de duas vezes a altura, pesando cerca de 1Kg (FERREIRA, 1992).

O queijo Minas Frescal é um dos produtos de laticínios mais difundido no Brasil e é considerado o único queijo genuinamente nacional, possui ampla aceitação no mercado e pode ser encontrado em todo o país (ISEPON & OLIVEIRA, 1995). Sob o ponto de vista tecnológico é um produto de fácil elaboração, apresenta elevado rendimento e não é maturado, o que facilita sua distribuição e consumo. Tradicionalmente o queijo Minas Frescal é produzido com coalho de bovinos adultos e fermento láctico, existindo uma tendência no mercado brasileiro para substituir o fermento láctico por acidificação direta com ácido láctico como forma de aumentar a vida útil do produto (WOLFSCHOON-POMBO et alii, 1978).

O queijo Minas Frescal é um produto facilmente perecível contendo alto teor de umidade e de lactose e tem sua vida útil estabelecida por legislação em trinta dias a partir da fabricação. Apesar do curto tempo de vida útil e do produto não ser submetido a maturação, o alto teor de umidade associado à

utilização de coágulo bovino e fermento lácteo produzem uma proteólise acentuada que pode diminuir a qualidade do produto. Alternativas ao processamento convencional necessitam ser estudadas.

A fabricação tradicional do queijo Minas Frescal sofreu modificações ao longo do tempo, visando melhorias na qualidade do produto final, como aumento de rendimento, aumento da vida de prateleira, padronização e segurança para a saúde pública. Para garantir estes aspectos foi introduzido o uso de leite pasteurizado, adição de cloreto de cálcio e emprego de culturas lácticas mesofílicas (WOLFSCHOON-POMBO et alii, 1978).

Em 1978, WOLFSCHOON-POMBO, confirmou algumas desvantagens do uso do fermento láctico em um queijo de consumo imediato como o Minas Frescal, uma vez que o fermento proporciona proteólise avançada, caracterizada com a massa amolecida, coloração da casca amarelada e sabor fortemente ácido.

O fenômeno causado pela atuação das bactérias do fermento láctico é apontado como a causa mais freqüente de proteólise, e conseqüente deterioração do produto no mercado (FURTADO et alii, 1980). Com a adição do fermento láctico mesofílico (*Lactococcus lactis ssp. lactis* e *Lactococcus lactis ssp. cremoris*), que são bactérias homofermentativas da lactose, há aumento na produção de ácido láctico. O acúmulo deste ácido abaixa o pH e proporciona aparecimento de “flavour” característico no queijo. Porém, além de ácido láctico, os microorganismos também liberam proteases no meio que atuam sobre a caseína e suas frações, aumentando o teor de proteínas e peptídeos solúveis do queijo. Este aumento provoca modificações sensíveis na textura, rendimento e sabor do queijo, com a formação de aminoácidos, tióis, ácidos tioésteres, entre outras (FOX, 1991; WOLFSCHOON-POMBO et alii, 1978).

Para se garantir um abaixamento do pH e conseqüente inibição de possíveis contaminantes indesejáveis, a utilização de ácido láctico industrial, como substituto do fermento láctico, tem sido proposta por diversos pesquisadores. (VAN DENDER & MORENO, 1992; FURTADO et alii, 1980; MUNCK et alii, 1980).

Esta alteração na tecnologia de fabricação teve como resultados principais o aumento da umidade no extrato seco total, aumento do pH final do queijo, diminuição da acidez e maior perda de sólidos solúveis no soro, se comparados com queijos produzidos convencionalmente (FURTADO et alii, 1980). Apesar da maior perda de sólidos no soro, a utilização de ácido láctico aumenta o rendimento dos queijos.

A maior perda de sólidos no soro, no processo onde se utiliza o ácido láctico, pode ser explicada. O leite com fermento contém um maior número de bactérias lácticas e sofre maior hidrólise da lactose, com maior produção de ácido láctico durante a fabricação. Este fato favorece a atuação da quimosina, pois sua atividade é largamente influenciada pelo pH. A quimosina possui melhor atuação em meio ácido; o seu pH ideal de atuação sobre a caseína do leite seria de 5,5 (VEISSEYRE, 1988) ou de 4,0 - 4,5 (ALAIS, 1974) .

O aumento no rendimento quando da utilização do ácido láctico deve-se ao aumento no teor de umidade do queijo, já que, com um coágulo menos ácido, há menos favorecimento para reação do cálcio do paracaseinato com o ácido láctico, resultando assim em menos lactato e menor expulsão da água (WOLFSCHOON-POMBO et alii, 1978).

Adicionalmente, o queijo Minas Frescal fabricado com uso de ácido láctico apresenta menores alterações na estocagem 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 alii, 1980; MUNCK & SOUZA, 1980; WOLFSCHOON-POMBO et alii,1978).

3.2. Coalhos, coagulantes e a coagulação do leite

As principais fontes produtoras de agentes coagulantes incluem extratos salinos de estômagos de bovinos e porcinos jovens e adultos, sendo o de bovinos tradicionalmente empregado na fabricação de queijos. Outra fonte mais recente inclui enzimas de origem microbiana (*Mucor pusillus*, *Mucor miehei* e *Endothia parasítica*). Atualmente, através do uso da tecnologia de DNA recombinante, foi desenvolvido um coagulante a partir de microorganismo cujos códigos genéticos foram ajustados para a produção seletiva de quimosina. (GREEN et alii, 1977; TEUBER, 1990). Esse coalho, obtido através da fermentação por microorganismos transgênicos, possui como vantagens pureza, oferta constante, custo reduzido e por sua especificidade de proteólise pode apresentar ganhos em rendimento na produção de queijo (BARBANO & RAMUSSEN, 1992).

Coalho é definido como o extrato do quarto estômago de animais ruminantes (abomaso), rico em proteinases ácidas, com atividade coagulante sobre o leite. Proteinases de outras origens, que também possuem capacidade de coagular o leite sob condições adequadas são denominados coagulantes (FOLEGATTI, 1994) . O coalho extraído do abomaso de vitelos é composto de aproximadamente 20% de pepsina bovina e 80% de quimosina, sendo bastante diferente da composição de coalhos extraídos de bovinos adultos, onde esta relação se inverte (RETTL et al, 1992).

O leite mantém-se em sua forma coloidal devido à dispersão das micelas de caseína por repulsão estérica e eletrostática, envolvendo o

glicomacropéptido das moléculas de κ -caseína negativamente carregado. Com a adição do coalho, esta barreira é retirada enzimaticamente e ocorre a coagulação do leite. Esta coagulação ocorre em dois estágios distintos, onde primeiramente ocorre formação enzimática da paracaseína e glicomacropéptido hidrofílico das moléculas de κ -caseína (localizados na periferia das moléculas de caseína). Esta ligação ocorre preferencialmente no sítio Phe105 - Me106, tornando as micelas instáveis. A segunda fase envolve a precipitação ou gelatinização da paracaseína pelo Ca^{2+} , em temperaturas maiores que 20 °C (FOX, 1982), ou em torno de 30 °C (VISSER, 1993).

A função primária dos coalhos consiste especificamente da hidrólise do componente estável da caseína (κ -caseína), com um mínimo de proteólise geral, caso contrário, há uma redução no rendimento da fabricação de queijos (FOX, 1988). Existe uma grande variedade de proteinases que têm sido usadas como coagulantes do leite, como as enzimas microbianas, as extraídas de plantas (ficina, bromelina, papaína) e as proteinases gástricas de vitelos, cabritos e cordeiros (RETTL et alii, 1992; FOX, 1988).

Quimosina bovina, uma mistura de quimosina e pepsina bovina (80:20) tem sido o principal agente coagulante utilizado na indústria queijeira a nível mundial, sendo responsável principalmente pela hidrólise de caseína α_1 produzindo caseína α_1 -I, peptídeo observado em todos os estudos envolvendo ação da renina (GRAPPIN et alii., (1985); LEDFORD et alii, (1966), observaram primeiramente que a quimosina quebrava a caseína α_1 estudando a maturação de queijo Cheddar, observando que o produto formado apresentava maior mobilidade eletroforética. De acordo com FOX, (1989) a seleção de quimosinas bovinas comerciais é feita por sua especificidade ao ataque à caseína α_1 , e baixa atividade sobre a β -caseína. Enquanto a quimosina tem atividade proteolítica específica, a pepsina é mais proteolítica e menos específica e em condições favoráveis pode hidrolisar excessivamente as caseínas, diminuir

rendimento, provocar sabor amargo e aumento geral da proteólise (VISSER, 1993; FOX, 1991).

3.2.1 Coagulantes vegetais:

Os coagulantes vegetais possuem alta atividade proteolítica degradando α -lactoalbumina e soroalbumina, causando hidrólise tão rapidamente que produz redução no rendimento e ou defeitos de sabor, só se prestando à fabricação de poucos tipos de queijos (ORTIZ DE APODACA et alii, 1994).

DINAKAR et alii (1989) , comparando os coalhos de vitelo e de Withania coagulans em queijo cheddar, encontrou nos queijos fabricados com a enzima vegetal, sabor amargo, frações adstringentes e grande hidrólise da β -caseína, o que inviabilizava a fabricação do queijo com este tipo de coalho.

Outros tipos de coagulantes tem merecido melhor aceitação como substitutos do coalho de vitelo: as pepsinas bovinas, suínas ou avícolas e as proteinases ácidas de microorganismos. Destes a pepsina avícola é menos utilizada, sendo mais aceita somente em Israel e parte da República Tcheca. A pepsina bovina é provavelmente a mais satisfatória, possuindo inclusive importante papel na maturação dos queijos (FOX, 1988).

3.2.2 Coagulantes microbianos:

A utilização das enzimas coagulantes de origem microbiana aumentou nos últimos anos e têm obtido sucesso em algumas variedades de queijos. Pode-se encontrar comercialmente enzimas produzidas por três tipos de fungos: Mucor miehei, Mucor pusillus e Endothia parasitica. A característica

principal destas enzimas é sua alta atividade proteolítica, quando comparada a outros coagulantes e sua baixa especificidade (FOX, 1988). Os coalhos microbianos são largamente utilizados nos Estados Unidos e tem sido adotados por muitas indústrias brasileiras na fabricação do queijo Minas Frescal.

3.2.3 Coalho obtido por fermentação:

Com a procura de substitutos adequados para o coalho de vitelo, coagulantes obtidos por fermentação alcançaram significância e sucesso comercial, já sendo utilizados em queijos como Cheddar, Edam, Manchego, Burgo e Hispânico (ORTIZ DE APODACA et alii, 1994).

A produção de quimosina por fermentação envolve avançados processos de biotecnologia. Para sua obtenção, o RNA mensageiro (m-RNA), contendo a seqüência de bases codificadas para a produção da proquimosina, é isolado das células do abomaso de bezerras e transcrito, com o auxílio da enzima transcriptase reversa, o DNA complementar (c-DNA). O c-DNA contém a seqüência de nucleotídios responsável pela seqüência correta de aminoácidos da proquimosina, porém, sem as seqüências de introns presentes no DNA natural desta enzima. A seqüência de bases do gene da proquimosina é determinada e o c-DNA pode ser então, obtido por síntese bioquímica (FOLEGATTI, 1994; TEUBER, 1990; STRYER, 1988).

Como o c-DNA não contém as seqüências de introns presentes no DNA da proquimosina, há a possibilidade da clonagem e expressão do DNA por vetores de expressão (plasmídios), que por sua vez são inseridos em microorganismos hospedeiros, normalmente bactérias e fungos. Os microorganismos que vêm sendo mais largamente utilizados como hospedeiros na produção industrial de coalho são , *Escherichia coli K12*, *Kluyeromyces lactis*

e *Aspergillus niger* var. *awamori*, embora outras bactérias e fungos possam ser utilizados (TEUBER, 1990; FOX, 1988).

No caso do coalho obtido por fermentação "CHY-MAX", a produção é feita através da *Escherichia coli* k12. O gene da pro-quimosina B é isolado do m-RNA de estômago de vitelo e transcrito no c-DNA da pro-quimosina. Este é inserido no vetor de expressão após a região que codifica a glico-amilase. Há incorporação do vetor de expressão da *E. coli* K12 e esta passa a integrar seu genoma e secretar as proteínas glico-amilase e pro-quimosina.

O sistema promotor-inibidor da glico-amilase passa a controlar a expressão do c-DNA da pro-quimosina. Supõe-se que a formação da quimosina ocorra por ativação de um mecanismo auto catalítico e o complexo glico-amilase -pro-quimosina seja totalmente transformado em quimosina ativa, como consequência do pH relativamente baixo da fermentação. Para produção industrial, a *Escherichia coli* é submetida à fermentação convencional. Posteriormente as células são inativadas e a quimosina recuperada por métodos convencionais, que incluem tratamento ácido, cromatografia e ultrafiltração. (HARBOE, 1992).

A quimosina obtida por fermentação é composta exclusivamente por quimosina tipo B, sendo que o coalho de vitelo é composto das quimosinas A, B e C e estruturas protéicas sem atividade enzimática, com proporção de aproximadamente 30; 55; 15 respectivamente. A quimosina C é um produto de degradação da quimosina A, e esta é ligeiramente, mas não significativamente mais específica que a quimosina B. A quimosina B é mais estável (HARBOE, 1992).

BROOME & HICKEY (1990), compararam o efeito do coalho de vitelo e o obtido por fermentação na fabricação do queijo Cheddar em até 12 meses de

fabricação. Os autores não encontraram diferenças quanto ao tempo de fabricação, composição dos queijos, aspectos microbiológicos e proteólise, mas detectaram um aumento ($p < 0,025$), no rendimento do queijo fabricado com coalho obtido por fermentação. Ainda em queijo Cheddar BANKS (1992), em experimento similar não encontrou diferenças significativas no rendimento, sólidos totais e “flavour” em queijos com até seis meses de maturação.

BARBANO & RASMUSSEN (1992), utilizaram coalho obtido por fermentação e microbiano em queijo Cheddar, e observaram maior perda de proteínas, quando do uso do coalho microbiano. O rendimento em coalho obtido por fermentação foi significativamente maior, provavelmente consequência da alta atividade proteolítica e baixa especificidade do coalho microbiano. Neste mesmo experimento os autores compararam o coalho obtido por fermentação com o coalho bovino. Quando da utilização do coalho bovino houve maior perda de gordura no soro e diminuição no rendimento. Os autores atribuíram as perdas à presença de pepsina no coalho bovino.

DISEGNA et alii (1991) e CORRADINI et alii (1990), estudaram a ação da quimosina obtida por fermentação do *Kluyveromices lactis* e coalho de vitelo, sobre as propriedades sensoriais e rendimento do queijo Grana, não encontrando diferenças entre os dois tipos de coalhos. NUNEZ et alii (1992), também utilizando a quimosina de *K. lactis* e coalho tradicional, não encontraram diferenças nas características sensoriais e reológicas do queijo Manchego, porém, encontraram diferenças no nitrogênio solúvel a pH 4,6.

O rendimento, composição e proteólise em queijos Gouda fabricados com quimosina de *K. lactis* também não apresentaram diferenças quando comparados aos fabricados com coalho de vitelo. O tempo de coagulação apresentou-se ligeiramente diferente fato este atribuído à presença de pepsina no coalho tradicional (VAN DEN BERG & KONING, 1990). MEDINA et alii,

(1992), observaram que em queijos Burgo, a utilização da quimosina obtida por fermentação não interferiu no rendimento, pH, umidade e proporção de frações α -s-1 e β -caseína liberadas, quando comparada ao coalho de vitelo. Em queijo Hispânico, o resíduo de β -caseína foi maior que no coalho tradicional, porém não existiram diferenças quanto às características sensoriais e reológicas.

3.2.4 Rendimento em queijos e Cifra de Transição em queijos:

Um dos fatores primordiais para garantir a viabilidade econômica da produção de queijos é o rendimento. Os principais fatores que influenciam são: composição do leite (principalmente gordura e proteína), porcentagem de transição dos constituintes do leite para o queijo e a porcentagem de umidade retida (BANKS et alii., 1981). Segundo KAMMERLHNER (1994), também a qualidade do leite, aditivos como coalho e fermento láctico e tecnologia de fabricação, são determinantes para definir o rendimento de queijos.

O rendimento na fabricação de queijos está intimamente ligado ao teor de umidade do queijo, à composição físico-química do leite, ao tamanho dos grãos na hora do corte da coalhada, ao ponto da massa ao final da fabricação, à pressão e tempo de prensagem, além de outros fatores como equipamentos e tecnologia aplicada para a industrialização (WOLFSCHOON-POMBO et alii, 1978). Outro fator importante na determinação do rendimento de queijo é o seu conteúdo de proteína, gordura e principalmente a relação caseína / gordura.

Rendimento em queijos é definido como a quantidade de queijo com determinado teor de umidade, produzido a partir de um peso fixo de leite com um dado conteúdo de gordura (KOSIKOWISKI, 1982). Segundo FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, (1979), um método adequado para estimativa do rendimento em queijos baseia-se nas cifras de transição dos constituintes do leite para o queijo, podendo ser previstas com sucesso por fórmulas, como foi

demonstrado experimentalmente por estes pesquisadores no processamento do queijo Minas Frescal. Os autores utilizaram a fórmula de SCHULS & KAY e encontraram valores reais e estimados de rendimento muito próximos para este queijo.

A composição do leite varia de acordo com a raça, com a alimentação, com o período de lactação, época, estado físico do animal, e muitos outros fatores (WOLFSCHOON-POMBO et alii, 1978).

A determinação das cifras de transição, ou seja, o percentual dos elementos contidos no leite aproveitados na fabricação do queijo, varia, pois são inúmeros os fatores que afetam a composição do leite, e muitos são os fatores tecnológicos envolvidos, que determinam as perdas de produção, por tanto perdas de constituintes do leite no soro. A transição de elementos do leite para o queijo constitui-se num método eficiente para a estimativa do rendimento de fabricação (PHEZAN, 1981).

De acordo com VAN SLIKE & PRICE (1941), é impossível evitar perdas de gordura durante a fabricação de queijos, uma vez que os glóbulos de gordura são aprisionados ou retidos na massa justamente no lugar exato em que se encontravam no momento da coagulação. Assim, quando é feito o corte, muitos glóbulos de gordura são expostos em cada superfície cortada e são desprendidos das superfícies dos cubos (grãos), passando ao soro durante sua manipulação. (WOLFSCHOON-POMBO et alii, 1978).

3.2.5 Alterações no queijo Minas Frescal durante o armazenamento

3.2.5.1- Lactose e pH:

Um dos fatores importantes no processo de maturação do queijo Minas Frescal é a decomposição da lactose em ácido láctico e seu teor residual no queijo. A metabolização do carboidrato é feita normalmente pelos microorganismos presentes e/ou adicionados no leite e irá influenciar na formação do "flavour" e na vida de prateleira (SHELF-LIFE) do queijo. A degradação da lactose em ácido láctico acontece por processo enzimático, que requer numerosas enzimas e é conhecido por glicólise (CASAGRANDE & WOLFSCHOON-POMBO, 1988).

A velocidade de formação e quantidade de ácido láctico produzido influencia o pH, o equilíbrio iônico, formação de lactato de cálcio e inibe crescimento de patógenos. O lactato pode ser usado como fonte de energia para fermentações secundárias ou indesejáveis. Estas variações influenciam na qualidade e são determinantes na elaboração de algumas variedades de queijos (FOX, 1991; CASAGRANDE & WOLFSCHOON-POMBO, 1988).

3.2.5.2 - Proteínas:

FOX, (1991), classificou as proteinases ativas no queijo em: nativas do leite, endógenas produzidas por bactérias contaminantes, e enzimas adicionadas para coagular o leite na produção do coalho (rennina ou seus substitutos, quimosina, pepsina ou proteinases microbianas). A estas categorias, GRAPPIN et alii, (1985) acrescentou as enzimas produzidas pela adição de fermento e as provenientes de microorganismos que crescem no interior ou na superfície do queijo.

A degradação das matérias protéicas dos queijos (proteólise) é o resultado da atividade de várias enzimas, sendo que os principais contribuintes são o coalho, proteases e peptidases do fermento láctico e/ou flora natural do leite e enzimas naturais do leite (FOX, 1991). Quanto maior a proteólise em

queijos mais macios será sua consistência e seu aroma mais pronunciado. No queijo Minas Frescal, cor amarela na casca e consistência amolecida são atributos negativos de sua qualidade (VAN DENDER, 1995).

O queijo Minas Frescal é um queijo consumido sem maturação, porém a tecnologia de fabricação e conseqüentemente a proteólise, influenciam decisivamente na consistência, sabor e durabilidade do produto, sobretudo quando se utilizam coagulantes microbianos e fermento láctico mesofílico (BONDZYSKI, citado por WOLFSCHOON-POMBO & LIMA, 1989).

Um dos métodos de medição do nível de proteólise é a quantificação da tirosina. A liberação deste aminoácido é uma conseqüência da ação das enzimas do coalho e do fermento (FOX, 1988). Os valores obtidos com a determinação espectrofotométrica do aminoácido tirosina, apresentam a mesma tendência daqueles dos índices de extensão e profundidade da maturação em queijos Prato fabricados com coalho bovino, vitelo e obtido por fermentação (FOLEGATTI, 1994).

Com relação às medidas de Nitrogênio solúvel, dois indicadores são os mais utilizados, a medida do Nitrogênio solúvel a pH 4.6 e o Nitrogênio solúvel em 12% de ácido tricloroacético (TCA). A fração nitrogenada solúvel a pH 4,6 (ponto isoelétrico da caseína integral) é basicamente produzida pela ação da quimosina (DESMIAZEAUD & GRIPON, 1977), e tem-se mostrado muito útil para medir a extensão da proteólise (FURTADO & PARTRIDGE, 1988), aumentando durante o tempo de armazenamento do queijo, de acordo com REVILLE & FOX (1978).

A intensidade da proteólise dos queijos é também denominada através de índices chamados de "extensão" e "profundidade". Extensão da proteólise é caracterizada pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis (NS)

acumuladas durante o processo, e expressas como percentagem do nitrogênio total, também conhecido como índice de maturação. Sua determinação analítica é baseada na precipitação isoeletrica da caseína a pH 4,6 em uma amostra diluída de queijo e quantificação das substâncias solúveis através do método de Kjeldahl (WOLFSCHOON-POMBO,1989).

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

Pode-se afirmar que extensão da proteólise em queijos é a ação proteolítica do coalho sobre as caseínas do leite, como demonstrado experimentalmente por DESMAZEAUD & GRIPON (1977), em queijos Saint-Paulin.

Profundidade de proteólise diz respeito às substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, acumuladas durante o processo , tendo como compostos característicos aminoácidos, oligo-peptidases, aminas entre outros. A quantificação da profundidade pode ser obtida pelo teor de nitrogênio não protéico (NPN), que são aqueles solúveis em ácido tricloroacético (TCA) a 12%, ou pela determinação direta dos aminoácidos produzidos e expressados como percentual de proteína solúvel total (WOLFSCHOON-POMBO, 1989).

$$\text{Profundidade} = \frac{\text{NPN} \times 100}{\text{NS}}$$

O índice de profundidade de proteólise é relacionado à atividade do fermento . As proteases e peptidases atuam sobre os peptídeos (principalmente os liberados pelo coalho), produzindo compostos de baixo peso molecular (FARKYE & FOX, (1990).

A fração nitrogenada solúvel em 12% de TCA contem pequenos peptídeos e amino ácidos (YVON et alii, 1989), e está diretamente associada a

ação dos fermentos coadjuvantes do processo de fabricação (O'KEEFFE et alii, 1978), e tem sido amplamente utilizada como um indicador para a maturação do queijo. A especificidade dos dois indicadores não é absoluta uma vez que parte do Nitrogênio solúvel a pH 4.6 também é detectado em 12% de TCA. (KUCHROO & FOX, 1982).

Uma vez que o prazo de comercialização do queijo Minas Frescal pode ser de até trinta dias, muitas indústrias utilizam-se desta validade, porém depreciando substancialmente a qualidade do queijo, em função de proteólise intensa. Dados experimentais obtidos a partir de queijos Minas Frescal fabricados com ácido láctico e fermento láctico mostraram que os fabricados com fermento apresentam extensão e profundidade da proteólise muito maiores que os fabricados com ácido láctico (WOLFSCHOON-POMBO & LIMA, 1989).

No processo de fabricação de queijos a proteólise é o evento principal e ocorre na maioria das variedades conhecidas de queijos. Sua extensão pode ter diferentes intensidades e produzir peptídeos de tamanhos variados e amino ácidos livres como produto final no processo de maturação de acordo com FOX, (1988) . O processo de degradação proteolítica durante a maturação produz uma quebra limitada das caseínas do queijo pela ação de enzimas coagulantes adicionadas ou pela ação da plasmina, e os peptídeos e amino ácidos produzidos funcionam como substrato para proteinases/peptidases produzidas por bactérias do fermento ou por bactérias nativas do leite. (VISSER, 1983).

De acordo com FARKYE & FOX (1990) o tipo e intensidade da maturação na fabricação dos queijos depende de vários fatores, tais como tempo e temperatura de estocagem, composição do queijo, especialmente da umidade e do nível de sal, e dos tipos e atividades das enzimas e microorganismos presentes no produto.

Vários agentes coagulantes estão sendo empregados na fabricação de queijos, porém a relação leite-atividade coagulante e atividade proteolítica varia muito e influencia a qualidade e rendimento do queijo (BARBANO & RASMUSSEN, 1992). Pequenas diferenças na produção de queijos a partir de coagulantes alternativos podem ser de grande importância econômica, porém estas diferenças são difíceis de se medir devido a diversas fontes de variação nos processos industriais que incluem a variação na composição do leite, condições de processo, erros e desvios nos procedimentos analíticos segundo (EMMONS et alii., 1990).

Técnicas utilizadas para o acompanhamento da proteólise na maturação de queijos podem ser agrupadas em métodos não específicos que incluem a determinação do nitrogênio solúvel em vários tipos de solventes e diferentes valores de pH, a determinação de grupos reativos e técnicas mais específicas que separam as diversas frações proteicas que constituem a caseína ou peptídeos individuais como os métodos eletroforéticos e os cromatográficos. (KUCHROO & FOX, 1982).

As várias frações constituintes da caseína e muitos de seus produtos obtidos durante a proteólise podem ser acompanhados através da eletroforese, provavelmente a técnica mais utilizada atualmente para acompanhar o processo de maturação (FOX, 1989). A utilização de eletroforese em gel de acrilamida, foi inicialmente utilizada por LEDFORD et alii, (1966) para avaliar frações residuais de caseína em queijos maturados.

Funcionalmente os trabalhos envolvendo o desdobramento das frações durante a maturação de queijos tem mostrado que a textura do queijo é dependente da relação caseína intacta/umidade (LAWRENCE et alii, 1987). DE JONG (1976), observou boa correlação entre a firmeza do queijo e a quantidade de caseína α s1 intacta. Este fato foi particularmente confirmado

quando coalho bovino foi utilizado (NOOMEN, 1977). Esta quebra primária parece ser responsável pelo amaciamento do queijo durante os primeiros estágios de maturação (CREAMER & OLSON, 1982). Ainda funcionalmente, a proteólise da maioria dos queijos tem interferência direta no "flavour" dos mesmos (VISSER, 1993)

A fração β -caseína é muito menos susceptível ao ataque pela quimosina, especialmente devido à quantidade de NaCl presente e sua influência sobre a conformação proteica, uma vez que o sal induz a agregação da β -caseína tornando inacessível as ligações sensíveis a quimosina, efeito que é aumentado com o aumento da relação sal/umidade (LAWRENCE et alii., 1977), embora várias ligações existentes na β -caseína sejam atacadas em solução (CARLES & DUMAS 1984). GRAPPIN et alii (1985), observaram que a fração β poderia sofrer dois tipos de hidrólise, um pela ação da quimosina formando β_1, β_2 e β_3 caseínas embora esta ação não tenha sido claramente identificada e outra, pela ação da plasmina produzindo γ -caseínas.

Plasmina, a principal protease endógena do leite, é uma protease alcalina termorresistente e causa significativa hidrólise de β -caseína produzindo γ caseínas e proteose peptonas (GRAPPIN et alii, 1985); (FOX, 1989). As γ -caseínas normalmente representam 3% da caseína do leite (DAVIES & LAW, 1977). Embora quantidades consideráveis se acumulem em alguns tipos de queijos, o pH da maioria deles não é favorável (levemente básico) à ação da mesma. No entanto, a plasmina pode ser importante em variedades de queijo onde o pH aumenta significativamente durante a maturação (FOX, 1989).

Embora bactérias produtoras de ácido láctico usadas como fermento na fabricação de queijo sejam fracamente hidrolíticas, elas contêm proteases e peptidases que teoricamente poderiam hidrolizar completamente caseínas à amino ácidos (MOU et alii, 1975). Outra função destas bactérias é a de produzir

ácido, que pode ser substituído por um ácido pré-formado (MABBITT et alii, 1955). VISSER & de GROOT-MOSTER, (1977) não encontraram diferenças significativas no padrão eletroforético com relação a caseína α s1 em queijos assépticos isentos de fermento e queijos contendo Lactococcus lactis ssp. cremoris. THOMAS & PRITCHARD, (1987) por outro lado, afirmam que o principal papel das enzimas do fermento parece ser a degradação lenta de β -caseína e dos polipeptídeos resultantes da ação da quimosina, especialmente sobre caseína α s1. FOX, (1989) observou que algumas linhagens de estreptococos produziram endopeptidases capazes de hidrolizar caseínas intactas, especialmente β -caseínas.

A comparação da atividade proteolítica entre coagulantes microbianos mostraram uma proteólise acentuada da fração β para queijos fabricados com proteinases de Mucor Miehei ou Mucor Pusillus em relação a quimosina, pepsina bovina ou pepsina porcina, embora a taxa de proteólise tenha sido maior para caseína α s1 independente do coagulante utilizado (FARKYE et alii, 1990). A textura de queijos obtidos com coalhos microbianos, após longo tempo de maturação, tende a ser mais pobre, ou pelo menos, diferente dos queijos obtidos com coalho bovino, o que pode ser atribuído à maior atividade dos coagulantes microbianos, menos específicos que a quimosina, hidrolizando facilmente caseína α s2 e β -caseína (LAWRENCE & CREAMER, 1969). VANDERPOORTEN & WECKX, (1972) compararam Mucor Pusillus, Mucor Miehei, Endothia parasítica utilizando sistemas modelo contendo caseína e observaram o aparecimento de sabor amargo em queijos feitos com estes coagulantes microbianos atribuindo estes efeitos à forte proteólise observada. Padrões eletroforéticos da quebra de caseína por coagulantes provenientes de Mucor foram muito diferentes daqueles obtidos para a quimosina, indicando que a quebra das moléculas de caseína poderia ser específica de acordo com o tipo de coagulante utilizado (EDWARDS & KOSIKOWSKI, 1969).



3.3. Efeito do teor de sal na proteólise

O sal interfere acentuadamente na atividade proteolítica das proteases do fermento láctico e dos agentes coagulantes, sendo capaz de influenciar a formação ou a degradação de peptídeos amargos ou de retardar o aparecimento de sabor amargo do queijo VISSER et alii, (1983).

Segundo FOX, (1987), dois fatores importantes devem ser avaliados numa produção de queijo: a concentração média do sal no produto e a uniformidade da distribuição deste no queijo. A umidade é inversamente proporcional ao teor de sal. O pH é diretamente proporcional ao teor de sal. A qualidade dos queijos é dependente do teor de umidade, teor de sal/umidade (S/U) e do pH, portanto é razoável supor que a qualidade varie entre blocos de queijo de um mesmo lote e até entre diferentes partes de um mesmo bloco.

Segundo THOMAS & PEARCE, (1981), a taxa de proteólise durante a maturação do queijo pode ser sensivelmente afetada pela relação sal/umidade.

Os objetivos principais da salga em queijos, segundo FOX, (1987) são: modificar o sabor do produto, (queijos com menos de 0,8% de sal são insípidos); promover a sinérese do coágulo ou do queijo; controlar o teor de umidade; reduzir a atividade de água; influenciar a atividade do agente coagulante, do fermento, dos microorganismos que sobrevivem à pasteurização; controlar a atividade das enzimas provenientes dos microorganismos e as presentes no leite, como a plasmina; inibir o crescimento de microorganismos após a fermentação, interferindo no metabolismo da lactose e consequentemente no pH, afetando a taxa de maturação e a qualidade do queijo.

3.4. Determinação da textura em queijos

O crescimento microbiano, a perda de umidade, a atividade enzimática e a difusão do sal mudam as características de textura dos queijos durante a estocagem, CERVANTES et alii, (1983).

Quando não ocorre perda de umidade durante a maturação, o queijo sofre um amolecimento devido a hidrólise protéica. (DE JONG, 1976).

Métodos objetivos para avaliar o corpo e a textura de queijos em substituição à análise sensorial, têm sido desenvolvidos ao longo dos anos. Segundo GREEN et alii, (1985), as medidas instrumentais de textura de queijos, só podem ser realizadas quando estas envolverem a fracturabilidade do produto e simularem um processo semelhante ao que ocorre durante o seu consumo.

Segundo FARKYE & FOX, (1990), a maior dificuldade em medir as propriedades reológicas de queijo consiste na retirada de amostras representativas. Muitas variedades, tais como Cheddar, Cheshire e alguns "Blue Cheese" são heterogêneos e fraturáveis, outros queijos como os suíços apresentam olhaduras que causam problemas com relação a homogeneidade.

3.5. Determinação da cor em queijos

O sistema Hunter Lab foi desenvolvido em 1948 por R. S. Hunter, como um sistema de cor que podia ser lido diretamente por um colorímetro fotoelétrico. Neste sistema a variação de cor era definida como L, que no diagrama de cor indica luminosidade da amostra, que vai do branco ao negro; "a" e "b" indicam as intensidades da cor dentro de um diagrama de cor. A escala para "a" é +a (vermelho) até -a (verde) e para "b" é +b (amarelo) e -b (azul).

A avaliação da cor nos alimentos pode ser feita via análise instrumental (objetiva) ou análise sensorial (subjetiva). A avaliação objetiva da cor em queijos, visa acompanhar o nível de maturação dos queijos e desta forma avaliar a liberação de aminoácidos, grupos amins e formação da reação de Maillard, causando sérios problemas tecnológicos e econômicos para a indústria queijeira.

3.6. Análise Sensorial em queijos

A qualidade de produtos lácteos e particularmente suas características sensoriais derivam de várias fontes, as quais, estão relacionadas diretamente com as características da matéria-prima integral, das condições de produção e das condições de armazenamento e distribuição.

As pessoas que participam de testes sensoriais podem ser classificadas como inexperientes, experts e treinadas. O primeiro grupo é composto por pessoas que nunca participaram de testes sensoriais. O segundo grupo consiste daquelas pessoas que tem uma limitada experiência em análise sensorial e detém conhecimentos e procedimentos básicos de testes sensorias. O terceiro grupo é aquele composto de pessoas que receberam treinamento formal e são capazes de avaliar e descrever as caraterísticas sensoriais dos produtos, podendo fazer parte em testes mais sofisticados e produzir dados estatisticamente significativos de repetibilidade (CHAVES, 1990).

Em Produtos lácteos, a avaliação sensorial tem cada vez mais se desenvolvido, tornando-se uma excelente ferramenta no desenvolvimento e no controle de qualidade de laticínios. Os testes podem se classificar em quatro tipos básicos: afetivos, discriminatórios, descritivos e de qualidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os reagentes utilizados nas análises químicas foram de grau analítico (p.a.) de diversas procedências.

Os equipamentos utilizados foram os que constam comumente em laboratórios específicos de produtos lácteos.

4.1.1. Processo de fabricação do queijo Minas Frescal

O leite destinado ao processamento foi proveniente da granja leiteira fazenda São Francisco - Sheffa, recebido em latões, sendo submetido a padronização da gordura para 3,2% e pasteurização a 68°C / 2 min em tanque próprio para este fim. O leite foi então refrigerado a 4°C e acondicionado em tanque isotérmico, para ser processado no dia seguinte.

Os 250 litros de leite eram pesados e divididos em alíquotas de 50 litros cada, para os cinco tratamentos diferentes:

- coalho bovino e fermento láctico
- coagulante microbiano e ácido láctico
- coagulante microbiano e fermento láctico
- coalho obtido por fermentação e fermento láctico
- coalho obtido por fermentação e ácido láctico

Para facilitar a compreensão deste estudo passaremos a denominar cada tratamento acima com as seguintes abreviações BOF (coalho bovino e fermento láctico), MICA (coagulante microbiano e ácido láctico), MICROF (coagulante microbiano e fermento láctico), CHA (coalho obtido por fermentação e ácido láctico) e CHF (coalho obtido por fermentação e fermento láctico). Da mesma forma, indicaremos como D2, D9, D16, D23 e D30, a data das análises do queijo durante o período de estocagem que se referem ao segundo, nono, décimo sexto, vigésimo terceiro e trigésimo dia após a produção, respectivamente. Índices 1, 2 e 3 representam as repetições de cada tratamento.

O fermento utilizado neste estudo foi o EZAL® série MA fornecido pela Rhodia (Grupo Rhône-Poulenc). Fermento este, mesofílico homofermentativo, composto por múltiplas cepas mistas de *Lactococcus lactis ssp. lactis* e *Lactococcus lactis ssp. cremoris*.

Os coalhos e coagulantes utilizados foram os seguintes: coalho bovino, obtido a partir do abomaso de bovinos adultos, composto de aproximadamente 20% de quimosina e 80% de pepsina bovina, em presença de cloreto de sódio fornecido pela Christian Hansen (Ha-La)®; Coagulante microbiano Marshall®, obtido de *Mucor pusillus* fornecido pela Rhodia (Grupo Rhône-Poulenc) e coalho obtido por fermentação por *E. coli K12*, marca comercial CHY-MAX®, fornecido por Laboratórios Pfizer, contendo 100% de quimosina tipo A.

A fabricação dos queijos foi realizada como segue, e mantida nas três repetições do experimento. Uma quarta repetição foi feita especialmente para avaliação sensorial e avaliação microbiológica.

Em cada tratamento, foram utilizados aproximadamente 50 kg de leite pasteurizado, os quais eram aquecidos a 35 °C adicionados de 25 ml de solução de cloreto de cálcio 50%, fermento liofilizado de utilização direta no

tanque , e coalho o u coagulante na proporção suficiente para coagular o leite em 30 minutos. NO processamento com ácido láctico, o mesmo foi utilizado na proporção de 23,4ml /100lts de leite (WOLFSCHOON-POMBO et alii, 1978), diluído em água destilada. Atingindo-se o ponto de corte, efetuou - se o corte em tamanho próprio para o queijo em questão, (cubos de 1,5cm x 1,5cm x 1,5 cm) , mantendo a massa em repouso por 5 minutos. Após este período de descanso, iniciou-se agitação, mexendo 5 minutos e descanso de 3 minutos até o ponto final da massa. Atingido o ponto, a massa, era decantada e retirava-se cerca de 15 % de soro e adicionava-se cloreto de sódio na proporção de 1,5% sobre volume inicial de leite, sob agitação para distribuição do sal na massa e iniciava-se a enformagem.

Os queijos sofriam 6 viragens, à temperatura ambiente, nas formas para formação de crosta, e então eram levados à câmara fria da planta piloto do DTA, sob temperatura de 5°C, sendo pesados e empacotados manualmente no dia seguinte.

As análises de cada tratamento, foram realizadas com 2, 9, 16, 23, 30 dias após a produção, utilizando-se para isto, uma peça individual de queijo para cada dia de análise. Desta amostra retirada aleatoriamente, media-se e pesava-se o volume de soro na embalagem, retirava-se amostra para análise de textura, cor, e o restante era triturado em multiprocessador, juntamente com o soro livre da embalagem e acondicionado em frascos providos de tampa, sem a presença de ar, para evitar variações no teor de umidade.

4.2. Métodos

4.2.1. Determinação da força do coalho

Para a determinação da força do coalho, utilizou-se a metodologia sugerida por WOLFSCHOON-POMBO, (1980). 100mg da amostras de

coalho foram diluídas em 100 ml de água destilada. No caso do coalho líquido, CHY-MAX[®], 10 ml do mesmo foram diluídos em 100 ml de água destilada. 10 ml de cada solução, foram adicionados em 100 ml de leite a ser industrializado, à 35°C e mantido sob agitação constante em banho maria regulado para a temperatura do teste. No momento em que se verifica a presença de grumos finos, finaliza-se a cronometragem e o tempo decorrido entre a aplicação do coalho e a floculação inicial é aplicado à fórmula, para cálculo da força do coalho:

$$FC = \frac{V \cdot 2400}{C \cdot T}, \text{ onde,}$$

FC= Força do coalho;

V = Volume de leite;

C = mg de coalho contido em 10 ml de solução previamente preparada;

T = Tempo (em minutos) entre a adição do coalho e a floculação inicial.

4.2.2. Análises físico-químicas do leite pasteurizado

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

4.2.2.1. Acidez Titulável:

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

4.2.2.2. pH

As medidas foram efetuadas utilizando-se um potenciômetro Tecnal, previamente calibrado. A medida era realizada diretamente nas amostras trituradas e acondicionadas nos frascos providos de tampa.

4.2.2.3 . Determinação do teor de gordura:

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

4.2.2.4. Determinação do teor de Sólidos Totais (EST):

A determinação dos teores de sólidos totais (EST), das amostras de leite foi feita pelo método de secagem em estufa a 105°, como descrito na seção 33.2.43 990.19 da A.O.A.C. (1995).

4.2.2.5. Determinação do teor de extrato seco desengordurado (ESD)

A determinação dos teores de sólidos desengordurados foi obtida por diferença matemática subtraindo-se do EST o teor de gordura determinado quimicamente.

4.2.2.6 Determinação do teor de Nitrogênio:

A determinação do teor de nitrogênio total em leite foi feita pelo método semi-micro Kjeldahl, como descrito na seção 33.2.11 (991.20) da A.O.A.C.(1995). A proteína foi determinada como proteína total, multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio pelo fator de conversão (N x 6.38).

4.2.2.7 Determinação do teor de Caseína em leite

A determinação do teor de caseína em leite, foi realizada como descrito na seção 991.23 da A.O.AC. (1995), método indireto de determinação.

4.3. Análises físico-químicas soro

O soro foi amostrado logo após o corte da massa e logo após o ponto, imediatamente antes da salga da mesma, em todos os tratamentos.

As determinações de acidez titulável, pH, gordura e sólidos totais do soro foram realizadas em triplicata, seguindo as metodologias descritas nos itens 4.2.2.1, 4.2.2.2, 4.2.2.3, e 4.2.2.4., 4.2.2.5, deste capítulo.

4.4. Análises físico-químicas do queijo:

4.4.1. Determinação de gordura

O teor de gordura foi determinado pelo método volumétrico de Gerber conforme KOSIKOWSKI, (1977) em triplicata. A gordura no extrato seco (GES), foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ GES} = \frac{\% \text{ de gordura}}{\text{EST (Extrato Seco Total)}} \times 100$$

4.4.2. Determinação de sal em queijo

Foi determinada pelo método de Volhard, em duplicata, segundo RICHARDSON (1985)

4.4.3. Determinação do teor de Umidade / Extrato Seco Total (EST)

Foi determinada pelo método gravimétrico em estufa a 105°C, até peso constante segundo procedimento oficial da AOAC 925.23 (1995) - Sólidos Totais. O teste foi realizado em triplicata.

4.4.4. Determinação do teor de extrato seco desengordurado (ESD)

A determinação dos teores de sólidos desengordurados foi obtida por diferença matemática subtraindo-se do EST o teor de gordura determinado quimicamente.

4.4.5. Determinação do teor de Nitrogênio

O Nitrogênio total foi determinado pelo método de macro Kjeldahl segundo o método oficial da AOAC 991.20 (1995) e a proteína foi determinada como proteína total, multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio pelo fator de conversão (N x 6.38). O teste foi realizado em triplicata.

4.4.6. Proteólise

4.4.6.1. Nitrogênio solúvel a pH 4,6 e a 12% TCA

Os teores de nitrogênio solúvel em tampão acetato a pH 4,6 e em 12%TCA foram determinados para medir a extensão e a profundidade da proteólise no queijo nos tempos de 0 a 4 semanas de armazenamento a 5°C. Os teores de N solúveis determinados pelo método macro Kjeldahl foram convertidos a proteína solúvel multiplicando-se pelo fator de conversão (N x 6.38). Os resultados foram expressos como porcentagem dos teores de proteína total do queijo Minas. O teste foi realizado em triplicata segundo BYNUM & BARBANO (1985).

4.4.6.2. Eletroforese

Amostras foram preparadas do seguinte modo: 0,1000g de queijo em 5ml de tampão de amostra, 0.0500g de caseinato de sódio em 5ml de tampão, de acordo com SHALABI and FOX (1987). Aplicou-se 7µl de amostra e 5µl de padrão nos géis.

A eletroforese em gel de uréia foi realizada utilizando-se uma unidade Mini-Protean BioRad de acordo com o método modificado por FARKYE et alii, (1991) a partir do método de ANDREWS (1983), em concentração de 12% em acrilamida . Em todas as preparações foi feita uma pré-corrída por 30 minutos a 120 V e corrída a 120 V com 2h de duração. Caseinato de sódio foi utilizado como padrão. Os géis foram corados utilizando-se Coomanssie Brilliant Blue G250 de acordo com método de BLAKESELY and BOEZI (1977).

4.4.7. Determinação da cor

No momento de preparação da amostra, para todas as análises físico-químicas, retirava-se uma amostra da crosta do queijo para a determinação da cor, medida através aparelho de colorímetro Minolta, para se determinar os valores de L, a e b.

4.4.8. Determinação Instrumental do perfil de textura do queijo Minas

A textura do queijo foi avaliada através da Análise do Perfil de Textura ("TPA"-Texture Profile Analysis) utilizando-se o texturômetro universal TA XT2, marca SMS.

Preparo das amostras para TPA

1. De cada peça de queijo, 6 cilindros eram retirados do centro do queijo e 6 da extremidade. O teste foi realizado com 10 cilindros, sendo 5 de cada uma das regiões.
2. As amostras tinham formato cilíndrico com diâmetro=20mm e altura=20mm.
3. O Corte dos cilindros era realizado com uma lâmina cilíndrica afiada, fabricada sob encomenda para este teste.
4. As amostras eram embaladas em pequenos sacos plásticos. O teste era realizado logo após a coleta das amostras, sendo as amostras mantidas à temperatura de refrigeração, para evitar alterações na textura.

5. A homogeneidade e uniformidade das amostras eram verificadas durante o teste. Quando a amostra se desintegrava durante a medida, o resultado era desconsiderado e o teste repetido.

As condições utilizadas no programa do texturômetro universal TA XT2 ("Texture Analyser") Stable Micro System foram:

Teste de compressão: Força x Tempo

- Força tempo threshold = 20seg.
- Velocidade pré teste = 2.0mm/seg.
- Velocidade do teste = 5.0mm/seg.
- Velocidade pós teste = 5.0mm/seg.
- Distância que o dispositivo comprime a amostra = 5mm, correspondente a 50% de compressão.
- toques de compressão = 2
- Força de contato = 5.0g
- Dispositivo utilizado: cilindro metálico com 55mm de diâmetro (SMS P/55)

4.5. Cálculos das porcentagens de transição de gordura e sólidos totais do leite para o queijo.

As porcentagens de transição de gordura do leite para o queijo foram realizadas de acordo com GIGANTE, (1991).

4.6. Cálculo do rendimento de fabricação:

Os rendimentos das fabricações, foram calculados de duas formas diferentes. A primeira forma de cálculo foi a tradicionalmente utilizada pelos laticínios, ou seja, dividindo-se a quantidade de leite pela quantidade de queijo obtida em cada tratamento e expresso em Kg de leite/ Kg de queijo. A segunda maneira de cálculo foi a de ajustar não somente a umidade mas também o teor de sal do queijo, corrigindo-se ambos para valores pré-fixados (BARBANO e SHIERBON, 1990). Os resultados obtidos por este último cálculo foram expressos como rendimento ajustado a 60% de umidade e 1,5% de sal. Estes cálculos foram realizados com o objetivo de demonstrar a influência da umidade no rendimento do queijo Minas Frescal, eliminando desta forma as variações de processo.

4.7. Avaliação sensorial

Para avaliação sensorial, realizou-se uma quarta produção dos queijos, seguindo-se a mesma metodologia de fabricação para cada tratamento e aleatorizando-se a ordem de processamento. Desta fabricação, realizaram-se também os testes microbiológicos dos produtos finais e do leite empregado na fabricação.

O teste de aceitação, foi realizado utilizando-se escala hedônica estruturada de 9 pontos para os atributos textura, sabor, aparência e avaliação hedônica global. As fichas de avaliação são apresentadas no anexo I. Foram analisados os queijos com dois tipos de coalhos (obtido por fermentação e bovino) e um coagulante microbiano, após 2, 9, 16, 23 e 30 dias de processamento.

Utilizou-se o modelo experimental de blocos completos casualizados, aplicados a quarenta e três provadores não treinados. Os testes foram realizados em cabines individuais, sob luz vermelha (para evitar a

interferência da cor na avaliação). As amostras foram servidas em fatias de 3 cm², servidos em pratos plásticos, codificados, à temperatura de conservação (geladeira).

Cada provador recebeu a amostra com ficha monadicamente, e julgou textura, sabor e aspectos globais, em cabine individual sob luz vermelha. Em outra etapa, dentro do laboratório de sensorial, apreciou a aparência das amostras, anotando suas observações em outra ficha de avaliação. Para o teste de aparência, existia em bancada do laboratório de análise sensorial uma peça de cada tratamento, sobre as quais, os julgadores inferiram suas apreciações.

4.8. Análises microbiológicas

Avaliação da Contagem Total de microorganismos, Coliformes Totais e Coliformes Fecais, no leite após pasteurização, assim como para os queijos com 7 e 30 dias de fabricação, foi realizada conforme compêndio de métodos para exames microbiológicos de alimentos da APHA (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

Para a contagem global, utilizou-se o método PCA ("Plate Count Agar), em triplicata e nas diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³, para leite e queijos com ácido láctico e 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ para queijos com fermento láctico. Amostras de leite foram coletadas no pasteurizador e no tanque de cada tratamento.

Para a contagem de microorganismos do grupo coliforme, utilizou-se de teste presuntivo NMP. Utilizou-se o caldo enriquecido LST ("Lauryl Sulfate Tryptose"), incubado a 35°C por 48 horas. Nos tubos com presença de gás, após o período de incubação, realizou-se teste de confirmação (BGB- "Brilhaft Green Bile ") e EC ("Escherichia Coli Broth). Amostras de leite foram coletadas no pasteurizador e no tanque de cada tratamento.

Para as amostras de queijo, utilizou-se a mesma metodologia para PCA e microorganismos do grupo coliforme, acrescentando-se metodologia para pesquisa de bolores e leveduras. Para tanto, utilizou-se método de contagem em placa, com o meio PDA ("Potato Dextrose Agar") com clorafenicol. As diluições foram as mesmas utilizadas para a Contagem Total e as placas inoculadas eram incubadas à temperatura de 30°C por 5 dias.

4.9. Planejamento experimental e análise estatística

O delineamento deste experimento foi do tipo aleatorizado em blocos. Os tratamentos foram aplicados de forma aleatória na fabricação dos queijos, utilizando-se o mesmo procedimento nas três repetições, assim como, na última produção destinada à análise sensorial e microbiológica. O experimento, portanto, foi replicado em blocos completos.

Realizou-se a análise de variância pelo procedimento GLM ("General Linear Models Procedure") e o teste de médias REGWQ ("Ryan-Eynot-Gabriel-Welsh Multiple Range Test"), com auxílio do programa estatístico SAS®, versão 6.11 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Os dados referentes ao rendimento, como as porcentagens de transição de elementos e análise sensorial foram tratados pela análise de variância (ANOVA) e testando-se as médias pelo teste de Tukey, com auxílio do programa estatístico SAS®, versão 6.11 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.1. Composição físico-química do leite.

As tabelas 5.5.1.1, 5.5.1.2, 5.5.1.3 , 5.5.1.4 e 5.5.1.5 apresentam os resultados médios obtidos nas determinações de acidez, pH, gordura, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), proteína total e caseína realizados nos leites empregados nas fabricações . DP e CV correspondem ao desvio padrão e coeficiente de variação, respectivamente.

TABELA 5.5.1-1. Composição físico-química do leite utilizado no processamento com coalho bovino e fermento láctico.

	BOF1	BOF2	BOF3	média	DP	CV (%)
Gordura(%)	3,23	3,27	3,23	3,24	0,02	0,71
Proteína(%)	2,75	3,15	3,40	3,10	0,33	10,58
caseína(%)	2,20	2,35	2,85	2,47	0,34	13,80
Umidade(%)	87,97	88,64	87,80	88,14	0,44	0,50
EST(%)	12,03	11,36	12,20	11,86	0,44	3,74
ESD(%)	8,80	8,09	8,97	8,62	0,47	5,42
pH	6,66	6,65	6,64	6,65	0,01	0,15
Acidez(°D)	16,00	17,50	17,25	16,92	0,80	4,75

TABELA 5.5.1.2. Composição físico-química do leite utilizado no processamento com coagulante microbiano e ácido láctico.

	MICA1	MICA2	MICA3	média	DP	CV (%)
Gordura(%)	3,07	3,17	3,30	3,18	0,12	3,63
Proteína(%)	3,34	3,25	3,19	3,26	0,08	2,32
caseína(%)	2,78	2,72	2,39	2,63	0,21	7,98
Umidade(%)	88,44	87,89	88,17	88,17	0,28	0,31
EST(%)	11,56	12,11	11,83	11,83	0,28	2,32
ESD(%)	8,49	8,94	8,53	8,65	0,25	2,88
pH	6,72	6,55	6,66	6,64	0,09	1,30
Acidez(°D)	16,00	18,50	17,00	17,17	1,26	7,33

TABELA 5.5.1.3. Composição físico-química do leite utilizado no processamento com coagulante microbiano e fermento láctico.

	MICROF 1	MICROF 2	MICROF 3	média	DP	CV (%)
Gordura(%)	3,20	3,27	3,20	3,22	0,04	1,25
Proteína(%)	2,72	3,15	3,11	2,99	0,24	7,94
caseína(%)	2,17	2,35	2,58	2,37	0,21	8,68
Umidade(%)	88,10	88,17	88,20	88,16	0,05	0,06
EST(%)	11,90	11,83	12,8	12,18	0,54	4,44
ESD(%)	8,70	8,56	8,60	8,62	0,07	0,84
pH	6,62	6,64	6,67	6,64	0,03	0,38
Acidez(°D)	16,00	18,00	16,00	16,67	1,15	6,93

TABELA 5.5.1.4. Composição físico-química do leite utilizado no processamento com coalho obtido por fermentação e ácido láctico.

	CHA 1	CHA 2	CHA 3	média	DP	CV (%)
Gordura(%)	3,30	3,30	3,20	3,27	0,06	1,77
Proteína(%)	2,72	3,19	3,36	3,09	0,33	10,73
caseína(%)	2,15	2,39	2,79	2,44	0,32	13,23
Umidade(%)	88,28	88,17	88,36	88,27	0,10	0,11
EST(%)	11,72	11,83	11,64	11,73	0,10	0,81
ESD(%)	8,42	8,53	8,44	8,46	0,06	0,69
pH	6,61	6,56	6,66	6,61	0,05	0,76
Acidez(°D)	16,75	18,50	16,50	17,25	1,09	6,32

TABELA 5.5.1.5. Composição físico-química do leite utilizado no processamento com coalho obtido por fermentação e fermento láctico.

	CHF 1	CHF 2	CHF 3	média	DP	CV (%)
Gordura(%)	3,10	3,20	3,20	3,17	0,06	1,82
Proteína(%)	2,83	3,15	3,14	3,04	0,18	5,98
caseína(%)	2,27	2,35	2,57	2,40	0,16	6,48
Umidade(%)	88,10	88,50	88,94	88,51	0,42	0,47
EST(%)	11,90	11,50	11,06	11,49	0,42	3,66
ESD(%)	8,80	8,30	7,86	8,32	0,47	5,65
pH	6,56	6,65	6,65	6,62	0,05	0,78
Acidez(°D)	17,00	17,50	16,50	17,00	0,50	2,94

A composição físico-química influencia a composição final do queijo. O leite utilizado em cada repetição apresentou diferenças em sua composição,

sendo este fator uma causa da variação na produção dos diferentes tratamentos.

Esta variação das composições dos leites dos três processamentos, pode implicar em diferenças nas características dos queijos a cada dia. A influência desta variação sobre os parâmetros estudados neste trabalho foi anulada, blocando-se esta variável, na análise estatística.

O experimento foi iniciado em outubro de 1996 e terminado em março de 1997, sendo o tempo médio entre um processamento e outro de um mês e meio. Durante este período, da safra leiteira, a variação esperada no leite não deveria ser grande, como foi encontrado nos resultados deste estudo. Os maiores constituintes que variaram foram a proteína e gordura, o que é condizente com os dados reportados na literatura, em função de alimentação do animal, idade, estado de saúde, conservação do leite entre outros (WOLFSCHOON-POMBO et alii, 1978). A variação da proteína inclusive é maior em função do leite do primeiro experimento possuir números inferiores deste elemento. Como o leite fornecido pela Fazenda São Francisco-SHEFFA, era proveniente de regiões diferentes, esta variação é perfeitamente explicável. Contudo esta variação foi anulada no planejamento estatístico como dito anteriormente.

5.2 Composição físico-química do queijo.

As tabelas 5.5.2.1, 5.5.2.2, 5.5.2.3, 5.5.2.4 e 5.5.2.5, apresentam a composição dos queijos submetidos aos tratamentos BOF, MICA, MICROF, CHA e CHF, respectivamente. Os resultados demonstram que os queijos apresentam composição similar, evidenciando portanto, que os três coagulantes, podem ser utilizados em fabricação de queijos frescos, sem grandes modificações na tecnologia empregada para industrialização. Esses resultados, foram obtidos para os queijos após dois dias de processamento.

TABELA 5.5.2.1 - Composição Físico-química dos queijos produzidos com coalho bovino e fermento láctico.

	BOF 1	BOF 2	BOF 3	Média	DP	CV (%)
Gordura (%)	20,60	21,00	20,20	20,60	0,40	1,94
Proteína (%)	14,16	15,75	12,66	14,19	1,55	10,89
Umidade (%)	61,88	57,83	65,56	61,76	3,87	6,26
EST (%)	38,12	42,17	34,44	38,24	3,87	10,11
ESD (%)	17,52	21,15	14,24	17,64	3,46	19,60
GES %	54,05	49,81	58,74	54,20	4,47	8,24
SAL/UM %	3,14	3,99	2,31	3,15	0,84	26,70
SAL (%)	1,94	2,24	1,52	1,90	0,36	19,03
pH	5,42	6,05	5,46	5,64	0,35	6,25

TABELA 5.5.2.2 - Composição Físico-química dos queijos produzidos com coagulante microbiano e ácido láctico.

	MICA 1	MICA 2	MICA 3	Média	DP	CV (%)
Gordura(%)	21,40	21,40	21,50	21,43	0,06	0,27
Proteína (%)	15,05	14,11	12,67	13,94	1,20	8,60
Umidade (%)	60,34	62,71	65,49	62,85	2,58	4,10
EST (%)	39,66	37,29	34,51	37,15	2,58	6,94
ESD (%)	18,26	15,89	13,01	15,72	2,63	16,72
GES %	53,98	57,43	62,35	57,92	4,21	7,26
SAL (%)	1,54	1,95	1,73	1,74	0,21	11,79
SAL/UM %	2,58	3,17	2,64	2,80	0,32	11,61
pH	6,34	6,07	6,29	6,23	0,14	2,30

TABELA 5.5.2.3 - Composição Físico-química dos queijos produzidos com coagulante microbiano e fermento láctico.

	MICROF 1	MICROF 2	MICROF 3	Média	DP	CV (%)
Gordura(%)	21,20	22,30	21,80	21,77	0,55	2,53
Proteína (%)	14,07	15,68	15,87	15,21	0,99	6,50
Umidade (%)	61,02	56,58	58,28	58,63	2,24	3,82
EST (%)	38,86	43,42	41,72	41,33	2,30	5,58
ESD (%)	17,66	21,12	19,92	19,57	1,76	8,98
GES %	54,58	51,36	52,27	52,74	1,66	3,15
SAL (%)	1,99	1,94	1,26	1,73	0,41	23,57
SAL/UM %	3,30	3,62	2,17	3,03	0,76	25,14
pH	5,50	5,43	5,05	5,33	0,24	4,55

TABELA 5.5.2.4 - Composição Físico-química dos queijos produzidos com coalho obtido por fermentação e ácido láctico.

	CHA 1	CHA 2	CHA 3	Média	DP	CV (%)
Gordura(%)	19,90	21,70	21,50	21,03	0,99	4,69
Proteína (%)	13,96	15,13	13,09	14,06	1,02	7,28
Umidade (%)	62,51	60,81	64,48	62,60	1,84	2,93
EST (%)	37,49	39,19	35,52	37,40	1,84	4,91
ESD (%)	17,59	17,49	14,02	16,37	2,03	12,42
GES %	53,03	55,45	60,76	56,41	3,95	7,01
SAL (%)	1,93	1,83	1,10	1,62	0,45	27,97
SAL/UM %	3,11	3,00	1,70	2,60	0,78	30,12
pH	6,53	6,07	6,29	6,30	0,23	3,65

TABELA 5.5.2.5 - Composição Físico-química dos queijos produzidos com coalho obtido por fermentação e fermento láctico.

	CHF 1	CHF 2	CHF 3	Média	DP	CV (%)
Gordura(%)	20,20	21,60	20,10	20,63	0,84	4,06
Proteína (%)	13,25	14,47	13,75	13,82	0,61	4,44
Umidade (%)	63,81	59,36	62,47	61,88	2,28	3,69
EST (%)	36,19	40,64	37,53	38,12	2,28	5,99
ESD (%)	55,93	53,15	53,60	54,23	1,49	2,75
GES %	15,99	19,04	17,43	17,49	1,53	8,73
SAL (%)	2,54	4,27	3,10	3,30	0,88	26,72
SAL/UM %	1,60	2,49	1,94	2,01	0,45	22,34
pH	5,99	5,70	5,48	5,72	0,26	4,47

A tabela 5.5.2.6, apresenta resultados de composição do queijo Minas Frescal, obtido por outros pesquisadores.

TABELA 5.5.2.6 - Composição média do queijo Minas Frescal

	C/ fermento*	C / ácido*	A C**
Gordura (%)	18,55	17,55	24,59
Umidade (%)	59,10	61,10	50,41
pH	5,20	6,39	5,80
sal (%)	-	-	0,96
Sal/umidade (%)	-	-	1,90
EST (%)	40,90	38,90	49,59
ESD (%)	22,35	21,35	25,00
GES (%)	45,35	45,12	48,78
Proteína (%)	-	-	19,00

* WOLFSCHOON - POMBO et alii (1978)

** Amostra comercial - VAN DENDER (1995)

Os teores de sal, sal sobre umidade, e umidade foram os componentes do queijo que mais variaram, o que pode ser confirmado pelos coeficientes de variação maiores (CV). Esta variação foi provavelmente devida ao método de salga empregado neste experimento, que foi o de salga na massa, minutos antes do ponto.

Na análise estatística evidenciou-se diferenças significativas, na variável tratamento ($p=0,0001$) e na interação Bloco*tratamento ($p=0,0001$). Esta análise demonstrou que houve variação significativa entre os tratamentos e nos tratamentos dos diferentes blocos (repetições).

Em geral, a composição dos queijos processados foi bastante similar à encontrada comercialmente e em outros trabalhos (VAN DENDER, 1995; WOLFSCHOON - POMBO et alii., 1978), como pode ser comprovado pela tabela 5.5.2.6.

5.3- Composição físico-química do soro.

As tabelas 5.5.3.1, 5.5.3.2, 5.5.3.3, 5.5.3.4, 5.5.3.5 apresentam a composição dos soros obtidos nas fabricações dos queijos submetidos aos tratamentos BOF, MICA, MICROF, CHA e CHF, respectivamente. Os resultados médios das determinações de acidez, pH, gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, proteína total, dos soros obtidos nas fabricações.

O objetivo principal é demonstrar as variações de perda de gordura no soro, fator este que influencia na composição média dos mesmos e é importante para avaliação do rendimento e cifra de transição.

TABELA 5.5.3.1 - Composição físico-química do soro produzido com coalho bovino e fermento láctico.

	BOF 1	BOF 2	BOF 3	média	DP	CV(%)
Gordura (%)	0,50	0,70	0,60	0,60	0,10	16,67
Proteína (%)	0,60	1,00	1,10	0,90	0,26	29,40
Umidade (%)	92,90	93,10	93,20	93,07	0,15	0,16
EST. (%)	7,10	6,90	6,80	6,93	0,15	2,20
ESD. (%)	6,60	6,20	6,10	6,30	0,26	4,20
pH corte	6,47	6,43	6,35	6,42	0,06	0,95
Acidez corte (°D)*	11,00	11,25	11,75	11,33	0,38	3,37
pH ponto	6,43	6,08	6,32	6,28	0,18	2,85
Acidez ponto (°D)**	11,00	11,25	12,25	11,50	0,66	5,75

* Corte- Momento do corte da coalhada no tanque de fabricação

** Ponto - Momento do ponto da massa no processo produtivo

TABELA 5.5.3.2 - Composição físico-química do soro produzido com coagulante microbiano e ácido láctico.

	MICA 1	MICA 2	MICA 3	média	DP	CV (%)
Gordura (%)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00
Proteína (%)	0,60	0,90	1,00	0,83	0,21	24,98
Umidade (%)	92,80	93,30	93,30	93,13	0,29	0,31
EST. (%)	7,20	6,70	6,70	6,87	0,29	4,20
ESD. (%)	6,70	6,20	6,20	6,37	0,29	4,53
pH corte	6,47	6,28	6,37	6,37	0,10	1,49
Acidez corte (°D)*	11,75	13,5	12,30	12,52	0,89	7,15
pH ponto	6,46	6,28	6,37	6,37	0,09	1,41
Acidez ponto(°D)**	12,24	13,50	12,50	12,75	0,67	5,22

* Corte- Momento do corte da coalhada no tanque de fabricação

** Ponto - Momento do ponto da massa no processo produtivo

TABELA 5.5.3.3 - Composição físico-química do soro produzido com coagulante microbiano e fermento láctico.

	MICROF 1	MICROF	MICROF	média	DP	CV (%)
Gordura (%)	0,40	0,50	0,50	0,47	0,06	12,37
Proteína (%)	0,70	1,00	1,00	0,90	0,17	19,25
Umidade (%)	93,00	93,3	93,70	93,33	0,35	0,38
EST. (%)	7,00	6,70	6,30	6,67	0,35	5,27
ESD. (%)	6,60	6,20	5,80	6,20	0,40	6,45
pH corte	6,45	6,48	6,50	6,48	0,03	0,39
Acidez corte (°D)*	10,50	11,75	10,25	10,83	0,80	7,42
pH ponto	6,42	6,48	6,46	6,45	0,03	0,47
Acidez ponto(°D)**	11,50	11,75	11,00	11,42	0,38	3,34

* Corte- Momento do corte da coalhada no tanque de fabricação

** Ponto - Momento do ponto da massa no processo produtivo

TABELA 5.5.3.4 - Composição físico-química do soro produzido com coalho obtido por fermentação e ácido láctico.

	CHA 1	CHA 2	CHA 3	média	DP	CV (%)
Gordura (%)	0,40	0,40	0,50	0,43	0,06	13,32
Proteína (%)	0,60	0,90	1,10	0,87	0,25	29,04
Umidade (%)	93,00	93,60	93,40	93,33	0,31	0,33
EST. (%)	7,00	6,40	6,60	6,67	0,31	4,58
ESD. (%)	6,60	6,00	6,10	6,23	0,32	5,16
pH corte	6,36	6,30	6,27	6,31	0,05	0,75
Acidez corte (°D)*	13,50	13,50	13,00	13,33	0,29	2,17
pH ponto	6,36	6,30	6,27	6,31	0,05	0,73
Acidez ponto(°D)**	13,50	12,50	13,00	13,00	0,50	3,85

* Corte- Momento do corte da coalhada no tanque de fabricação

** Ponto - Momento do ponto da massa no processo produtivo

TABELA 5.5.3.5 - Composição físico-química do soro produzido com coalho obtido por fermentação e ácido láctico.

	CHF 1	CHF 2	CHF 3	média	DP	CV (%)
Gordura (%)	0,40	0,50	0,50	0,47	0,06	12,37
Proteína (%)	0,70	1,00	1,10	0,93	0,21	22,30
Umidade (%)	95,3	93,10	93,70	94,03	1,14	1,21
EST. (%)	4,70	6,90	6,30	5,97	1,14	19,06
ESD. (%)	4,30	6,40	5,80	5,50	1,08	19,67
pH corte*	6,44	6,46	6,52	6,47	0,04	0,64
Acidez corte (°D)*	11,45	13,75	10,00	11,73	1,89	16,12
pH ponto**	6,42	6,43	6,49	6,45	0,04	0,59
Acidez ponto(°D)**	11,95	13,50	11,00	12,15	1,26	10,39

* Corte- Momento do corte da coalhada no tanque de fabricação

** Ponto - Momento do ponto da massa no processo produtivo

Os teores de gordura e proteína foram os que apresentaram maior variação, o que pode ser confirmado com os coeficientes de variação maiores. Esta variação pode ser explicada pela menor sensibilidade Gerber (volumétrico), em relação aos métodos gravimétricos. Esta mesma variação tem sido registrada em trabalhos com queijo Minas Frescal e Minas Padrão, o que pode ser devido a gordura estar em diferentes pontos da rede de coalhada, favorecendo ou prejudicando o seu aproveitamento na coalhada. A proteína também apresentou alto coeficiente de variação, muito embora, este nível de variação tenha sido reportado na literatura (WOLFSCHOON-POMBO, 1978). Comparando as perdas de gordura com a literatura especializada, (FURTADO et alii, 1980), foram encontrados neste estudo valores inferiores aos relatados por estes autores e similares aos relatados por VAN DENDER (1995), quando da fabricação do queijo Minas Frescal convencionalmente produzido.

Outro fator que pode ter contribuído para variação na perda de gordura e proteína entre as repetições é a variação da razão caseína/gordura do leite. Como esse fator não foi constante, isso se refletiu na composição do queijo e provavelmente na perda de gordura e proteína no soro.

5.4 Rendimento

O rendimento com base no volume ou quilos de leite necessários para produzir um quilo de queijo é um método prático, tradicionalmente empregado em laticínios para a avaliação da eficiência do processamento de queijos. (FOLEGATTI, 1994). Este método foi utilizado neste trabalho, como forma de verificação dos rendimentos práticos de cada processamento para cada tratamento. Na tabela 5.5.4.1, os resultados médios dos cálculos do rendimento com base nos quilos de leite necessários para produzir um quilo de queijo são apresentados como REND1 e expressos como Kgleite/Kgqueijo. Este cálculo de rendimento foi determinado, pesando-se a quantidade de leite para cada produção individual dos tratamentos, em balança com precisão de três casas decimais e pesando-se a totalidade dos queijos produzidos, na mesma balança, um dia após a fabricação.

Uma outra forma de se determinar o rendimento neste estudo foi o de calcular a quantidade de queijo obtida por tratamento, ajustando-se a umidade e o teor de sal dos queijos obtidos nos diversos experimentos, ou seja, uma relação matemática da quantidade de quilos de queijos obtidos, se a umidade fosse 60% e o teor de sal fosse 1,5%. (BARBANO & SHERBON, 1984). Na tabela 5.5.4.1, são apresentados os resultados médios dos cálculos dos rendimentos, obtidos conforme esse procedimento e expressos como: kgqueijo a 60% e 1,5% / Kg leite. Esta forma de cálculo, para melhor entendimento foi denominada como REND2.

TABELA 5.5.4.1 - Resultado dos cálculos dos rendimentos de fabricação

	REND1 Kg leite/Kg queijo	REND 2 Kg queijo a 60%um.e 1,5% sal /Kgs leite
BOF	5,60 ^a	7,82 ^a
MICA	5,56 ^a	7,97 ^a
MICROF	6,37 ^a	8,01 ^a
CHA	5,25 ^a	8,60 ^a
CHF	5,22 ^a	8,40 ^a

Médias com o mesmo expoente, na mesma coluna, não são significativamente diferentes (p<0,05).

Na análise de variância para o cálculo do REND1 apesar de não haver diferenças significativas (p<0,05), o tratamento CHF foi o que atingiu a melhor performance, seguido pelo CHA, MICA, BOF e MICROF. De acordo com este indicador, CHF requereu a menor quantidade de leite para a produção de quilo de queijo.

Na análise de variância para o cálculo do REND2, também não houve diferenças significativas (p<0,05) e o tratamento CHA foi o que atingiu a melhor performance, seguido pelo CHF, MICA, MICROF e BOF. De acordo com este indicador, CHA produziu a maior quantidade de queijos pela quantidade de leite utilizada na produção.

Os resultados de REND2, apresentados neste trabalho, conferem com os resultados obtidos por WOLFSCHOON-POMBO et alii., (1978), FURTADO (1993), VAN DENDER (1995), trabalhando com queijo Minas Frescal, com fermento láctico e com ácido láctico.

Para este estudo encontramos valores contrastantes ao da literatura, quanto ao REND1, pois o queijo com fermento obteve uma melhor performance em relação ao queijo com acidificação direta, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa. A razão pela qual este fenômeno ocorreu neste estudo, pode ter sido o uso de cultura liofilizada concentrada, de uso direto no tanque de fabricação, para os tratamentos com fermento láctico (BOF, MICROF e CHF). Quando se utiliza fermento láctico pelo método convencional, ou seja, preparação de cultura mãe, cultura intermediária e cultura industrial, ao se adicionar o fermento no tanque de produção, incorpora-se imediatamente uma quantidade de ácido láctico, devido a elevada acidez do fermento. Este ácido tende a produzir uma coalhada mais desmineralizada com consequente dessoramento excessivo, como no uso direto de ácido láctico. Como não tivemos esta acidez adicional, que favorece inclusive atuação do coalho ou coagulante, o queijo dos tratamentos com fermento liofilizado podem ter tido uma tendência a uma maior retenção de água, o que favorece sobremaneira o rendimento de fabricação.

Os resultados de REND1 e REND2, apresentados neste trabalho, demonstram um maior rendimento para os coalhos obtidos por fermentação. Embora esses valores não sejam significativamente diferentes, quando da análise estatística, os resultados são concordantes com os encontrados por FOLEGATTI (1994).

5.5. Cifras de transição

A tabela 4.4.5.1 apresenta os percentuais médios de transição dos constituintes , proteína, gordura e EST dos queijos em estudo.

A transição de gordura foi maior para CHF(89,32%), seguida por MICA (88,87%), CHA (88,61%), MICROF (88,12%) e finalmente por BOF (84,56%), embora as diferenças entre tratamentos não sejam significativas a $p < 0,005$.

Os resultados apresentados para transição de gordura, conferem com os reportados por BROOME & HICKEY (1990), CORRADINI et alii (1990).

Quanto a transição de proteína para o queijo, o maior valor foi observado para CHA (78,86%), seguido de MICROF (78,38%), CHF (76,94%), BOF (75,79 %) e finalmente por MICA (74, 31%). Esta diferença pode estar relacionada à composição dos coalhos e coagulantes utilizados neste experimento. Entre o coalho bovino, e o obtido por fermentação, a diferença nos teores de quimosina e pepsina bovina pode acarretar estas diferenças no processo de coagulação do leite. (VISSER, 1993).

BARBANO & RASMUSSEN (1992), utilizaram coalho obtido por fermentação e microbiano em queijo Cheddar e observaram maior perda de proteínas, quando do uso do coalho microbiano. Neste mesmo experimento os autores compararam o coalho obtido por fermentação com o coalho bovino. Quando da utilização do coalho bovino houve maior perda de gordura no soro e diminuição do rendimento. Os autores atribuíram as perdas à presença de pepsina no coalho bovino. Neste estudo, também verificou-se que o coalho bovino obteve menores valores de rendimento e transição de elementos.

Quanto à porcentagem de transição de sólidos totais do leite para o queijo, o maior valor foi observado para o tratamento CHF (58,32%), CHA (55,39%), MICROF (53,98%), MICA (52,41%) e finalmente por BOF (52,05%), o que está de acordo com a literatura, onde diversos trabalhos comparam eficiência do coalho obtido por fermentação contra o coalho de vitelo, coagulantes microbianos e coalho bovino (HICKS et alii. (1987), EMMONS et alii. (1990), BARBANO & SHERBON (1984), CORRADINI et alii. (1990).

TABELA 5.5.5.1 - Cifras de transição

	BOF	MICA	MICROF	CHA	CHF
GORDURA(%)	84,56 ^a	88,88 ^a	88,12 ^a	88,62 ^a	89,32 ^a
PROTEÍNA(%)	75,79 ^a	74,31 ^a	78,39 ^a	78,86 ^a	76,95 ^a
EST(%)	52,05 ^a	52,42 ^a	53,98 ^a	55,39 ^a	58,32 ^a

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

Como se pode observar, os melhores resultados, estão nos queijos produzidos com coalho obtido por fermentação com fermento láctico para o aproveitamento do EST, seguido pelo tratamento com coalho obtido por fermentação com ácido láctico, coagulante microbiano com fermento, coagulante microbiano com ácido láctico e finalmente com coalho bovino e fermento láctico.

5.6- Proteólise

Nas figuras 5.5.6.1 e 5.5.6.2, estão representados os índices de extensão e profundidade obtidos para o queijo Minas Frescal, durante o tempo de duração do experimento.

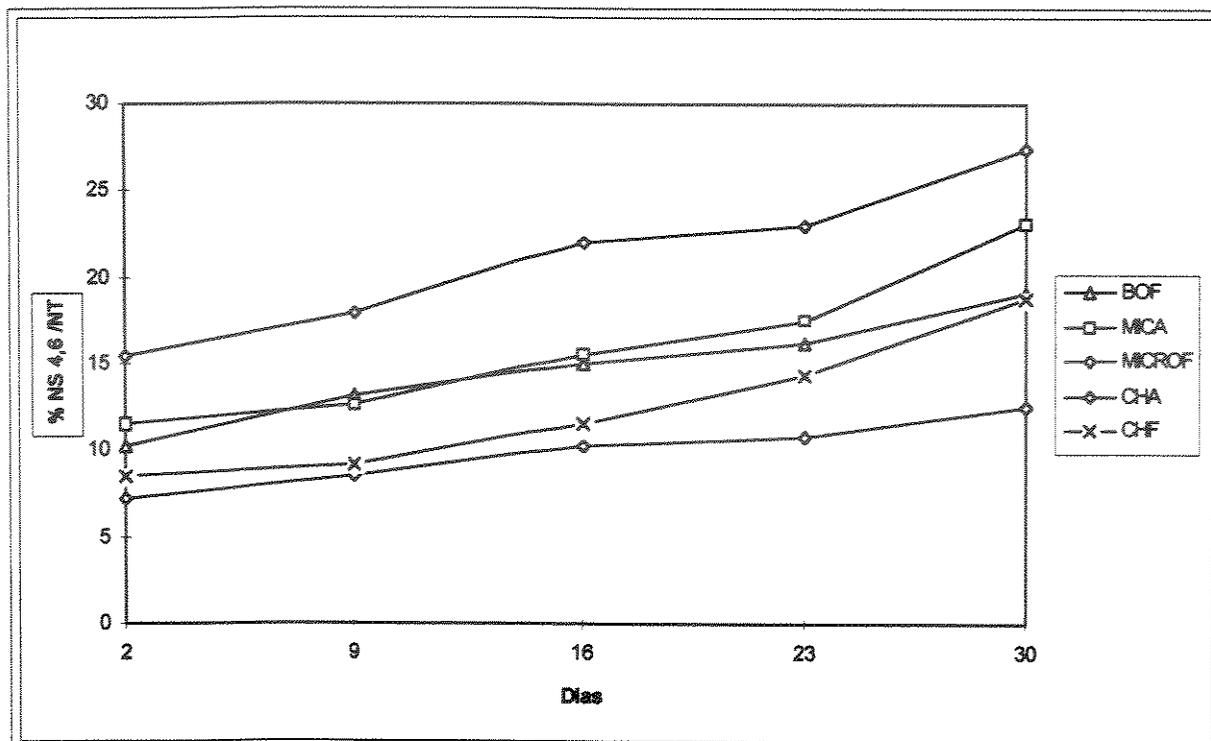


Figura 5.5.6.1 - Evolução do Nitrogênio Solúvel a pH 4,6 durante armazenagem

A figura 5.5.6.1 contém os níveis de nitrogênio solúvel a pH 4,6 dos diversos tratamentos. Pode -se observar claramente, que houve um aumento no índice em todos os tratamentos, na seguinte ordem: MICROF > MICA > BOF > CHF > CHA. Esta evolução está de acordo com os trabalhos encontrados na literatura, FOLEGATTI, (1994); VAN DENDER, (1995), diferindo somente na intensidade, em função das características do queijo Minas Frescal, tais como, nível de umidade, teor de sal, pH e teor de lactose. O Nitrogênio solúvel a pH

4,6 , como pode-se observar, apresentou maior atividade proteolítica quando o coagulante microbiano foi utilizado, sendo mais intensa quando em combinação com fermento láctico. Os tratamentos empregando coalho obtido por fermentação apresentaram os menores valores de Nitrogênio solúvel a pH 4,6, com valores mínimos quando a associação foi com acidificação direta.

Diferenças significativas foram observadas, nas interações bloco* tratamento ($p=0,0001$), bloco * tempo ($p=0,008$) e tratamento * tempo ($p=0,09$) , o que demonstra atividade proteolítica superior para o coagulante microbiano, em relação ao coalho bovino, que por sua vez foi mais proteolítico que o coalho obtido por fermentação, dentro do período de tempo, neste estudo, 30 dias .

A figura 5.5.6.2 contém os níveis médios de nitrogênio solúvel em TCA 12%, os quais, indicam o nível de proteólise (profundidade de maturação) dos diversos tratamentos e está associado principalmente à ação dos fermentos lácticos na fabricação do queijo.

Todos os tratamentos, apresentaram crescimento no Nitrogênio solúvel em TCA 12% ao longo do tempo. Valores mais altos foram observados quando o agente coagulante estava associado com o fermento láctico, tanto para o coagulante microbiano, quanto para o coalho obtido por fermentação. Valores mais altos durante todo o tempo do experimento foram observados para o tratamento MICROF por qualquer dos indicadores químicos utilizados e os menores valores observados para o tratamento CHA.

Diferenças significativas, nas interações bloco * tempo ($p= 0,0004$) e bloco * tratamento ($p=0,01$) foram encontradas.

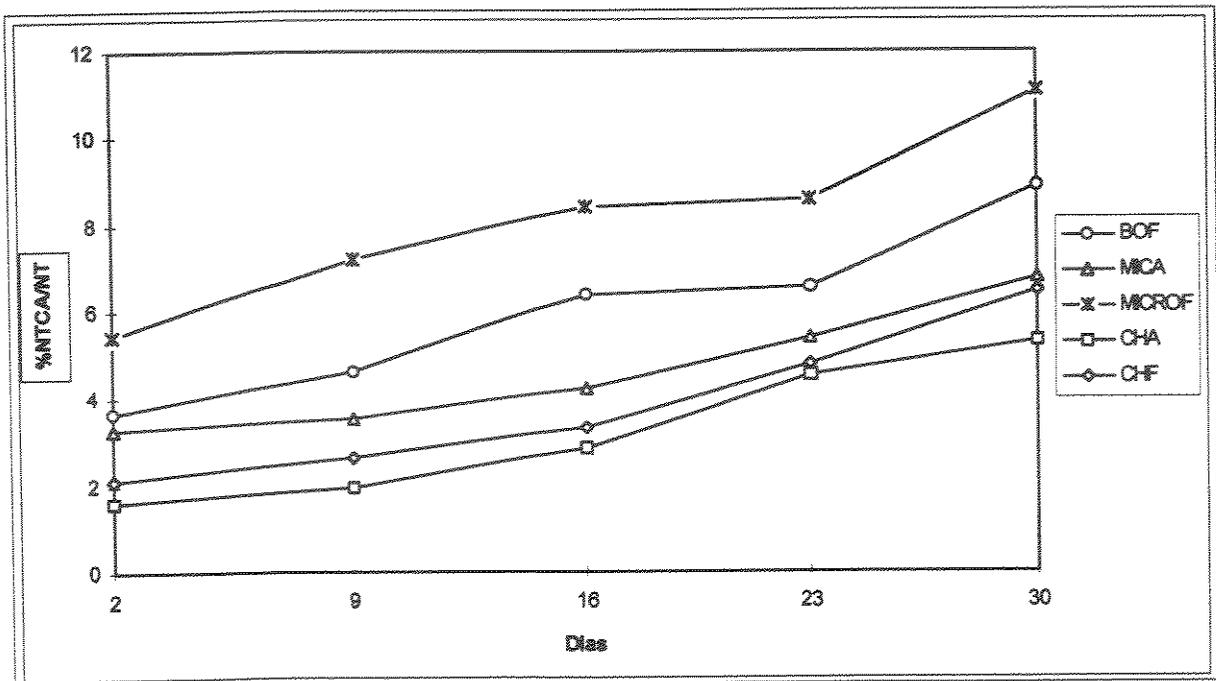


Figura 5.5.6.2 - Evolução do Nitrogênio Solúvel em TCA 12% durante armazenagem

Em concordância com as variações nos índices de N solúvel 4,6 e TCA 12%, a figura 5.5.6.3, representa a degradação relativa da caseína durante o tempo de armazenagem. Observa-se novamente, que o tratamento MICROF, foi aquele que mais degradou a caseína devido a acentuada ação proteolítica do coagulante microbiano, associada com as proteases do fermento láctico. Seguido por MICA, BOF, CHF e CHA. A degradação das caseínas refletiu-se em perda da forma física inicial e característica fundamental do queijo Minas Frescal recém fabricado, ao longo do tempo. Todos os tratamentos, onde o fermento láctico foi utilizado, mostraram perda acentuada da forma física após dezesseis dias de processamento. A ordem observada para a perda da forma física foi tratamento BOF, seguido de MICROF e CHF, após nove e dezesseis dias respectivamente.

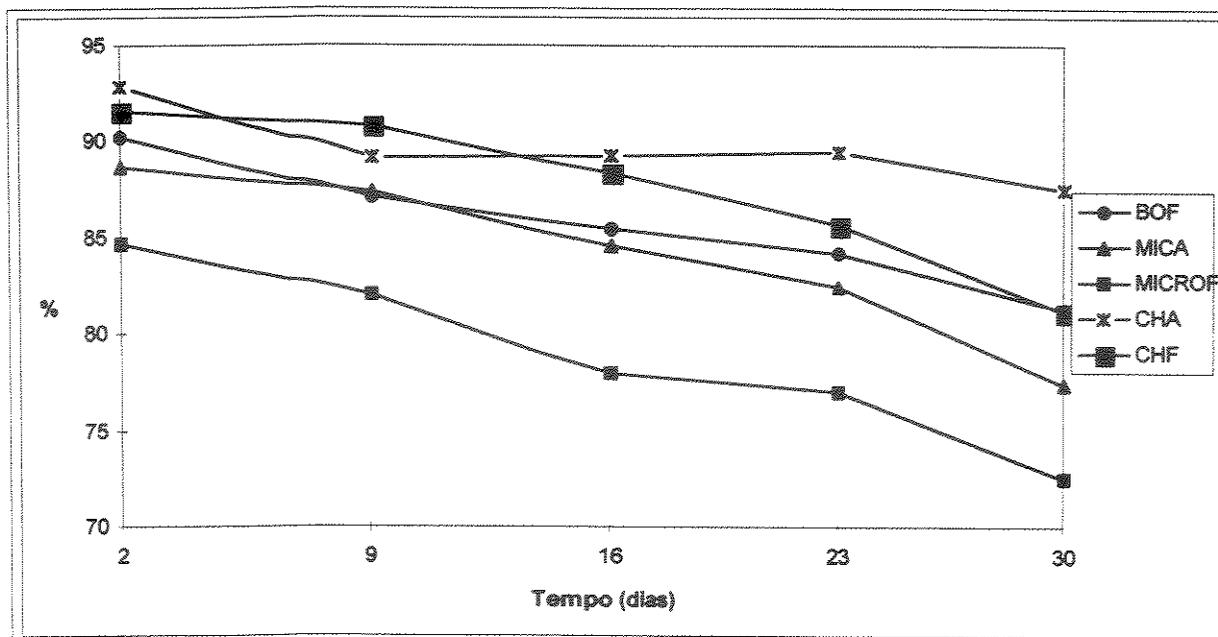


Figura 5.5.6.3 - Degradação relativa da caseína durante armazenagem (expressa em % de caseína)

Considerando as diferenças entre os valores de NS a pH 4,6/NT (Índice de extensão de Maturação), dos tratamentos MICROF e MICA (tratamentos com coagulante microbiano) e por outro lado CHF e CHA (tratamentos com coalho obtido por fermentação), pôde-se observar mais especificamente a forma de atuação do coagulante microbiano e do coalho obtido por fermentação respectivamente. A figura 5.5.6.4 compara os níveis de proteólise, descontado o efeito do fermento láctico, permitindo avaliar o quanto cada agente coagulante atuou no período de estocagem dos queijos. Observou-se uma acelerada proteólise do coagulante microbiano até o décimo sexto dia e no coalho obtido por fermentação uma proteólise mais lenta para o mesmo período, e a partir desta data, verificou-se um crescimento acentuado na atividade proteolítica. Observou-se diferença significativa nas interações bloco* tratamento ($p=0,0001$), bloco * tempo ($p=0,008$) e tratamento * tempo ($p=0,09$).

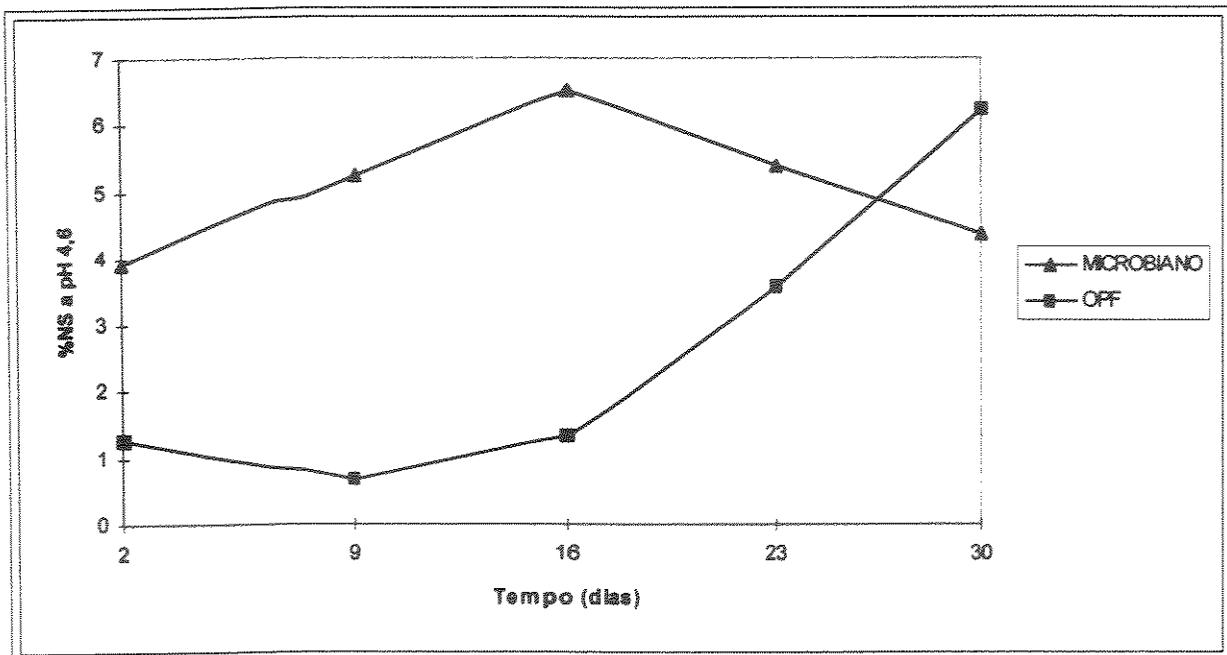


Figura 5.5.6.4 - Comparação do poder proteolizante do coalho obtido por fermentação versus coagulante microbiano. (Expresso como NS a pH 4,6/NT*100)

Da mesma forma, a diferença dos teores de NS TCA 12%/NT (Índice de profundidade de maturação), entre MICROF e MICA, assim como CHF e CHA foram representados na figura 5.5.6.5, e permitiram avaliar o papel do fermento láctico em comparação à acidificação direta, quando o coagulante microbiano e o obtido por fermentação foram utilizados. O fermento láctico se mostrou mais eficiente na degradação de peptídeos, quando associado ao coagulante microbiano. Parece ocorrer um sinergismo entre os dois agentes proteolíticos no caso do uso do coagulante microbiano, que se deve provavelmente pela maior taxa de proteólise e também pela produção de peptídeos mais favoráveis ao ataque pelo sistema enzimático do fermento láctico. Este comportamento foi observado durante todo o período de avaliação, após a fabricação dos queijos. Houve diferença significativa, nas interações bloco * tempo ($p = 0,0004$) e

bloco * tratamento (p=0,01). É importante ressaltar que esses dois indicadores químicos não são determinados de forma absoluta. Segundo KUCHROO & FOX, (1982), 44% do nitrogênio solúvel determinado a pH 4,6 é solúvel em TCA 12%, e em outro trabalho REVILLE & FOX, (1978), determinaram os níveis de Nitrogênio solúvel em Cheddar com tempo de cura de 6 meses e encontraram que $\geq 4\%$ do nitrogênio total era solúvel em TCA 12%. Este valor correspondia a 64% do nitrogênio solúvel em pH 4,6.

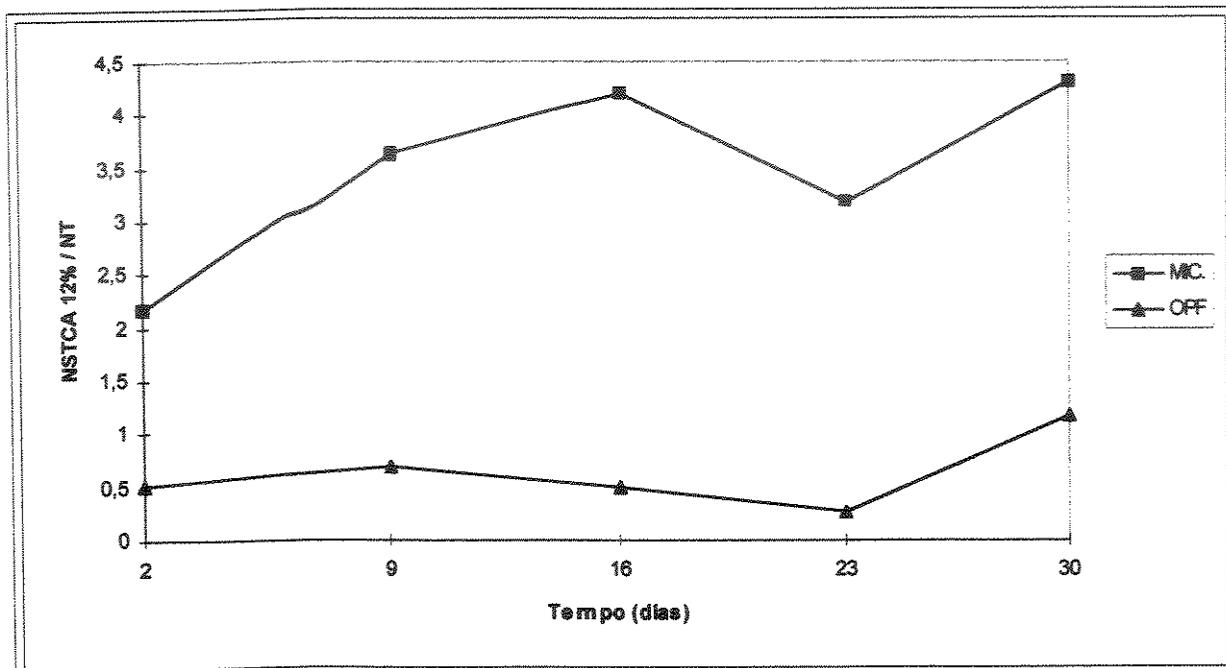


Figura 5.5.6.5 - Comparação do poder proteolizante do coalho obtido por fermentação versus coagulante microbiano.(Expresso como NSTCA/NT*100)

Apesar de não haver uma divisão absoluta entre os dois indicadores químicos, o efeito sinérgico (agente coagulante x fermento láctico) pode ser melhor observado através das figuras 5.5.6.6 e 5.5.6.7. A comparação dessas figuras reforça este efeito, quando o agente coagulante microbiano foi utilizado.

O perfil dos índices de extensão e profundidade de maturação para o coagulante microbiano é maior e principalmente apresenta a mesma tendência ao longo do tempo. Para o coalho obtido por fermentação, não ocorreu o mesmo, somente a partir do décimo sexto dia é que os níveis de Nitrogênio Solúvel, começam a ser significativamente diferentes, provavelmente pela ação das enzimas da parede celular do fermento láctico e contaminantes após lise celular.

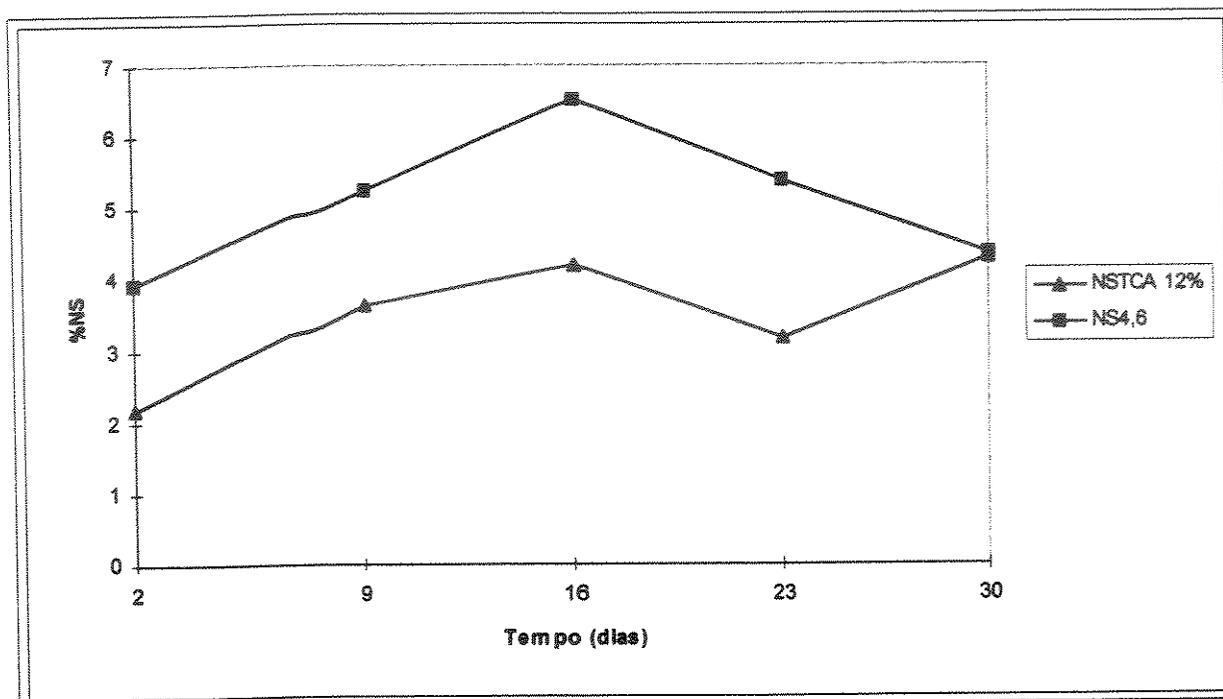


Figura 5.5.6.6 - Efeito sinérgico entre enzimas do coagulante microbiano e fermento láctico

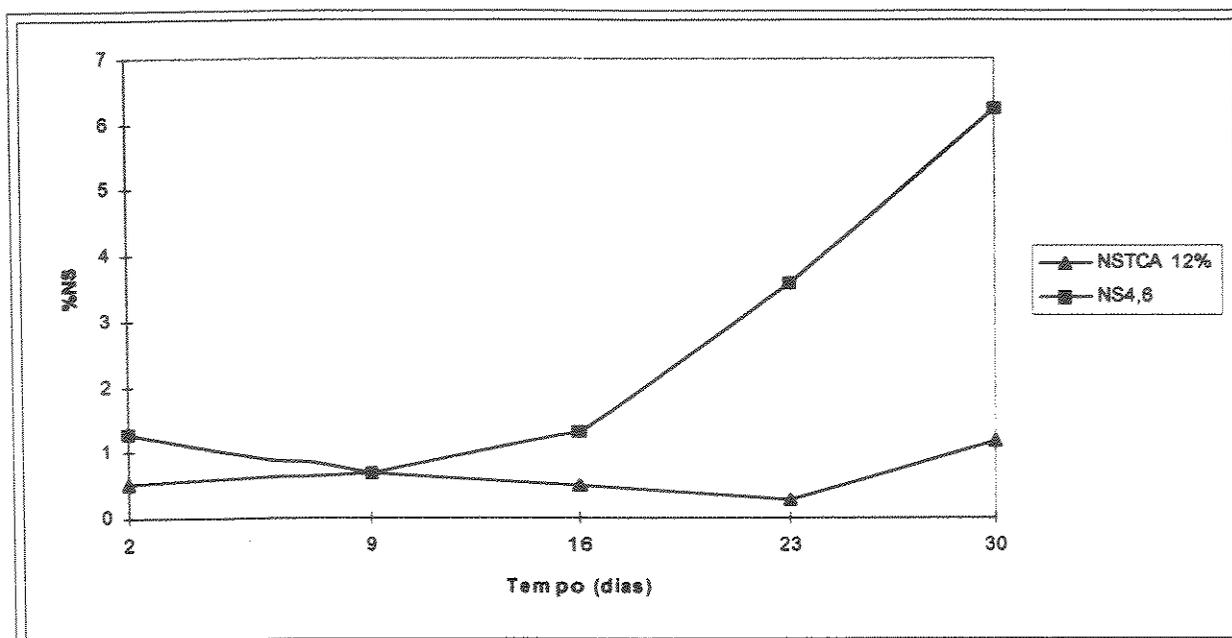


Figura 5.5.6.7 - Efeito sinérgico entre enzimas do coalho obtido por fermentação e enzimas do fermento láctico

5.7. Eletroforese

Os eletroforetogramas representam os diversos tratamentos estudados e contém amostras dos queijos preparadas após 2, 9, 16, 23 e 30 dias após a fabricação, contendo também uma banda representativa de caseinato de sódio em cada corrida. Apesar do queijo Minas Frescal ser um queijo não maturado, suas características de alta umidade propiciam condições para uma proteólise acentuada em um curto espaço de tempo, como pode ser observado através dos eletroforetogramas.

Em todas as corridas, independente do tratamento utilizado, pode-se observar a presença de γ -caseínas, mesmo no primeiro ensaio realizado após dois dias de processamento. Este fato parece associado a atuação de plasmina remanescente após o tratamento térmico inicial do leite utilizado na fabricação dos queijos conforme citado por FOX, (1988).

Entre todos os tratamentos estudados a combinação de coagulante microbiano e fermento láctico (MICROF), foi a que apresentou maior proteólise por qualquer dos indicadores estudados. No eletroforetograma da figura 5.5.7.3, podemos observar que a caseína α_{s1} diminuiu ao longo do tempo, de forma mais acentuada que os tratamentos feitos com o mesmo coagulante, porém utilizando acidificação direta (MICA), FIGURA 5.5.7.2. Observa-se também que ocorre um desdobramento da caseína α_{s1} -1, com aparecimento de pelo menos quatro bandas fortes com mobilidade eletroforética maior que a da α_{s1} . A banda correspondente a β -caseína apresentou decréscimo de intensidade ao longo do experimento. Em concordância com o observado através dos indicadores químicos de Nitrogênio Solúvel, a eletroforése para o tratamento MICROF também indicou um efeito sinérgico acentuado entre o tipo de coagulante e o fermento láctico, com o primeiro fornecendo substratos de fácil acesso às enzimas provenientes do fermento, quando comparado aos outros tratamentos. Esta possibilidade foi anteriormente colocada por TOMAS & PRITCHARD (1987). Os queijos produzidos com este tratamento foram os que perderam a forma física inicial mais rapidamente, e após 16 dias de fabricação não foi possível retirar amostras para avaliação instrumental de textura. A perda da forma física, implica em mudança acentuada da textura, sendo reflexo da proteólise avançada, e para este tipo de queijo o limite de sua vida útil, embora possa estar ainda dentro de padrões microbiológicos e legais aceitáveis. Ainda a análise das variações de pH durante o experimento, dados no quadro 5.5.8.1, mostram que a maior queda de pH foi também observada para este tratamento.

A figura 5.5.7.2 contém o eletroforetograma do tratamento MICA (coagulante microbiano e acidificação direta), onde se observou desdobramento da α_{s1} - caseína com o aparecimento da fração α_{s1} -1, porém a fração α_{s1} foi ainda significativa para queijos com 30 dias após a fabricação. A β -caseína sofreu proteólise, diminuindo ao longo do tempo, observando-se também aparecimento de alguns peptídeos com banda pouco intensa, e de mobilidade

eletroforética maior que a da α_{s1} . A ausência do fermento láctico, substituído pela acidificação direta e a diferença na intensidade de proteólise observada pelas eletroforeses do tratamento MICROF, MICA estão também refletidos na FIG.5.5.6.2, onde os valores do Nitrogênio solúvel em TCA 12%, são muito menores que os observados para MICROF.

A intensidade da proteólise para o tratamento contendo o coalho obtido por fermentação e fermento láctico (CHF) pode ser acompanhada na FIG. 5.5.7.5. Para CHF, observa-se o desdobramento praticamente total da α_{s1} -caseína, produzindo α_{s1} -1-caseína e uma banda não identificada de mobilidade eletroforética pouco menor que a da α_{s1} -caseína. O desdobramento da β -caseína e o respectivo aparecimento de uma banda de mobilidade pouco maior que a mesma, e traços de um peptídeo não identificado de grande mobilidade, foram também observados. A figura 5.5.7.4 apresenta o nível de proteólise obtido no tratamento CHA. Dentre todos os tratamentos, o CHA apresentou o menor índice de proteólise, quando os diversos indicadores foram analisados e os tratamentos comparados. Assim a eletroforése mostrou que a α_{s1} -caseína apresentou menor desdobramento, com pouca variação na intensidade ao longo do tempo. A β -caseína parece também mais intacta comparada aos outros tratamentos, observando-se traços de peptídeos de maior mobilidade que a da α_{s1} -caseína. Estes resultados estão em concordância com os observados para os valores de Nitrogênio solúvel analisados. Os menores valores de N solúvel a pH 4,6 e TCA 12%, (FIG. 5.5.6.1 e FIG. 5.5.6.2) respectivamente, foram observados para este tratamento, ao longo do tempo e entre as diversas combinações estudadas.

O queijo processado para ser o controle, com coalho bovino e fermento láctico (BOF), mostrou um padrão eletroforético, (FIG. 5.5.7.1), onde a α_{s1} -caseína foi nitidamente proteolisada com o tempo, praticamente desaparecendo a partir de 16 dias. Observou-se o aparecimento intenso da fração α_{s1} -1-

caseína. A β -caseína também apresentou proteólise com decréscimo perceptível durante o experimento. Duas bandas não identificadas, uma logo após β -caseína e outra com mobilidade pouco menor que a fração α_{s1} -1 - caseína, apareceram claramente inclusive com dois dias de fabricação. Observou-se também uma banda com mobilidade eletroforética maior que α_{s1} -1 - caseína e apresentando quantidades crescentes durante o tempo de duração do experimento. Com relação aos índices químicos, Nitrogênio Solúvel a pH 4,6 Fig 5.5.6.1 é intermediário entre os obtidos para o coalho obtido por fermentação e coagulante microbiano. Por outro lado, o Nitrogênio Solúvel em TCA12% somente é inferior aos valores obtidos por MICROF, (FIG. 5.5.6.2).

Os resultados do Nitrogênio solúvel a pH 4,6 associados a intensidade de proteólise do agente coagulante, mostraram a seguinte ordem de intensidade de proteólise: coagulante obtido por fermentação menos proteolítico que o coagulante bovino que por sua vez apresentou menor proteólise em comparação ao coagulante microbiano.

Considerando a manutenção da integridade física dos queijos entre os diversos tratamentos, aqueles produzidos com coalho microbiano e fermento (MICROF), bovino com fermento (BOF) e obtido por fermentação e fermento (CHF) perderam sua forma física nos primeiros quinze dias de experimento, restando somente os acidificados diretamente até o fim do experimento.

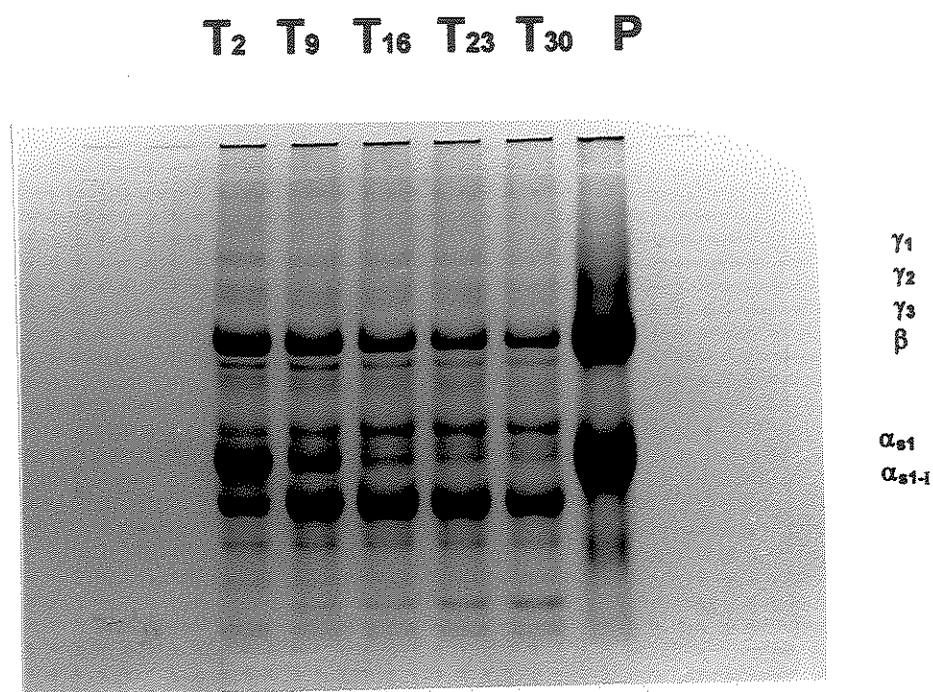


Figura 5.5.7.1. Eletroforetograma em PAGE / uréia para BOF- Coalho bovino e fermento láctico (T₂, T₉, T₁₆, T₂₃ e T₃₀ dias após o processamento, P - Padrão Caseinato de Sódio).

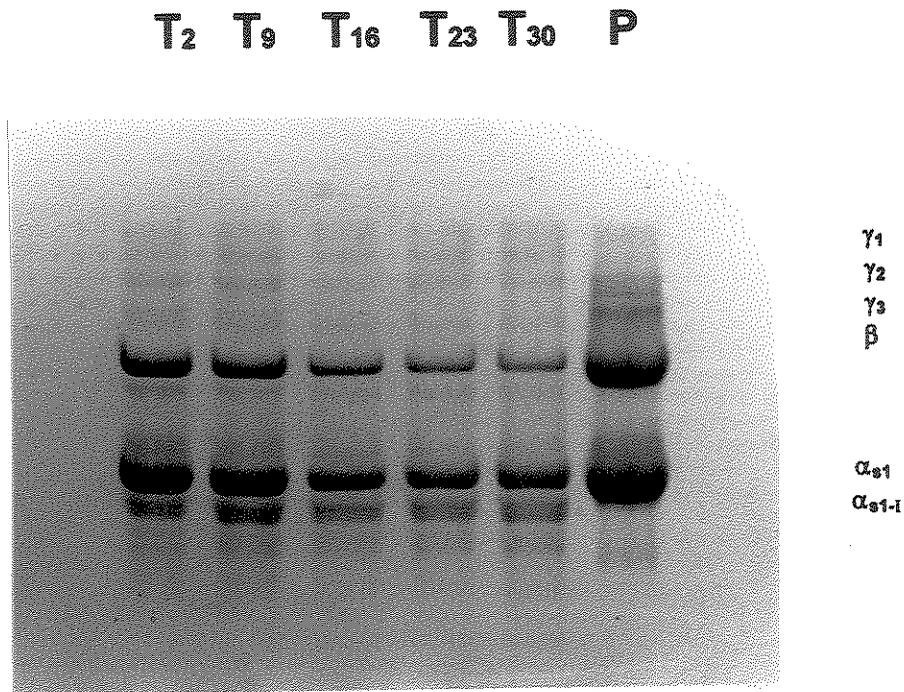


Figura 5.5.7.2. Eletroforetograma em PAGE / uréia para MICA. Coagulante microbiano e ácido láctico (T₂, T₉, T₁₆, T₂₃ e T₃₀ dias após o processamento, P - Padrão Caseinato de Sódio).

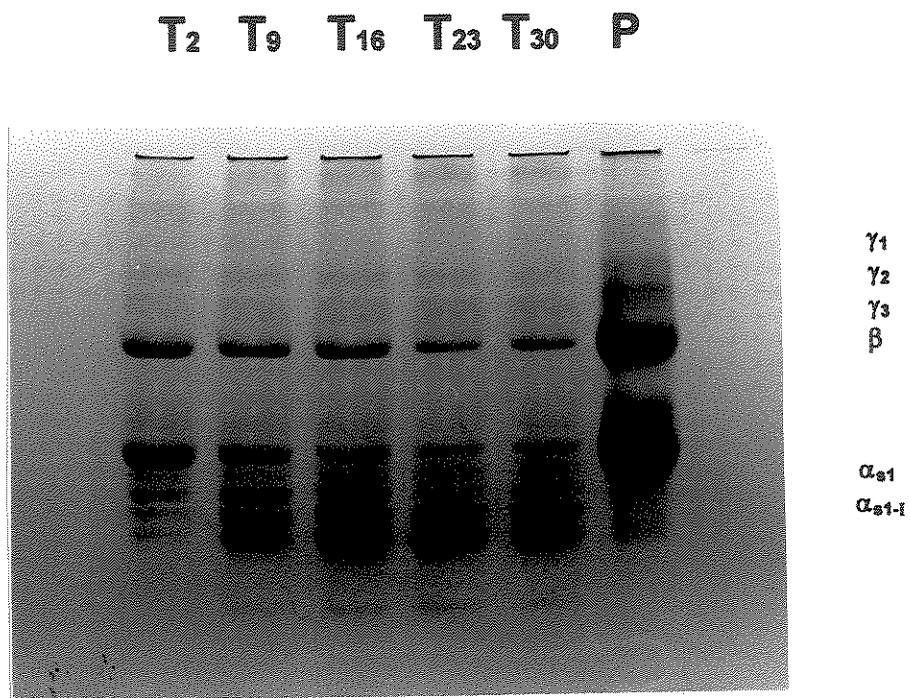


Figura 5.5.7.3. Eletroforetograma em PAGE / uréia para MICROF-Coagulante microbiano e fermento láctico (T₂, T₉, T₁₆, T₂₃ e T₃₀ dias após o processamento, P - Padrão Caseinato de Sódio).

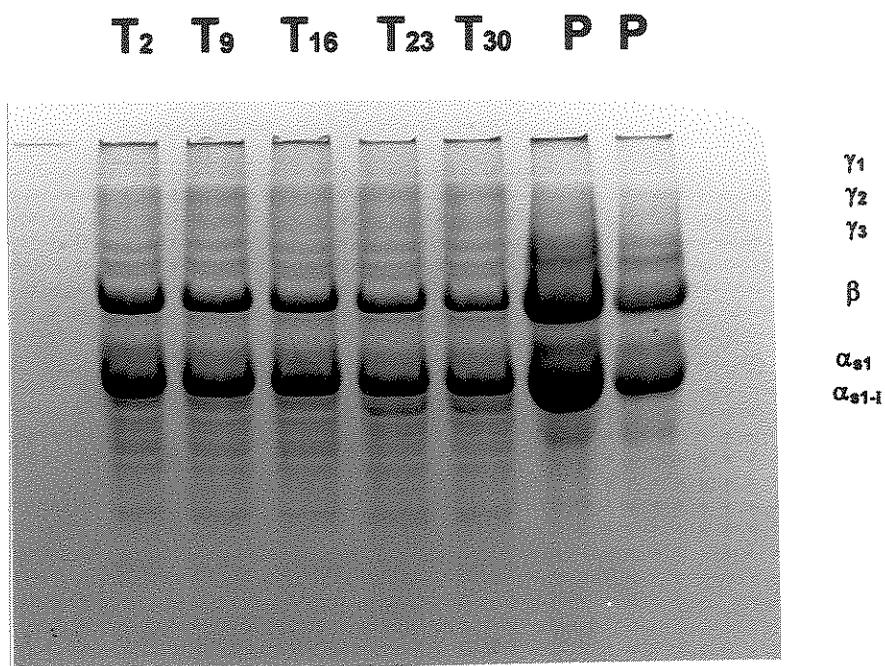


Figura 5.5.7.4. Eletroforetograma em PAGE / uréia para CHA- Coalho obtido por fermentação e ácido láctico (T₂, T₉, T₁₆, T₂₃ e T₃₀ dias após o processamento, P - Padrão Caseinato de Sódio).

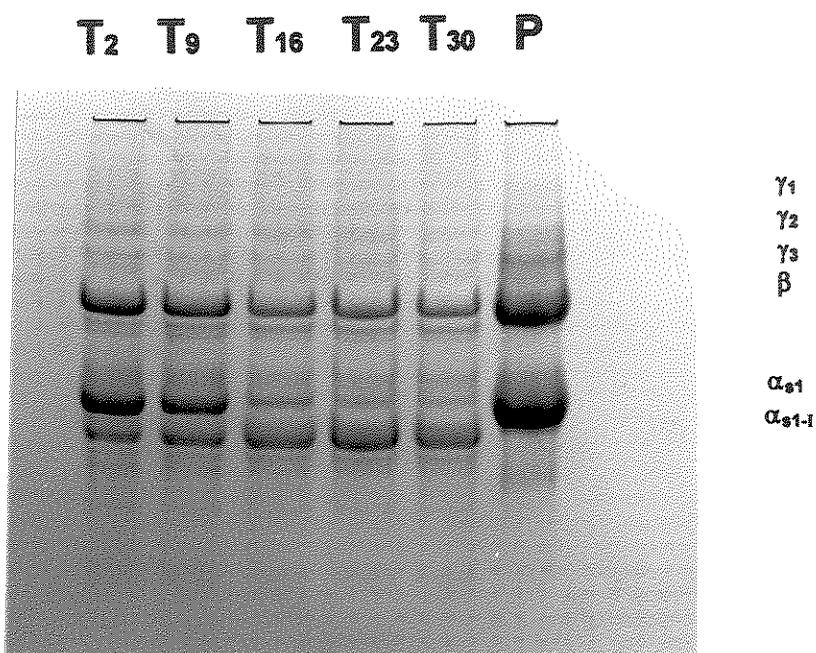


Figura 5.5.7.1. Eletroforetograma em PAGE / uréia para CHF- Coalho obtido por fermentação e fermento láctico (T₂, T₉, T₁₆, T₂₃ e T₃₀ dias após o processamento, P - Padrão Caseinato de Sódio).

5.8. Evolução do pH

Os resultados observados na FIG. 5.5.8.1, mostraram que todos os tratamentos onde o ácido láctico foi utilizado, os valores de pH foram sempre superiores.

Trabalhos anteriores, (WOLFSHCOON-POMBO, 1980; BONASSI,1978; ISEPON & OLIVEIRA, 1995 e VAN DENDER, 1995), demonstraram que a utilização do fermento láctico provoca uma maior dessoragem do queijo, durante o período de estocagem. À medida que o queijo vai se tornando mais ácido, pela atuação das bactérias lácticas, ocorre abaixamento do pH, o que provoca uma maior desmineralização protéica do produto, e conseqüentemente maior dessoragem espontânea. Isso sugere, um abaixamento da atividade de água do produto e um menor crescimento microbiano da flora contaminante. Associado ao abaixamento da atividade de água, a queda do pH, foi determinante, na inibição dos contaminantes microbianos dos queijos como pôde ser observado nas determinações microbiológicas efetuadas neste experimento.

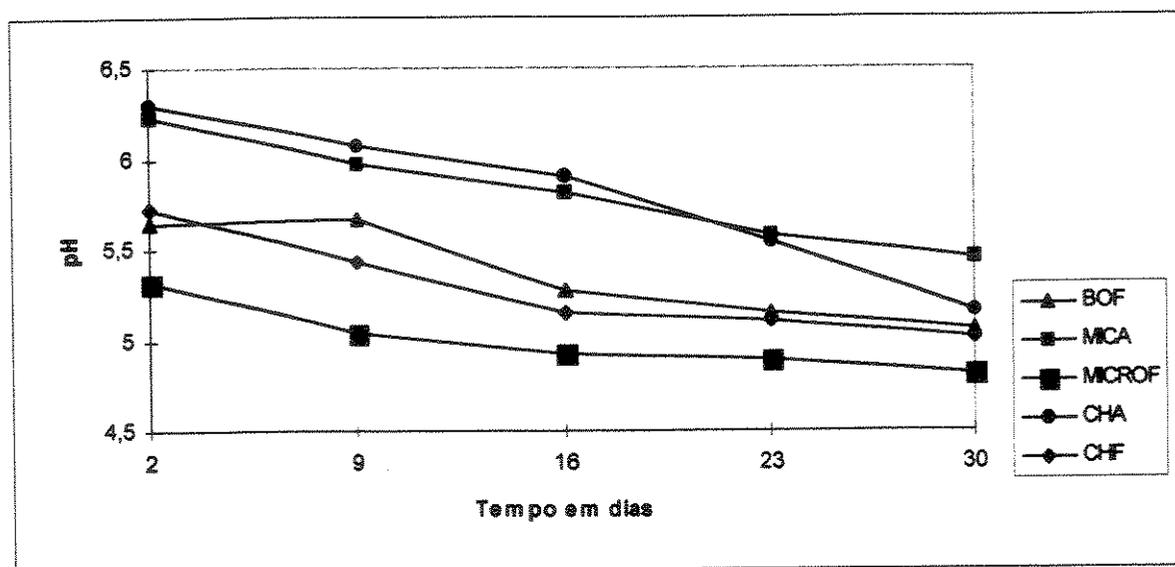


FIGURA 5.5.8.1- EVOLUÇÃO DO pH DURANTE A ESTOCAGEM

A acidificação, causada pelo fermento láctico, pode intensificar a deterioração do Minas Frescal no mercado. Este fato foi comprovado neste experimento, uma vez que os tratamentos nos quais utilizamos cultura láctica, obtiveram acentuada proteólise com conseqüente amolecimento e perda da estrutura inicial do queijo.

5.9. Perda de soro durante estocagem

A avaliação da perda de soro no queijo Minas Frescal durante o processamento e estocagem apresenta dois aspectos importantes. O primeiro diz respeito à qualidade aparente do queijo e o nível de satisfação do consumidor, pela presença de grande quantidade de soro na embalagem. O segundo é uma questão de ordem econômica, onde o peso do soro está incluído no preço do produto final.

A análise estatística dos resultados demonstrou que os diversos tratamentos no tempo não diferiram significativamente ($P=0,46$). Fisicamente, este resultado indicou, que os diversos tratamentos tendem a dessorar na mesma intensidade no tempo. Por outro lado, a análise estatística mostrou diferenças significativas nas interações Bloco* tempo, ($p=0,01$) e Bloco*Tratamento ($p=0,01$). Isto significa que o comportamento da dessoragem foi diferente em cada repetição, e para cada tratamento em cada repetição individualizada.

A FIG. 5.5.9.1 representa os valores relativos da perda de soro ao longo do tempo de estocagem. Apesar dos perfis observados entre os tratamentos terem mostrado diferença, a análise estatística empregada na avaliação não mostrou diferença significativa. Isto se deve ao fato do modelo analisar o comportamento ao longo do tempo e não pontualmente. Esses resultados devem ser considerados cuidadosamente. As limitações na avaliação deste

parâmetro estão ligadas basicamente às características de fabricação, características da alta umidade do produto, dificuldade de manter peso constante do queijo em cada forma e da própria metodologia empregada para mensuração, o que pode comprometer os resultados da análise estatística.

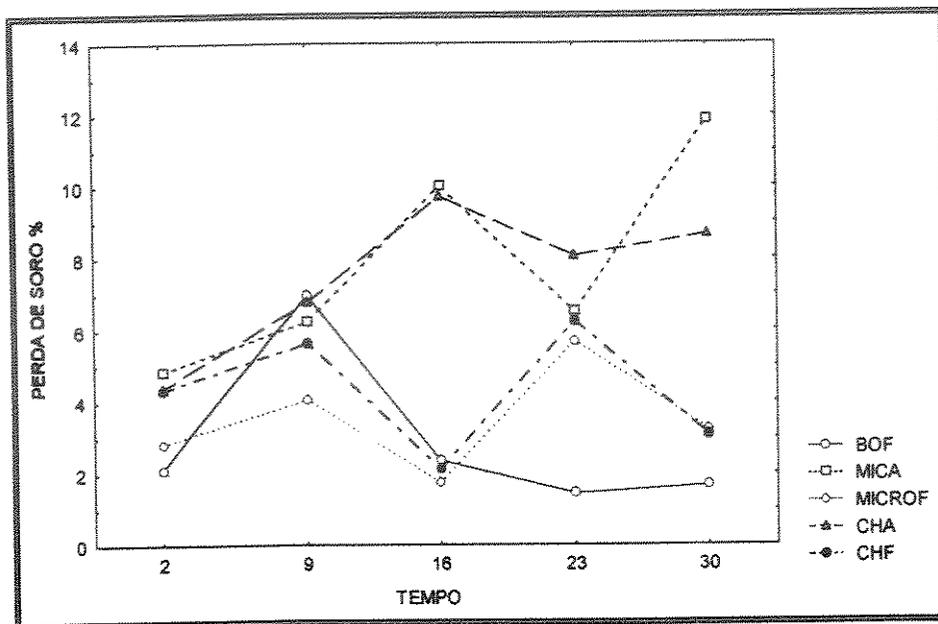


Figura - 5.5.9.1- Média da perda de soro dos diversos tratamentos no tempo.

5.10. Avaliação sensorial

Os testes sensoriais realizados neste trabalho, foram efetuados para: primeiramente avaliar se o queijo produzido com coalho obtido por fermentação possui as mesmas características sensoriais que os queijos convencionalmente produzidos com coalho bovino e coagulante microbiano e, avaliar o comportamento de vida de prateleira do queijo fabricado com coalho obtido por fermentação frente aos coalhos e coagulantes concorrentes, encontrados no mercado e citados anteriormente.

A TABELA 5.5.10.1 contém os resultados obtidos na avaliação sensorial de textura. Em geral os queijos produzidos com fermento láctico apresentam maior perda de textura avaliada sensorialmente. Estes resultados são concordantes com a observação visual da textura dos queijos, onde os tratamentos contendo fermento láctico perderam a forma original característica em dezesseis dias. O teste originalmente programado para avaliação sensorial dos produtos fabricados neste estudo era de trinta dias de duração, seguindo os mesmos dias para as determinações físico-químicas e de eletroforese, porém o mesmo foi encerrado com apenas dezesseis dias devido a perda de textura supracitada, para os tratamentos com fermento láctico assim como, pela contaminação por Bolores e leveduras, observada para os tratamentos com acidificação direta, muito embora, os queijos estivessem dentro dos limites dos padrões microbiológicos legais estabelecidos.

TABELA 5.5.10.1 - AVALIAÇÃO SENSORIAL da TEXTURA

DIA/TRAT.	BOF	MICROF	MICA	CHF	CHA
1	7,0 ^{A,a,b}	7,6 ^{A,a}	6,4 ^{A,b}	7,4 ^{A,a,b}	7,1 ^{A,a,b}
2	5,9 ^{B,b}	7,3 ^{A,a}	6,9 ^{A,a,b}	6,0 ^{B,b}	6,9 ^{A,a,b}
3	MOLE	7,1 ^{A,a}	7,0 ^{A,a}	5,2 ^{B,b}	7,0 ^{A,a}

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

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

A avaliação da aparência (TABELA 5.5.10.2), apresentou a mesma ordem de aceitação entre os tratamentos como a observada na avaliação da textura. As menores médias de aparência foram dadas aos queijos mais moles BOF e CHF, respectivamente.

TABELA 5.5.10.2 - AVALIAÇÃO SENSORIAL da APARÊNCIA

DIA/TRAT.	BOF	MICROF	MICA	CHF	CHA
1	7,4 ^{A,a}	6,9 ^{B,a}	7,2 ^{A,B,a}	7,2 ^{A,a}	6,8 ^{A,a}
2	4,9 ^{B,b}	7,3 ^{A,B,a}	6,7 ^{B,a}	5,7 ^{B,b}	7,2 ^{A,a}
3	1,7 ^{C,c}	7,8 ^{A,a}	7,8 ^{A,a}	4,8 ^{B,b}	7,5 ^{A,a}

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

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

A avaliação hedônica global é apresentada na TABELA 5.5.10.3. Quando os tratamentos são analisados individualmente, somente CHF e CHA mostram diferença significativa na terceira semana após a fabricação. Quando os diferentes tratamentos foram comparados CHF e CHA, apresentaram diferenças significativas já a partir da segunda semana após o processamento. O tratamento MICA, apesar de não ter a melhor avaliação inicial, foi o que apresentou menor variação entre as notas, durante as três semanas de avaliação.

TABELA 5.5.10.3 - AVALIAÇÃO SENSORIAL HEDÔNICA GLOBAL

DIA/TRAT.	BOF	MICROF	MICA	CHF	CHA
1	6,3 ^{A,a}	7,1 ^{A,a}	6,8 ^{A,a}	7,1 ^{A,a}	6,9 ^{A,a}
2	5,8 ^{A,a}	6,6 ^{A,a}	6,5 ^{A,a}	5,9 ^{B,a}	6,2 ^{A,B,a}
3	MOLE	6,6 ^{A,a}	6,7 ^{A,a}	5,5 ^{B,b}	6,0 ^{B,a,b}

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

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

Considerando que o queijo Minas Frescal é um queijo de alta umidade, que deve ser consumido fresco, em um tempo menor do que o oficialmente permitido, era esperado o aparecimento de sabores estranhos durante as avaliações sensoriais. Entre os defeitos de sabores estranhos o surgimento do defeito "sabor amargo" em queijos, está relacionado com a proteólise e liberação de peptídeos de baixo peso molecular, assim como sua hidrofobicidade e presença de proteases microbianas e inespecificidade do agente coagulante, alta atividade proteolítica da renina, acumulação de polipeptídeos e ainda inabilidade de algumas proteases microbianas de agirem sobre polipeptídeos (CZULAK,1959, STADHHOUDERS et al, 1971).

O levantamento de termos relativos ao sabor residual, foi realizado durante os testes sensoriais, os dados foram avaliados e os resultados "qualitativos" encontram-se no ANEXO 3.

A avaliação do sabor está representada na tabela 5.5.10.4. Pode-se observar que nenhum dos tratamentos apresentou diferenças significativas ao longo das três semanas de teste, quando comparados individualmente. Porém os tratamentos CHF e CHA diferiram significativamente dos demais tratamentos à partir da segunda semana. Novamente o tratamento MICA foi o que apresentou menor variação nas notas entre o início e final dos testes.

TABELA 5.5.10.4 - AVALIAÇÃO SENSORIAL DO SABOR

DIA/TRAT.	BOF	MICROF	MICA	CHF	CHA
1	6,2 ^{A,a}	7,1 ^{A,a}	6,9 ^{A,a}	7,0 ^{A,a}	7,1 ^{A,a}
2	5,7 ^{A,a}	6,6 ^{A,a}	6,6 ^{A,a}	5,5 ^{B,a}	5,8 ^{B,a}
3		6,4 ^{A,a}	6,5 ^{A,a}	5,8 ^{B,a}	5,9 ^{B,a}

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

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

A TABELA 5.5.10.5 apresenta o percentual das observações qualitativas concernentes a presença de sabor amargo. Ela representa o percentual dos provadores que indicaram sabor "AMARGO". Os tratamentos CHF e CHA foram os que apresentaram maior crescimento na percentagem do referido atributo ao longo do tempo.

TABELA 5.5.10.5 - PERCENTUAL DE OBSERVAÇÕES SOBRE SABOR AMARGO.

DIA/TRAT.	BOF	MICROF	MICA	CHF	CHA
1	12%	10%	7%	7%	5%
2	9%	16%	9%	35%	23%
3	-	16%	11%	29%	29%

Nas tabelas, as datas 1, 2 e 3 são referentes ao 2º, 9º e 16º dias de produção.

5.11. Avaliação microbiológica

As avaliações microbiológicas realizadas no experimento para o leite utilizado nos processamentos, são apresentadas na Tabela 5.5.11.1. Verificou-se um maior número de microorganismos no leite nos tanques de fabricação, o que demonstra um aumento da carga microbiana inicial em função do manuseio, assim como, pelo tempo de estocagem sob refrigeração após a pasteurização. O resultado das contagens do leite nos tanques de processamento, independente do queijo produzido, foram semelhantes, para todos os indicadores.

As tabelas 5.5.11.1, 5.5.11.2, 5.5.11.3, apresentam os valores das contagens totais (C.T.), contagem de coliformes totais, coliformes fecais e bolores e leveduras (B. L.), para todos os tratamentos.

TABELA - 5.5.11.1 - Resultados microbiológicos do leite utilizado no processamento.

Contagem Total, Contagem de coliformes totais e fecais do leite no pasteurizador e tanques de produção

Amostra	C.T.Ufc/g	NMP C. T.	NMP C.F.
LP	$4,0 \times 10^3$	11/g	< 3/g
LT (MICA)	$8,3 \times 10^3$	20/g	< 3/g
LT (BOF)	$8,3 \times 10^3$	9/g	< 3/g
LT (CHF)	$7,5 \times 10^3$	<3/g	< 3/g
LT (MICROF)	$7,3 \times 10^3$	9/g	< 3/g
LT (CHA)	$8,0 \times 10^3$	4/g	< 3/g

*LP- Leite no pasteurizador

**LT- Leite nos tanques de processamento.

As tabelas 5.5.11.2 e 5.5.11.3 apresentam os resultados das determinações microbiológicas dos queijos após três e trinta dias de produção, respectivamente. Embora, tenha havido crescimento microbiano durante a estocagem, observou-se sempre maiores contagens, para os queijos produzidos com acidificação direta. A utilização do fermento láctico funciona como um inibidor da flora contaminante. Fica evidente que ocorrendo uma contaminação, a mesma se desenvolve mais facilmente no queijos sem fermento láctico. Tal fato é importante, pois a maioria dos queijos frescos fabricados hoje no país é feita com a utilização do ácido láctico diretamente no leite, o que pode trazer sérios problemas se os devidos cuidados acerca da produção, não forem satisfatórios. Uma vez, suprimida a flora do fermento láctico e ocorrendo uma contaminação microbiana elevada, os possíveis contaminantes não encontrarão a competição oferecida pelas bactérias do fermento láctico, podendo desta forma desenvolver defeitos nos referidos queijos.

TABELA - 5.5.11.2 - Resultados microbiológicos dos queijos na primeira semana.

Contagem global, Contagem de Coliformes Totais e Fecais nos queijos primeira semana

Amostra	C.T.Ufc/g	NMP C. T.	NMP C.F.	B. L.Ufc/g
MICA	$5,6 \times 10^6$ *	1100/g	4/g	$1,2 \times 10^5$
BOF	$3,2 \times 10^8$	210/g	< 3/g	$< 10^4$ *
CHF	$3,1 \times 10^8$	28/g	< 3/g	$9,0 \times 10^4$
MICROF	$4,4 \times 10^7$	23/g	< 3/g	$< 10^4$
CHA	$5,3 \times 10^8$ *	1100/g	7/g	$1,9 \times 10^5$

* Valores Estimados.

Cabe ressaltar que apesar das modificações funcionais de textura observada e do crescimento de microorganismos, em todos os indicadores utilizados, estes valores ainda foram inferiores aos estabelecidos pela legislação para queijos tipo frescos.

TABELA - 5.5.11.3 - Resultados microbiológicos dos queijos na última semana.

Contagens dos queijos na última semana				
Amostra	C.T.Ufc/g	NMP C. T.	NMP C.F.	B. L.Ufc/g
MICA	$2,4 \times 10^7$	>1100/g	9/g	$3,1 \times 10^5$
BOF	$2,5 \times 10^8$ *	460/g	9/g	$2,0 \times 10^3$
CHF	$5,2 \times 10^8$	460/g	< 3/g	60 *
MICROF	$3,7 \times 10^8$	93/g	9/g	$4,1 \times 10^2$
CHA	$3,5 \times 10^7$ *	>1100/g	4/g	$1,9 \times 10^7$ *

*Valores estimados.

5.12 . Avaliação da cor

As tabelas 5.5.12.1, 5.5.12.2, 5.5.12.3, 5.5.12.4 e 5.5.12.5, contêm os resultados médios dos valores de L, a, b, das repetições dos diferentes tratamentos estudados.

A avaliação estatística destes resultados mostrou não existir diferenças significativas entre os tratamentos e repetições.

Instrumentalmente não foram observadas diferenças significativas no amarelamento da casca do queijo quando o fermento e acidificação direta foram utilizados na produção dos queijos. Estes resultados estão em concordância com a avaliação sensorial.

TABELA 5.5.12.1 DETERMINAÇÃO INSTRUMENTAL DA COR -TRATAMENTO BOF

TEMPO	COR	L		MÉDIA	DP
2	90,57	91,43	93,93	91,98	1,75
9	90,13	92,09	91,88	91,37	1,08
16	90,13	91,21	91,67	91,00	0,79
23	87,40	91,47	91,67	90,18	2,41
30	90,13	79,00	92,34	87,16	7,15
TEMPO	COR	a		MÉDIA	DP
2	0,83	-2,74	-2,67	-1,53	2,04
9	0,85	-2,67	0,66	-0,39	1,98
16	0,85	-2,85	-0,10	-0,70	1,92
23	1,08	-2,48	-0,10	-0,50	1,81
30	0,85	-3,25	0,70	-0,57	2,33
TEMPO	COR	b		MÉDIA	DP
2	24,55	12,38	11,30	16,08	7,36
9	23,22	12,86	12,38	16,15	6,12
16	23,22	13,37	12,86	16,48	5,84
23	26,13	11,86	13,37	17,12	7,84
30	24,25	14,18	11,86	16,76	6,59

TABELA 5.5.12.2. DETERMINAÇÃO INSTRUMENTAL DA COR -TRATAMENTO MICA

TEMPO	COR	L		MÉDIA	DP
2	91,88	92,61	93,6	92,70	0,86
9	91,67	80,65	94,74	89,02	7,41
16	91,67	92,53	92,53	92,24	0,50
23	92,34	91,86	91,86	92,02	0,28
30	91,36	92,62	92,62	92,20	0,73

TEMPO	COR	a		MÉDIA	DP
2	0,66	-2,89	-2,81	-1,68	2,03
9	-0,1	-2,83	-2,8	-1,91	1,57
16	-0,1	-3,07	-3,07	-2,08	1,71
23	0,7	-2,88	-2,88	-1,69	2,07
30	1,08	-3,01	-3,01	-1,65	2,36

TEMPO	COR	b		MÉDIA	DP
2	21,49	12,2	11,09	14,93	5,71
9	21,74	12,55	12,1	15,46	5,44
16	21,74	12,88	12,88	15,83	5,12
23	22,53	12,25	12,25	15,68	5,94
30	24,02	12,97	12,97	16,65	6,38

TABELA 5.5.12.3. DETERMINAÇÃO INSTRUMENTAL DA COR -TRATAMENTO MICROF

TEMPO	COR	L		MÉDIA	DP
2	86,37	92,48	92,96	90,60	3,67
9	87,87	90,95	92,06	90,29	2,17
16	87,87	89,47	92,94	90,09	2,59
23	89,98	88,67	92,95	90,53	2,19
30	87,87	89,23	92,96	90,02	2,64

TEMPO	COR	a		MÉDIA	DP
2	0,3	-2,7	-2,36	-1,59	1,64
9	2,17	-2,85	-3,36	-1,35	3,06
16	2,17	-3,3	-2,36	-1,16	2,92
23	1,74	-3,49	-2,36	-1,37	2,75
30	2,17	-3,51	-2,36	-1,23	3,00

TEMPO	COR	b		MÉDIA	DP
2	30,6	12,41	11,88	18,30	10,66
9	28,83	13,6	17,09	19,84	7,98
16	28,83	14,64	11,88	18,45	9,09
23	25,03	14,92	11,88	17,28	6,88
30	28,83	15,3	11,88	18,67	8,96

TABELA 5.5.12.4. DETERMINAÇÃO INSTRUMENTAL DA COR -TRATAMENTO CHA

TEMPO	COR	L		MÉDIA	DP
2	92,59	92,42	94,14	93,05	0,95
9	91,76	91,7	93,84	92,43	1,22
16	91,72	92,37	93,84	92,64	1,09
23	92,02	92,54	93,84	92,80	0,94
30	87,84	91,19	93,84	90,96	3,01
TEMPO	COR	a			
2	-0,02	-2,91	-2,59	-1,84	1,58
9	0,4	-2,39	-2,83	-1,61	1,75
16	0,25	-2,94	-2,83	-1,84	1,81
23	0,81	-3,1	-2,83	-1,71	2,18
30	1,27	-3,37	-2,83	-1,64	2,54
TEMPO	COR	b			
2	20,2	11,51	10,5	14,07	5,33
9	22,11	12,21	12,08	15,47	5,75
16	20,32	12,53	10,5	14,45	5,18
23	21,51	13,26	10,5	15,09	5,73
30	29,13	14,25	10,5	17,96	9,85

TABELA 5.5.12.5. DETERMINAÇÃO INSTRUMENTAL DA COR -TRATAMENTO CHF

TEMPO	COR	L		MÉDIA	DP
2	88,46	92,00	93,43	91,30	2,56
9	88,46	91,52	93,20	91,06	2,40
16	89,80	92,32	93,43	91,85	1,86
23	90,34	91,49	93,43	91,75	1,56
30	92,32	90,71	93,43	92,15	1,37
TEMPO	COR	a			
2	1,56	-2,69	-2,64	-1,26	2,44
9	1,56	-2,77	-2,49	-1,23	2,42
16	1,07	-2,92	-2,49	-1,45	2,19
23	1,52	-2,73	-2,49	-1,23	2,39
30	1,12	-3,31	-2,49	-1,56	2,36
TEMPO	COR	b			
2	27,97	11,81	11,27	17,02	9,49
9	27,97	12,50	11,27	17,25	9,31
16	26,17	11,88	11,27	16,44	8,43
23	24,55	12,20	11,27	16,01	7,41
30	19,95	13,73	11,27	14,98	4,47

5.13. Análise instrumental de Textura

Para efeito de ilustração, o Anexo 4 contém resultados de alguns valores das determinações instrumentais de textura, para todos os tratamentos, realizadas durante o experimento. Os resultados obtidos apresentam um comportamento não consistente com a observação visual e sensorial de textura. Os coeficientes de variação para os parâmetros avaliados instrumentalmente foram extremamente altos. Estas variações foram conseqüências das características do queijo Minas Frescal, ou seja, o produto apresenta excesso de olhaduras mecânicas, excesso de umidade, massa não compacta, heterogênea e frágil que interferem nos resultados das análises TPA..

6.0. Conclusões

1. As variações entre os rendimentos de produção e cifras de transição de elementos do leite para o queijo nos tratamentos estudados, não apresentaram diferenças significativas. ($p < 0,05$).
2. Durante o período de comercialização do produto (30 dias) há uma aumento progressivo dos teores de Nitrogênio solúvel em pH 4,6 e TCA12%. Os índices de NS a 4,6/NT sempre foram maiores para os queijos obtidos com coagulante microbiano e fermento láctico (MICROF), seguido por coagulante microbiano com ácido láctico (MICA), coalho bovino com fermento (BOF), coalho obtido por fermentação com fermento láctico (CHF) e finalmente por coalho obtido por fermentação e ácido láctico (CHA).
3. Nos resultados da eletroforése , dentre os tratamentos estudados, o MICROF, nitidamente mostrou a quantidade mais acentuada de proteólise, que se traduziu pelo maior número de bandas observadas. Os resultados das determinações eletroforéticas segue a mesma ordem para os indicadores químicos, havendo degradação da caseína α_{s1} e β -caseína, com menor intensidade para CHA.
4. Na avaliação sensorial, houve um decréscimo na aceitação dos produtos em geral, porém com maior índice de julgamentos com sabor residual "amargo" para os queijos obtidos com coalho obtido por fermentação (CHA, CHF).
5. O tempo de vida útil do queijo neste estudo foi determinado pela sua textura aparente que foi determinante no julgamento na avaliação sensorial, assim como na retirada de amostra para análise de textura instrumental. Dezesesseis dias foi o limite aceitável para os queijos com fermento láctico. Os queijos

produzidos com acidificação via fermento láctico perderam sua forma característica original neste prazo.

6. A acidificação direta se mostra a primeira vista, como uma boa solução para os problemas de conservação do produto (textura firme, manutenção da forma física), porém o produto obtido com acidificação direta é mais suscetível ao aparecimento de defeitos de ordem microbiológica, pois não possui a resistência oferecida pelo fermento láctico às contaminações.

7. Devido às características do produto em estudo, fica inviável o uso do perfil de análise de textura (TPA). O excesso de umidade, massa não tanto coesa, presença de olhaduras mecânicas invalidam este teste para o queijo Minas Frescal.

7. BIBLIOGRAFIA:

ALAIS, C. Science du Lait, 2ª Edição. Chimia, 28, 597-604, 1974.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC international, Washington, 16th Edição. 1995.

ATHERTON, H.V. Chemistry and testing of dairy products. 4. ed. Westport: AVI, 1981, 396p.

BANKS, J. M. ; BANKS, W.; MUIR, D.D.; WILSON, A. G. Cheese yield: composition does matter. Dairy Industrial International, London, v.46, n.5, p.15-22, May. 1981.

BANKS, J. M. Yield and quality of Cheddar cheese produced using a fermentation-derived calf chymosin. Milchwissenschaft, München, v. 47, n.3 p.153-156. 1992.

BARBANO, D. M. ; RASMUSSEN, R. R. Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. Journal of Dairy Science, Champaign, 75: 1-12, 1992.

BARBANO, D.M.; SHERBON, J.W. Cheddar cheese yields in New York. Journal of Dairy Science, Champaign, v.67, p.1873-1883, 1984.

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

- BONASSI, J. A. Influência de algumas espécies de bactérias lácticas na elaboração do queijo Minas. Botucatu, F.C.A.B./UNESP, 1979. 133p. (Tese- Livre Docência - Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, 1979.)
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal-RIISPOA. BRASÍLIA, 1980. 116p.
- BROOME, M. C.; HICKEY, M. W. Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in cheddar cheese. Australian Journal of Dairy Technology, Highett: 53-59, 1990.
- BYNUM, D.G.; BARBANO, D. M. Whole milk reverse osmosis retentates for Cheddar cheese manufacture: chemical changes during aging. Journal Dairy Science, Champaign, v.68, p.1-10, 1985.
- CARLES, C.; DUMAS, B. R. Kinetics of action of chymosyn (rennin) on some peptide bonds of bovine β -Casein. Biochemistry, Washington, v.23, 6839-6843, 1984.
- CASAGRANDE, H. C.; WOFSCHOON-POMBO, A.F. Fermentação da lactose no queijo Minas Frescal. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v.43, n.258, p.38-40, Jul./Ago. 1988.
- CERVANTES, M. A. ; LUND, D.B.; OLSON, N.F. Effects of salt concentration and freezing on Mozzarella cheese texture. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 66, p.205-213, 1983.
- CHAVES, J.B. P. A análise sensorial na indústria de laticínios. Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 45,(267/272): 38-52, 1990.

CORRADINI, C.; BOTAZZI, V.; REMINI, P.; HOGENBOON, J.A.; PAZZAGLIA, C.; LODI, R.; CARINI, S.; RAMPILLI, M. Formaggio Grana con chimosina da *Kluyveromyces lactis* (Maxiren). Il latte, Milan, 15: 860-865, 1990.

CREAMER, L.K.; OLSON, N.F. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. Journal Food Science, Chicago, v. 47, p. 631-646, 1982.

DAVIES, D. T.; LAW, A. J. R. The composition of whole casein from the milk of Ayrshire cows. Journal of Dairy Research, New York, v.44, 447-454, 1977.

DE JONG, L. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 1-Proteolysis and consistency of Moordhollandse Meshanger cheese. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 30, p. 242-253, 1976.

DESMAZEAUD, M.J. ; GRIPON, J. C. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. Milchwissenschaft, München, 32 (12) : 731-734, 1977.

DINAKAR, P.; MATHUR, M. P. ; DATTA, R. D. Differences in proteolytic behavior in Cheddar cheese prepared with calf rennet and vegetable rennet. Indian Journal of Dairy Science. Champaign, v.42, n.4, p.729-796. 1989.

DISEGNA , L.; TEALDO, E.; LODDO, A.; SCUDLDO, G.; ANTONELLO, F.; GIACON, D.; FELLIN, A. Impiego di chimosina B da *Kluyvermyces lactis* nella tecnologia indicativa del Montasio. Il Latte, Milan, 486 - 490, 1991.

EDWARDS, J. ; KOSIKOWSKI, F.V. Electrophoretic proteolytic patterns in Cheddar cheese by rennet and fungal rennets: their significance to international classification of cheese varieties. Journal Dairy Science, Champaign, v. 52, 1675- 1678, 1969.

- EMMONS, D.B.; ERNSTROM, C. A.; LACROIX, C.; VERRET, P. Predictive formulas for yield of cheese from composition of milk: a review. Journal of Dairy Science, Champaign, 73: 1365-1394, 1990.
- FARKYE, N.Y.; FOX, P.F. Objective indices of cheese ripening. Trends in Food Science & Technology, Cambridge, v. agosto, p. 37-40, 1990.
- FARKYE, N.Y.; KIELLY, L.J.; ALLSHOUSE, R.D.; KINDSTEDT, P. S. Proteolysis in Mozzarella Cheese during refrigerated storage. Journal of Dairy Science, Champaign, v.74, 1433- 1438, 1991.
- FERREIRA, C.L.L.F.; MOURA, K.R.P.; BOTINHON, L.; COELHO, A.A.; SCHILLER, O. R. Avaliação tecnológica de culturas lácticas nacionais na produção de queijo Minas. Semana do Laticinista, 32, Juiz de Fora, 1992, Anais..., Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 1992. P.32-37.
- FOLEGATTI, M.I.S. Avaliação do uso de quimosina produzida por *Aspergillus niger* VAR. awamori na fabricação de queijo tipo prato. Campinas, F.E.A./UNICAMP. 1994. 65p. - Universidade Estadual de Campinas 1994.)
- FOX, P.F. Developments in Dairy Chemistry I - Proteins Applied Science Publishers, London, 1982.
- FOX, P.F. Significance of salt in cheese ripening. Dairy Industries International, Londres, v. 52, n. 9, p. 19-21, 1987.
- FOX, P.F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. Biotechnology and Applied Biochemistry, San Diego, v. 10, p. 522-535, 1988.

- FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 72, p. 1379-1400, 1989.
- FOX, P. F. & LAW, J. Enzimology of cheese ripening. Food Biotechnology, New York, v.5, n.3, p.239-262. 1991.
- FURTADO, M. M. , SOUZA, H. M. , MUNCK, A. V. A fabricação do queijo Minas Frescal sem o emprego de culturas lácticas. (35):15-21, 1980. Revista do I.L.C.T. , Juiz de Fora , 207.
- FURTADO, M. M. WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Fabricação de queijo Prato e Minas: estudo do rendimento. Parte 1. Determinação das cifras de transição. Revista do I.L.C.T., Juiz de Fora, Set/out , 3-19, 1979.
- FURTADO, M. M. Chymogen, primeiro coalho genético do Brasil. Informativo Ha-La Biotec, Valinhos, 16: 2-4, 1993.
- FURTADO, M.M.; PARTRIDGE, J. A. Characterization of Nitrogen fractions During Ripening of Soft Cheese Made from Ultrafiltration Retentates. Journal of Dairy Science, Champaign, v.71, p. 2877-2884. 1988.
- GIGANTE, M. L. Contribuição ao estudo do uso de gordura vegetal na fabricação de queijo Minas Frescal. Campinas, F.E.A./UNICAMP.1991 161p. - Universidade Estadual de Campinas 1994.)
- GRAPPIN, R.; RANK, T.C.; OLSON, F. Primary proteolysis of cheese protein during ripening. A review. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 68, p. 531-540, 1985.

GREEN, M. L. Reviews of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. New York, v. 44, 159-188, 1977.

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

HARBOE, M. K. Chymogen, a chymosin rennet manufactured by fermentation of *Aspergillus niger*. Bulletin of the IDF, Bruxelles, 269:3-12, 1992.

HICKS, C.L. ; O'LEARY, J.; BUCY , J. Use of recombinant Chymosin in the manufacture of Cheddar and Colby cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 71, 1127-1131, 1988.

ISEPON, J.S.; OLIVEIRA, J.A. Variação do índice de proteólise e aceitabilidade do queijo tipo Minas Frescal. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATÍCIÍOS, 13, Juiz de Fora, 1995. Anais ...< Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 1995. p. 287-290.

KAMMERLHNER, J. Rennet cheese yield. Deutsche-Milchwirtschaft, Verlag, v.45, n.3, p 118 -125. 1994.

KOSIKOWSKI, F. Getting top yields and the highest quality. Dairy Field New York, 51-52, 1982.

KOSIKOWSKI, F. Cheese and fermented milk foods. 2 ed. Ann Arbor: Edwards Brothers, Inc. 179- 212. 1977.

KOSIKOWSKI, F. Cheese yield prediction simplified. Dairy Field, New York, p. 27. 1982.

- KUCHROO, C. N.; FOX, P. F. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft, München, v. 38, n.7, p. 331-335. 1982.
- LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.K. Action of calf rennet and other proteolytic enzymes on κ -casein. Journal of Dairy Research, London, v. 36, 11-21, 1969.
- LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.K.; GILLES, J. Symposium: Cheese Ripening technology. Texture Development During Cheese Ripening. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 70, n8, p. 1750-1760, Set. 1987.
- MABBITT, L. A. ; CHAPMAN, H. R.; BERRIDGE, N.J. Experiments in cheese making without starter. Journal dairy Research, London, v. 22, 365- 372, 1955.
- MEDINA, M.; GAYA, P.; GUILLEN, A.M.; NUNUZ, M. Characteristics of Burgos and Hispanico cheeses manufactured with calf rennet or with recombinant chymosin. Food chemistry, Essex, v.45, p.85-89.1992.
- MICHELSEN, R. ; FISH, N.L. Comparing proteolytic action of milk-clotting enzymes on caseins and cheese. Journal of Dairy science. Champaign, v. 53, 704-710, 1970.
- MOU, L.; SULLIVAN, J.J. ; JAGO, G. R. Peptidase activities of group N streptococci. Journal of Dairy Research, New York, v.42, 147-155, 1975.
- MUNCK, A.A.; SOUZA, H. M. Estudo conclusivo a respeito da fabricação do queijo Minas Frescal por diferentes processos. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 35, n.208, p. 13-16, Mar./Abr.1980.

NOOMEN, A. Noordhollandse Meshanger cheese: a model for research on cheese ripening II. The riping of the cheese. *Neth. Milk Dairy Journal*, Wageningen, v. 31, 75-102, 1977.

NUNEZ, M.; MEDINA, M.; GAYA, P.; GUILLEN, A.M.; RODRIGUEZ-MARIN, M.A. Effect of recombinant chymosin on ewes' milk coagulation and Manchego cheese characteristics. *Journal of Dairy Research*, London, v.59, p.81-84.1992.

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.

ORTIZ DE APODACA, M. J.; AMIGO, L.; RAMOS, M. Study of the milk-clotting and proteolytic activity of calf rennet, fermentation-produced chymosin, vegetable and microbial coagulants. *Milchwissenschaft*, München, v. 49, n1, p.13-16. 1994.

PAGLIARINI E. P. LEMBO; BERTUCCIOLI,M. Recenti sviluppi nell'analisi sensoriale dei formaggi. *Italian Journal of Food Science*, Milano, n.2 p. 85-99. 1991.

PHEZAN, J. A. Standardisation of milk for cheesemaking at factoring level. *J. Soc. Dairy Technology*, 34 (4):152-156, 1981.

RETTL, C. ; SGUEDONI, A.; JULIANO, A.M.M. Coalhos e coagulantes. *Leite & Derivados*, São Paulo, 2 (7): 27-30, 1992.

REVILLE, W. J. ; FOX, P.F. Soluble protein in Cheddar cheese: a comparison of analytical methods. *Irish Journal of Food Science and Tecnology*, v. 2, 67- 76, 1978.

RICHARDSON, G.H. Standard Methods for Examination of Dairy Products. 15th ed. Am. Publ. Health Assoc., Washington, DC. ed. 1985.

SHALABI, S.I.; FOX, P.F. Eletrophoretic Analysis of cheese: Comparison of methods. Irish Jornal of Food Science and Technology, Dublin, v.11, p. 135-151, 1987.

STADHOUDERS, J.; hup, g. Factors affeting bitter flavour in gouda cheese. Neth Milk Dairy J.,Wagenigen, 29, 1975.

STRYER, L. Biochemistry. 3 ed. New York: Freemam. 1988. 1089p.

TEUBER, M. Production of chymosin (E.C. 3.4.23.4) by microorganisms and its use for cheesemaking. Bulletin of IDF, Bruxelas, n.251, p.3-15.1990.

THOMAS, T.D.; PEARCE, K.N. Influence of salt and lactose fermentation and proteolysis in Cheddar cheese. New Zeland Jornal Dairy Science Technology, Palmerston North, v. 16, p. 253-259, 1981.

THOMAS, T. D.; PRITCHARD, G.G. Proteolytic enzymes of Dairy starter cultures. Fed. Eur. Microbiol. Sci. Microbiol. Rev., v.46, 245-257, 1987.

VAN DEN BERG, C.; KONING, P.J. Gouda cheesemaking with purified calf chymosin and microbially produced chymosin. Netherlands and Milk Dairy Journal, Wageningen, v.44, p. 189-205. 1990.

VAN DENDER, A.G.F. & MORENO, I. Estudos de processos alternativos para fabricação de queijo Minas Frescal. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 47 (279 / 281): 76-77, 1992.

- VAN DENDER, Ariene G. Fernandes Contribuição ao estudo do uso da ultrafiltração de leite na fabricação de queijo Minas Frescal. Campinas, FEA/UNICAMP, 1995. 176p. (Tese- livre Docência - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 1995.)
- VANDERPOORTEN, R. ; WECKX, M. Breakdown of casein by rennet and microbial milk clotting enzymes. Neth. Milk Dairy Journal, v. 26, 47-59, 1972.
- VAN SLIKE, L.L.; PRICE, V.W. Cheese. Orange Judge Publi. Co. Inc. N.Y., USA, 1941.
- VANDERZANT, CARL & SPLITTSTOESSER, DON F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA, 3^a Edição Washington, Edwards Brothers, 1992.
- VEISSEYRE, R. Lactologia técnica 2^a Edição. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, 1988, 629p.
- VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 76, p. 329-350, 1993.
- VISSER, F.M.W. ; de GROOT-MOSTERT, A.E.A. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel eletrophoretic study. Neth. Milk Dairy Journal, Wageningen, v. 31, 247-264. 1977.

VISSER, S.; SLANGER, K.J.; HUP, G.; EXTERKATE, F.A.; STADHOUDERS, J.
The bitter flavour defects in cheese: some chemical and microbiological aspects. Netherland Milk Dairy Journal, Wageningen, v. 37, p. 250-251, 1983.

WOLFSCHOON- POMBO, A. F. Sobre a determinação da força do coalho. Revista do I.L.C.T., Juiz de Fora, 35 (207/212): 33-34. 1980.

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 vº Congresso Nacional de Laticínios (EPAMIG-ABL-FIL), Juiz de Fora, 1978, 209p.

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

YVON, M. ; CHABANET, C. ; PELISSIER, J.P. Solubility of peptides in trichoroacetic acid (TCA) solutions: Hypotesis on the precipitation mechanism. International Journal of Peptide an protein Research, Copenhagen, v. 34, p.166-167, 1989.

ANEXO I

FICHAS SENSORIAIS

FICHA DE AVALIAÇÃO DA APARÊNCIA

Nome: _____ Data: _____

Avalie a APARÊNCIA das amostras e indique (escreva o número) o quanto você gostou ou desgostou, baseando -se na escala abaixo:

- 9 - Gostei muitíssimo
- 8 - Gostei muito
- 7 - Gostei
- 6 - Gostei ligeiramente
- 5 - Não gostei, nem desgostei
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 3 - Desgostei
- 2 - Desgostei muito
- 1 - Desgostei muitíssimo

COMENTÁRIOS: Por favor, indique que característica(s) você gostou e/ou desgostou na amostra:

AMOSTRA	VALOR DA ESCALA	GOSTEI	DESGOSTEI
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

ANEXO II

CÁLCULO DAS CIFRAS DE TRANSIÇÃO

CÁLCULO DAS CIFRAS DE TRANSIÇÃO

COMP. MÉDIA LEITE

COMP. MÉDIA SORO

COMP. MÉDIA QUEIJO

BOF		EXP1		BOF SORO		EXP.1		BOF		EXP.1	
QUANT. Kg				QUANT. Kg		QUANT. Kg		QUANT. Kg			
Gb	49,44	0		GB	40,275	0,500		GB	20,600	9,165	
PROT.	2,80	0		PROT.	0,600			PROT.	14,160	14,160	
casei.	2,30	0		UMID.	92,900			UMID	61,880	61,880	
UMID	88,20	0		EST.	7,100			EST	38,120	38,120	
EST	11,80	0		ESD.	6,600			ESD	17,520	17,520	
ESD	8,60	0									

cálculo da quantidade de Cada componente presente no leite

gordura	0,03	2	X	49440,000	=	1582,080
Proteína	0,02	8	X	49440,000	=	1384,320
EST	0,11	8	X	49440,000	=	5833,920
Total						8800,320

Cálculo da quantidade de Cada componente perdido no soro

gordura	0,00	5	X	40275,000	=	201,375
Proteína	0,00	6	X	40275,000	=	241,650
EST	0,07	1	X	40275,000	=	2859,525
Total						3302,550

Cálculo da quantidade de Cada componente do leite transformado em queijo

Gordura	1582,08	0	X	201,380	=	1380,700
Proteína	1384,32	0	X	241,650	=	1142,670
EST	5833,32	0	X	2859,530	=	2973,790
Total						5497,160

Cálculo da cifra de transição

Gordura	87,27
Proteína	82,54
EST	50,97

ANEXO III

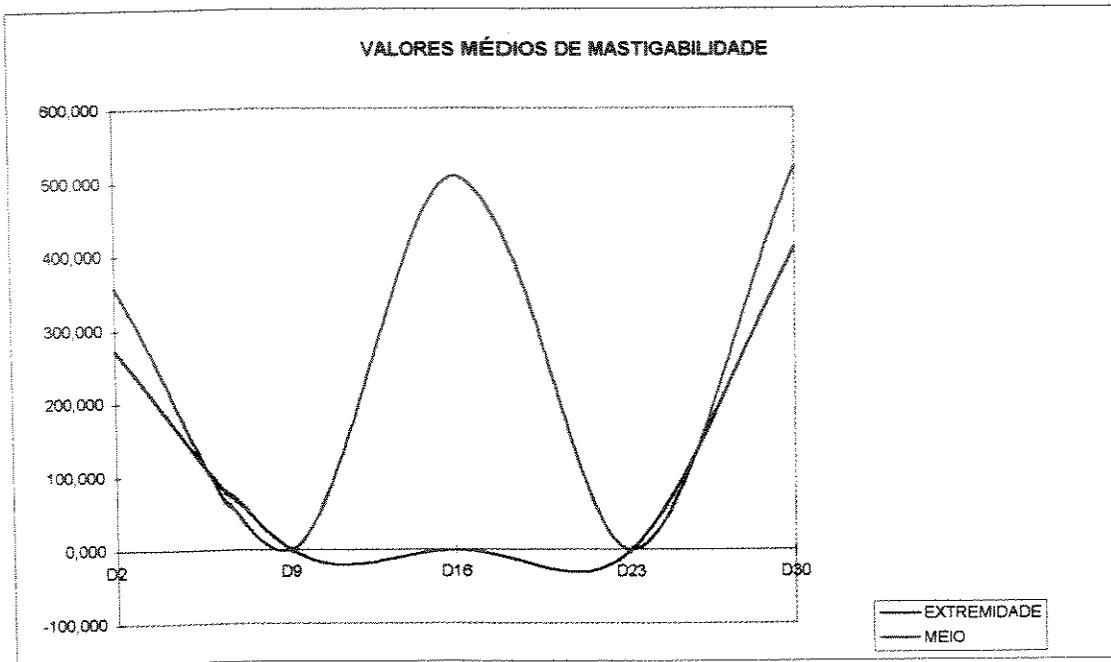
RESULTADOS QUALITATIVOS DAS AVALIAÇÕES SENSORIAIS

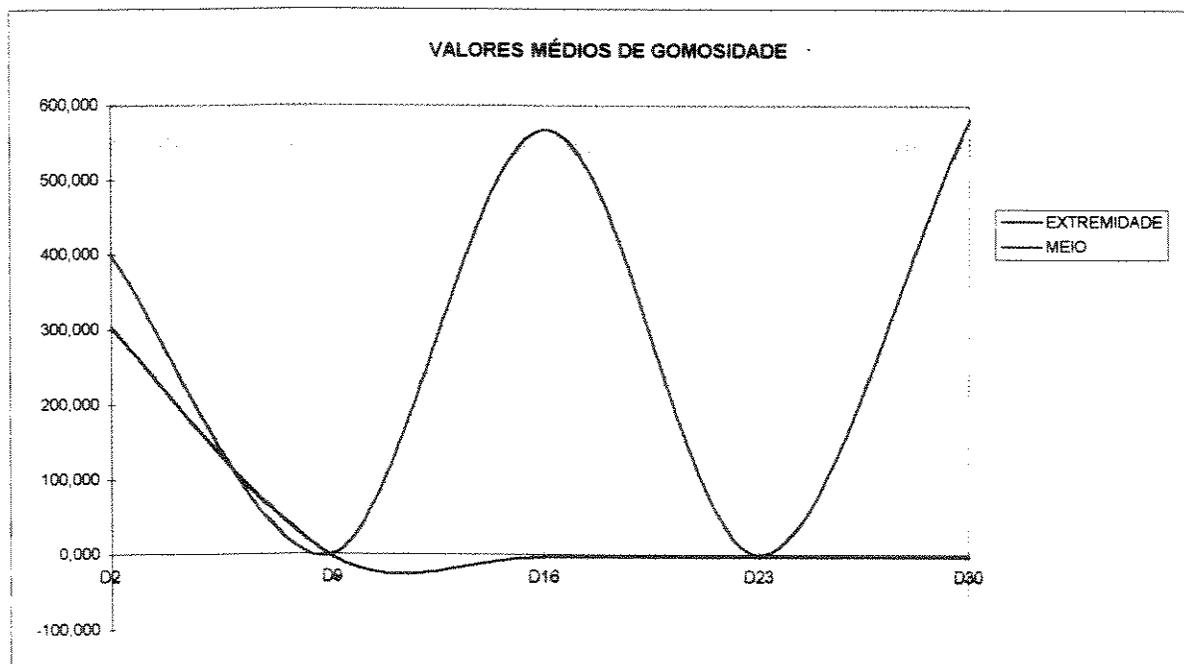
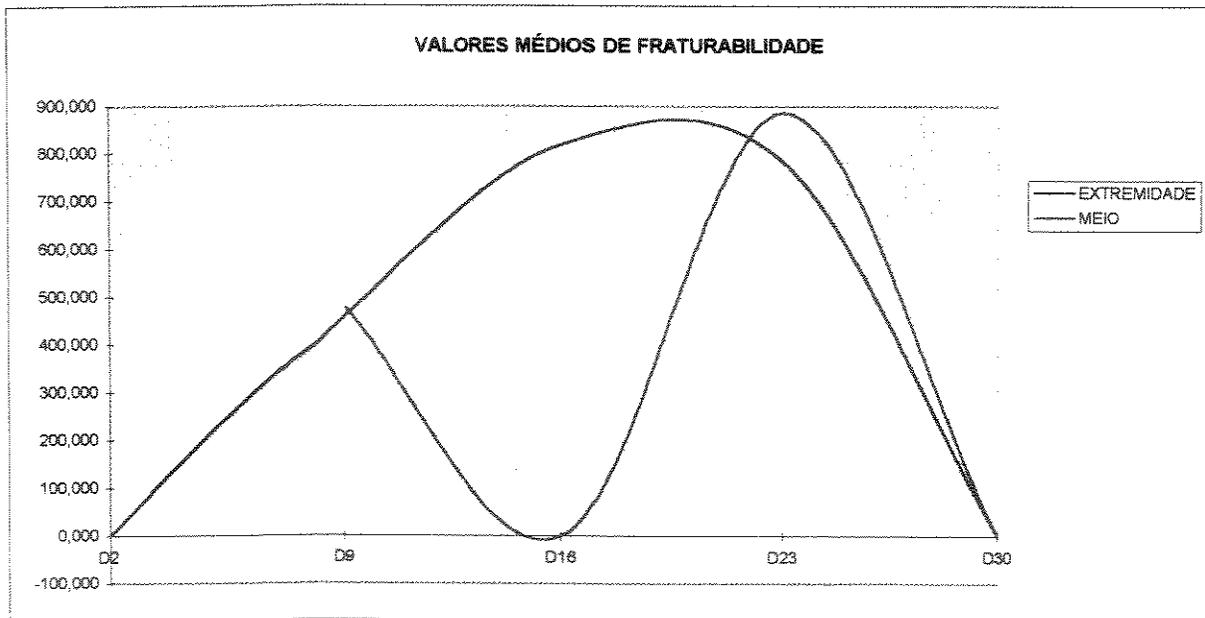
A seguir, serão citados alguns termos encontrados nas respostas das fichas de avaliação, das seguintes perguntas concernentes a avaliação hedônica global e do sabor: "Por favor, indique que características você gostou e que você desgostou na amostra", "A amostra deixou algum sabor estranho na boca? ", são eles:

"Levemente amargo", "pouco sal", "gosto de leite cru", "sabor ácido", "salgado, dureza", "sabor suave", "sem sabor", "ácido", "maciez", "sem acidez", "sabor mais ácido e mais forte", "consistência meio mole", "não tem gosto de nada", "não tem textura de queijo", "parece geleia de mocotó", "borrachudo", "gosto de requeijão", "azedo", "sabor no ponto", "rançoso", resíduo de gosto ácido, "sabor de leite pronunciado", "ligeiramente amargo" , "borrachento", "sabor de fermentado", "gosto de manteiga", "consistência meio arenosa", "pouco sal", "muito mole", "leve sabor amargo", "sabor forte de soro", "residual alcalino" , "sabor próximo de coalhada", "sabor mais próximo à Minas", "cremoso", "leve teor de gordura", "tipo ricota", "levemente amargo não comprometendo a qualidade do produto", "picante", "adstringente", "meio azedo meio amargo", "residual amargo no final", "um pouco amargo ou ácido".

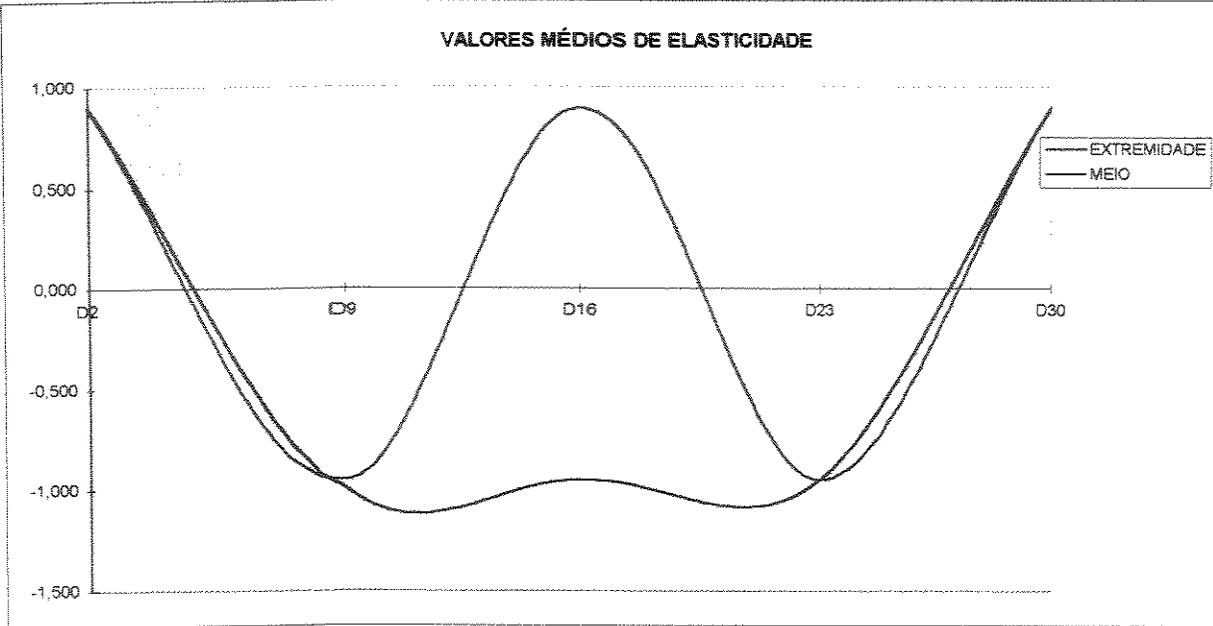
ANEXO IV

TEXTURA INSTRUMENTAL





VALORES MÉDIOS DE ELASTICIDADE



VALORES MÉDIOS DE COESIVIDADE

