

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

**MATURAÇÃO DO QUEIJO TIPO PRATO: INFLUÊNCIA DA
ADIÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS NO PROCESSO**

Adriana Torres Silva

Orientador: Dra. Ariene G. F. Van Dender

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

PARECER

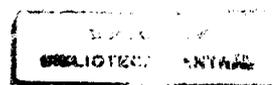
Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida
por Adriana Torres Silva aprovada
pela Comissão Julgadora em 07
de agosto de 1998.

Campinas, 07 de agosto de 1998.

**CAMPINAS
1998**



Profa. Dra. ARIENE GIMENES F.
VAN DENDER
Presidente da Banca



UNIDADE	BC
N.º DE FOLHAS:	
V.	
TOTAL DE PÁG.	35586
PROG.	395/98
C	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/10/98
N.º CPD	

CM-00117698-4

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

SI38m

Silva, Adriana Torres

Maturação do queijo tipo prato: influência da adição de enzimas proteolíticas no processo / Adriana Torres Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 1998.

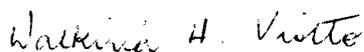
Orientador: Ariene Gimenes Fernandes Van Dender
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Queijo. 2.Maturação. 3.Enzimas proteolíticas. I.Van Dender, Ariene Gimenes Fernandes. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Ariene G. F. Van Dender
(Orientadora)



Prof. Dra. Walkíria H. Viotto
(Membro)



Dra. Vera Lúcia S. Baldini
(Membro)

Dra. Sônia D. Silva Campos
(Membro) suplente

CAMPINAS

Agosto/1998

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Ariene G. F. Van Dender, pelo apoio, amizade e incentivo durante todo o trabalho;

Ao Centro de Tecnologia de Laticínios - ITAL e à Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP pela oportunidade e facilidades concedidas.

À Sônia D. S. Campos, pela amizade, pelo carinhoso apoio, pelo exame prévio do trabalho e pelas valiosas sugestões.

À Vera Lúcia S. Baldini, pela amizade, pela grande colaboração nos trabalhos práticos, pelo exame prévio do trabalho e pelas valiosas sugestões.

À Prof. Walkíria H. Viotto, pelo exame prévio do trabalho e valiosas sugestões sobre a tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de Mestrado e pelo apoio financeiro, que viabilizou a execução do trabalho.

À Dra. Emília Miya Mori do LAFISE – ITAL, pela grande colaboração na análise sensorial dos queijos.

Ao estatístico Katumi Yotsuyanagi do LAFISE - ITAL, pela orientação nas análises estatísticas.

Ao pessoal do TECNOLAT – ITAL, em especial aos técnicos Thalita, Rosemary Sabino, José Rubens, Aparecido e José Carlos.

Ao Prof. Carlos Grosso e a Prof. Liana pelo grande auxílio nas análises de eletroforese e facilidades concedidas.

A todos estagiários do TECNOLAT que colaboraram na execução do trabalho, em especial à Margarete, Leila e ao Sérgio.

À Gislaíne C. Nogueira, pela amizade, pelo carinhoso apoio e grande colaboração nos trabalhos práticos.

À minha família e ao Douglas, pelo carinho, compreensão e grande incentivo em todos os momentos.

A Deus, pela presença constante em minha vida.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Figuras	iii
Resumo	v
Summary	vii
1-Introdução	01
2-Objetivos.....	05
3-Revisão bibliográfica.....	06
3.1-Considerações gerais sobre o queijo Prato.....	06
3.2-Processamento e Qualidade do Queijo Prato	09
3.2.1-Leite	09
3.2.2-Pasteurização do Leite	10
3.2.3-Emprego de Culturas Láticas	10
3.2.4--Inoculação das Culturas Láticas.....	11
3.2.5-Coagulação Enzimática.....	11
3.2.6-Tratamento da Massa	13
3.2.6.1-Corte da Massa	13
3.2.6.2-Primeira Mexedura.....	13
3.2.6.3-Pré-cozimento	14
3.2.6.4-Pré-prensagem	15
3.2.6.5-Corte, Enformagem e Prensagem Final	15
3.2.7-Salga.....	15
3.2.7.1-Processo de salga em salmoura	17
3.2.8-Embalagem.....	17
3.3-Maturação.....	17
3.3.1-Fermentação da lactose	19
3.3.2-Proteólise.....	20
3.3.2.1-Mecanismo de Degradação da Proteína durante a Maturação	21
3.3.2.2-Processos Enzimáticos	24
3.3.2.2.1-Enzimas exógenas	24
3.3.2.2.2-Enzimas endógenas	25
3.3.3-Processos para acelerar a maturação.....	27
3.3.3.1-Elevação da temperatura de maturação.....	27
3.3.3.2-Modificação das bactérias do fermento láctico	28
3.3.3.2.1-Choque térmico.....	29
3.3.3.2.2-Lizosima	30

3.3.3.2.3-Alteração genética.....	30
3.3.3.2.4-"Slurry"Cheese.....	31
3.3.3.2.5-Adição enzimas extracelulares	32
3.3.4-Índice de Maturação.....	37
3.3.5-Índice de Profundidade de Maturação	38
3.3.6-Lipólise.....	39
3.3.7-Textura e maturação.....	40
4-Material e métodos	44
4.1-Material	44
4.1.1-Matéria-prima	44
4.1.2-Coadjuvantes Técnicos	45
4.2-Métodos	45
4.2.1-Tecnologia de fabricação	45
4.2.1.1-Metodologia.....	46
4.2.2-Determinações analíticas.....	51
4.2.2.1-Análises físicas e químicas.....	51
4.2.3-Fracionamento das substâncias nitrogenadas para avaliação direta da proteólise	53
4.2.4-Métodos para avaliação direta da proteólise	54
4.2.4.1-Determinação dos índices de extensão (IEM) e de profundidade da maturação (IPM)	54
4.2.4.2-Determinação dos teores dos aminoácidos tirosina e triptofano ..	54
4.2.4.3-Determinação dos teores de aminoácidos livres totais	55
4.2.4.3.1-Reação com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).....	55
4.2.4.3.2-Reação com ninidrina-cádmio	55
4.2.5 –Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE).....	56
4.2.6-Determinação da atividade proteolítica para calcular o teor de enzima Neutrase® adicionada que foi perdida no soro	56
4.2.7-Determinação instrumental da textura	56
4.2.7.1-Preparo das amostras para análise de textura.....	57
4.2.8-Análise Sensorial	58
4.2.9-Análise Estatística	60
4.2.10-Cálculo do rendimento	61
5-Resultados e discussão	62
5.1-Etapa de processamento	62
5.2-Atividade proteolítica da enzima e do soro.....	64
5.3-Produto final.....	65
5.4 –Proteólise	72

5.4.1-Nitrogênio solúvel em pH 4,6 e em 12% TCA (Kjeldahl)	72
5.4.2-Aminoácidos tirosina e triptofano	82
5.4.3-Formação de grupamentos amínicos em decorrência da proteólise	84
5.4.3.1-Reação com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).....	84
5.4.3.2- Reação colorimétrica com ninidrina-cádmio	86
5.4.4 –Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE).....	87
5.5-Avaliação Instrumental da Textura	93
5.6-Análise Sensorial	100
5.7-Rendimento dos queijos.....	102
6-Conclusões	104
7-Referências Bibliográficas.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Principais métodos para aceleração da maturação de queijos.....	03
Tabela 02: Composição ideal do queijo utilizado para aceleração de maturação pelo método de elevação de temperatura.....	28
Tabela 03: Misturas de enzimas utilizadas para a maturação de queijo.....	34
Tabela 04: Modos alternativos de adição de proteinase no queijo	36
Tabela 05: Composição de frações nitrogenados solúveis usadas como índice de maturação de queijos	38
Tabela 06: Resultados médios das análises físico-químicas do leite tipo B (Processos A, B e C).....	44
Tabela 07: Resumo das principais características dos processos.....	46
Tabela 08: Resultados médios das análises do soro nas três primeiras fases dos processamentos de queijo tipo Prato.....	62
Tabela 09: Resultados médios das análises da coalhada obtida em diversas fases do processamento de queijo tipo Prato	62
Tabela 10: Resultados médios da atividade proteolítica da enzima Neutrase® e do soro antes e após sua adição	65
Tabela 11: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos tradicionais durante o período de maturação (processo A).	66
Tabela 12: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos modificados durante o período de maturação (processo A).....	66
Tabela 13: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos tradicionais durante o período de maturação (processo B).....	67
Tabela 14: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos modificados durante o período de maturação (processo B).....	67
Tabela 15: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos tradicionais durante o período de maturação (processo C).....	68
Tabela 16: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos modificados durante o período de maturação (processo C).....	68
Tabela 17: Resultados médios das análises de NS em pH 4,6 e NNP dos queijos fabricados pelos métodos tradicional e modificado dos processos A, B e C.....	73
Tabela 18: Resultados da análise de variância entre os processos A, B e C para as análises de NS pH em 4,6 e NNP	74

Tabela 19: Nitrogênio solúvel em pH 4,6, como % de nitrogênio total, dos queijos Prato tradicionais e modificados obtidos nos processos A, B e C.....	77
Tabela 20: Evolução do I.P.M dos queijos tipo Prato tradicional e modificado nos processos A, B e C.....	80
Tabela 21: Resultados médios para as avaliações de textura para os queijos tradicionais e modificados (processo A).....	93
Tabela 22: Resultados médios dos parâmetros de textura (processo B)	96
Tabela 23: Resultados médios da textura do queijo Prato (processo C).....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Representação esquemática dos processos de transformações químicas ocorridas durante as fases da maturação dos queijos	19
Figura 02: Rotas da proteólise da α_{S1} -caseína em queijo fabricado usando-se bactérias “starters” mesofílicas.	23
Figura 03: Adição da enzima Neutrase® previamente dissolvida em soro à massa dos queijos, durante a fabricação	48
Figura 04: Fluxograma das principais etapas do processo de fabricação de queijo tipo Prato pelo método convencional.....	49
Figura 05: Fluxograma do processo modificado de fabricação de queijo tipo Prato	50
Figura 06: Retirada das fatias para análise de textura nos queijos	58
Figura 07: Modelo da Ficha (Questionário)	59
Figura 08: Índice de extensão de maturação(%) dos queijos tradicionais e modificados fabricados pelos processos A, B e C	79
Figura 09: Índice de profundidade de maturação(%) dos queijos tradicionais e modificados fabricados pelos processos A, B e C.....	81
Figura 10: Variação do teor de tirosina durante a maturação dos queijos fabricados pelos métodos tradicional e modificado dos processos A, B e C.....	82
Figura 11: Variação do teor de triptofano durante a maturação dos queijos fabricados pelos métodos tradicional e modificado nos processos A, B e C.....	83
Figura 12: Efeitos da maturação nas frações nitrogenadas determinadas por reação colorimétrica com TNBS, nos queijos fabricados pelos métodos tradicional e modificado (processos A, B e C)	85
Figura 13: Efeitos da maturação nas frações nitrogenadas determinadas por reação colorimétrica com ninidrina-cádmio, nos queijos fabricados pelos métodos tradicional e modificado (processos A, B e C)	87
Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) do queijo tipo Prato. (Processo A).....	90
Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) do queijo tipo Prato. (Processo B)	91
Figura 16: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) do queijo tipo Prato. (Processo C)	92

Figura 17: Resultados médios para o parâmetro firmeza dos queijos tradicionais e modificados durante o período de maturação (processo A)	94
Figura 18: Comportamento do parâmetro adesividade durante a maturação dos queijos tradicionais e modificados. (processo A).....	95
Figura 19: Curvas representando os parâmetros de textura avaliados durante a maturação dos queijos tipo Prato tradicionais e modificados.....	98
Figura 20: Resultados da avaliação sensorial para firmeza dos queijos	102

RESUMO

MATURAÇÃO DO QUEIJO TIPO PRATO: INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS NO PROCESSO

A maturação do queijo é um processo complexo envolvendo a formação de variedades de componentes de aroma e sabor por diferentes vias, bem como uma mudança nas propriedades físicas e estruturais da matriz protéica. No queijo Prato este processo corresponde a um período de aproximadamente 40 dias. Este produto tipicamente brasileiro vem sofrendo uma descaracterização progressiva devido principalmente a alterações no processo de cura, visando diminuir os custos. Diante de tal problema a alternativa mais viável consiste na aceleração da maturação, e dentre os métodos empregados, a adição de enzimas proteolíticas é o de mais fácil aplicação prática. Neste trabalho, foram avaliados os parâmetros tecnológicos de fabricação e as variáveis envolvidas na cura do queijo tipo Prato obtido pela adição de enzimas proteolíticas. Foram estudados paralelamente queijos fabricados pelo método tradicional e obtidos com três concentrações de enzima (25, 15 e 10 mg /kg leite) adicionadas à massa antes da pré prensagem. A avaliação da proteólise foi efetuada pelos teores de Nitrogênio (N) solúvel a pH 4,6 e em ácido tricloroacético (TCA) 12%, pela determinação da concentração de tirosina e triptofano, por reação colorimétrica com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e ninidrina-cádmio e por eletroforese nos queijos com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação. Os atributos de textura e sensoriais também foram avaliados. O uso da enzima Neutrase® acelerou a proteólise do queijo Prato. Os queijos fabricados pelo método modificado apresentaram já no primeiro dia de maturação e durante todo período da mesma, um índice de extensão (% NS-pH 4,6/NT) e de profundidade (% NS TCA 12%/NT) significativamente maiores do que aqueles fabricados pelo método tradicional, nos processos com adição de 25, 15 e 10 mg enzima/kg leite. Os queijos modificados do processo A (25mg enzima/kg leite) apresentaram um índice de extensão aos 7 dias (17,32%) mais elevado do que o correspondente com 30 dias conforme descrito na literatura (14,0 – 14,5%), ao passo que no processo B (15mg enzima/kg leite) o valor obtido para os queijos com um dia (16,02%) já foi maior. No processo C (10mg enzima/kg leite) um valor próximo (15,61%) àquele correspondente a 30 dias na literatura foi alcançado com 14 dias de

maturação. A adição de enzima Neutrase® à massa dos queijos modificados não acarretou perdas no rendimento. Nos processos A e B houve um decréscimo do índice de firmeza até o 21º dia de maturação, correspondendo à primeira fase da maturação onde a quebra da α_1 -caseína promoveu um amolecimento da massa. A região analisada (periferia e centro) influenciou a textura dos queijos. O índice de firmeza nas fatias retiradas da região mediana foi menor do que aquele obtido nas fatias da ponta do queijo. O perfil eletroforético dos queijos mostrou que a adição de enzimas levou a diferenças quantitativas nas frações protéicas dos queijos modificados quando comparados aos tradicionais. Houve uma maior degradação das frações α_1 e β -caseínas, com acúmulo maior de alguns produtos de degradação destas duas frações nos queijos modificados. A degradação da fração β -caseína nos queijos modificados foi maior do que a da α_1 -caseína.

SUMMARY

RIPENING OF PRATO CHEESE: INFLUENCE OF PROTEOLYTIC ENZYMES ON THE MANUFACTURING PROCESS

The ripening process of cheese is a very complex process that involves the development in many different ways of a great variety of flavor compounds that affect the aroma and taste of the finished product. Throughout the ripening process, the protein content undergoes a considerable number of changes that influence its physical and structural properties. The ripening of Prato cheese is completed after about 40 days. In recent times, however, this typically Brazilian product has gradually lost some of its main characteristics due to changes introduced in the ageing procedure by many cheese plants to reduce production costs. In view of the need to incorporate the economic aspects of cheesemaking, the most viable alternative consists in accelerating the ripening process. From a technological standpoint, the addition of proteolytic enzymes is the technique that offers the greatest facility to be implemented in practice. The present research project aimed at evaluating the technological manufacturing parameters and the variables involved in the ageing of Prato cheese obtained with the incorporation of a proteolytic enzyme (Neutrase[®]). Parallel experiments were conducted to study cheese made without enzyme (traditional method) and cheeses made with the incorporation of three different enzyme concentrations (25, 15 and 10 mg enzyme/kg milk) in the raw curd prior to the pre-pressing stage (modified method). Proteolysis after 1, 7, 14, 21, 28 and 40 days ripening was evaluated by determining: 1) the content of soluble Nitrogen (N) at pH 4,6; 2) the content of soluble nitrogen in a 12% trichloroacetic acid solution; 3) the concentration of tyrosin and tryptophane. Additional methods to determine proteolysis included colorimetric reactions with trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) and ninidrin-cadmium, respectively. Finally, proteolysis was also determined by electrophoresis. The texture and sensorial attributes were also evaluated. The use of Neutrase[®] accelerated proteolysis in Prato cheese. As for the modified experiments (25, 15 and 10 mg enzyme/kg milk), the cheeses showed, from the very first day of the ripening process on and throughout the rest of the ripening period, extension (% NS-pH 4,6/NT) and depth (% NS TCA 12%/NT) indexes significantly higher in comparison to the values produced by the traditional cheeses manufactured without the addition of enzyme. The modified cheeses of process A (25 mg enzyme/kg milk) presented

after 7 days ripening an extension index (17,32%) which was higher than the corresponding index figure obtained for cheese after 30 days ripening described in literature (14,0 - 14,5%). On the other hand, the cheeses of process B (15 mg enzyme/kg milk) exceeded (16,02%) the figure referred to in literature (14,0 - 14,5 % after 30 days) already after only 1 day ripening. As for Process C (10 mg enzyme/kg milk), a value quite close (15,61%) to the one referred to in literature for 30 days (14,0 - 14,5%) was reached after 14 days. The incorporation of the enzyme Neutrase[®] in the curd of modified cheeses did not bring about any losses in terms of cheese yield. Processes A and B showed a decrease of the firmness index up to the 21st day of the ripening process. This time span of 21 days corresponds to the first stage of the breakdown process of α_1 -casein which causes softening of the curd. The texture of the cheeses varied according to the areas submitted to analysis (peripheral and core). The firmness values produced by slices taken from the central part of the cheeses were smaller than those produced by slices taken from the edges. The electrophoretic profile of the cheeses clearly showed that the incorporation of enzymes brought about quantitative differences relative to the protein fractions of the modified cheeses in comparison to the values obtained for the traditional product. A more intense breakdown of the α_1 - and β -casein fractions is observed, evidenced by higher concentrations of some degradation products of these two fractions found in modified cheeses. The degradation of the β -casein fraction in the modified cheeses was more intense than the breakdown of α_1 -casein.

1- INTRODUÇÃO

O queijo tipo Prato é um dos queijos mais populares do Brasil. Foi introduzido na década de 20, na região sul de Minas, por imigrantes dinamarqueses. O queijo Prato é portanto, originário dos queijos Danbo dinamarquês e Gouda holandês que possuem textura mais aberta, com olhaduras regulares e pequenas. Já o queijo Prato pode ser encontrado tanto com olhaduras regulares ou irregulares como também completamente fechado. No Brasil, a tecnologia de fabricação do queijo Prato foi adaptada às condições locais, o que explica as diferenças de sabor e textura em relação aos queijos que lhe deram origem. Os queijos Lanche, Estepe, Bola e Cobocó são considerados variedades do queijo Prato (ILCT, 1983).

Com as características de massa macia, semi-cozida, fatiabilidade e de aspecto amanteigado (SCHIFTAN & KOMATSU, 1980), o queijo Prato é um dos mais apreciados e consumidos no País. A composição média esperada do queijo curado é de 42-44% para umidade, 26-29% para gordura, pH 5,2-5,4, e sal de 1,6-1,9% (FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994; ILCT, 1983).

Um aspecto muito importante e que deve ser mencionado refere-se ao processo de cura deste tipo de queijo. A maturação do queijo Prato é muito importante, pois é nesta etapa de processamento, realizada em condições de temperatura e de umidade controladas, que o produto adquire as características sensoriais que lhe são peculiares. Nesta fase, ocorrem as reações bioquímicas que provocam alterações de sabor, odor, textura e consistência nos queijos novos, que se apresentam insípidos e sem elasticidade, possibilitando, deste modo, obter um produto macio e com odor e sabor característicos. O queijo Prato e similares podem ser maturados embalados a vácuo, pelo sistema de “cryovac”, parafinados, revestidos de película plástica, ou mesmo com cultivo de *Brevibacterium linens* na superfície externa, sempre com o intuito de evitar a perda de

peso e proteger a superfície do produto de ações mecânicas e do crescimento de mofo e leveduras (ILCT, 1983; ILCT, 1977; SOUZA, 1960).

Sendo assim, o queijo Prato deve ser consumido sempre após a maturação que é de aproximadamente 40 dias, um período de tempo de maturação considerado médio, devido à complexidade de fenômenos químicos e bioquímicos que ocorrem. No entanto é considerado um período de tempo longo para quem deseja uma rápida rotação de capital de giro.

Para diminuir os custos com a matéria prima e mão de obra, alguns fabricantes de queijo tipo Prato têm diminuído o tempo de maturação sem o uso adicional de qualquer tipo de tecnologia, prejudicando as suas características. Desta forma, o produto vem perdendo seus padrões de qualidade e identidade e, conseqüentemente, seu valor comercial.

A opção mais viável para solucionar este problema consiste na aceleração da maturação dos queijos. Esta alternativa vem sendo explorada por diversos pesquisadores, sempre com o objetivo de otimizar os custos do processo sem, no entanto, alterar as características tradicionais do produto (EL SODA & PANDIAN, 1991; EL ABOUDI et al., 1991; INTERNATIONAL..., 1991; LAW, 1984; LAW, 1987; LAW & WIGMORE, 1982; SCOTT, 1986;).

De modo geral, quase todas as técnicas de aceleração de maturação de queijos podem ser classificadas em uma das quatro categorias apresentadas na Tabela 01 (LAW, 1984).

TABELA 01: Principais métodos para aceleração da maturação de queijos (LAW, 1984).

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Temperatura elevada	* Sem restrições legais; Simplicidade tecnológica	* Ação não específica; maior potencial de deterioração microbiológica
Adição de enzimas	* Baixo custo; ação específica; opções de escolha do "flavour"	* Fontes limitadas de enzimas; perigo de supermaturação; dificuldades de incorporação; restrições legais
Fermentos lácticos Modificados	* Provavelmente sem restrições legais; manutenção do equilíbrio natural das enzimas; fácil incorporação	* Complexidades tecnológicas; anti-econômico até o momento
"Slurry"	* Desenvolvimento rápido de "flavour"	* Alto potencial de deterioração microbiológica; produto final requer processamento (queijo fundido, por exemplo)

Do ponto de vista operacional, a adição de enzimas extracelulares parece ser a alternativa de mais fácil aplicação prática. No entanto, para que a mesma possa ser implementada sem riscos pela indústria de laticínios no Brasil, é necessário que se conheça os principais parâmetros do processo de fabricação, bem como as variáveis envolvidas na aceleração da maturação.

No entanto, apesar da inegável importância comercial do produto, até o momento são poucos , os dados de literatura sobre aceleração de maturação aplicada ao queijo Prato no Brasil (VAN DENDER et al., 1986).

Nos últimos anos, tem aumentado consideravelmente o interesse nesta tecnologia, a nível mundial, uma vez que o binômio baixo custo/qualidade, é um fator determinante da competitividade industrial. Com o advento do MERCOSUL, o desenvolvimento de uma tecnologia adaptada às condições do Brasil se reveste de grande importância para manter produto nacional competitivo no mercado interno em relação ao produto vindo de países cujas indústrias, além de poder contar com matéria-prima mais barata, são tecnologicamente mais avançadas que a indústria brasileira.

2- OBJETIVOS

-Estudar os parâmetros tecnológicos de fabricação e as variáveis envolvidas na cura do queijo tipo Prato pela adição de enzimas proteolíticas, visando acelerar o processo sem alterar a qualidade tradicional do produto;

-Desenvolver técnica de fabricação do queijo tipo Prato, com adição de enzimas extracelulares;

-Estudar a relação entre a medida da textura e o desenvolvimento da proteólise, quantificada por meio de frações nitrogenadas, durante a maturação de queijos tipo Prato obtidos pelos métodos tradicional e modificado por adição de enzimas proteolíticas;

-Realizar um estudo comparativo entre as características sensoriais do queijo modificado e aquelas do queijo tradicional.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1-Considerações Gerais sobre o Queijo Prato

Dentre os produtos brasileiros de laticínios, o queijo Prato é um dos mais difundidos. É um queijo de grande popularidade e pode ser encontrado praticamente em todo o país, representando cerca de 35% do total de queijos produzidos (ILCT, 1983). Segundo informações fornecidas pela ABIQ (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO, 1998), em 96 foram produzidas 68.310 toneladas de queijo tipo Prato e em 97, 75.100, com um aumento portanto de 10,3% na produção anual.

De acordo com a definição legal (MERCOSUL, 1997), o queijo Prato é um queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como gordo (Gordura no extrato seco = 45-59,9%) e de média umidade (36-46%), e deverá apresentar as seguintes características sensoriais:

- **Consistência:** semidura, elástica
- **Textura:** compacta, lisa, fechada, com alguns olhos pequenos arredondados e/ou algumas olhaduras mecânicas.
- **Cor:** amarelado ou amarelo-palha.
- **Sabor:** característico.
- **Odor:** característico.
- **Crosta:** não possui, ou com crosta fina, lisa, sem trincas.
- **Olhaduras:** algumas olhaduras pequenas, bem distribuídas, ou sem olhaduras.

É um queijo basicamente proteolítico, onde a proteólise é o fenômeno mais importante na maturação e que influencia as suas características de textura e "flavour".

Devido à importância do produto em questão, diversos autores têm realizado pesquisas visando a padronização de sua tecnologia de fabricação, bem como a melhoria da qualidade.

FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1983), em experimentos visando obter dados sobre a perda de umidade da coalhada durante a fabricação do queijo Prato, observaram uma perda total de 43,40% de umidade desde a coagulação do leite até o final da prensagem. Além disso, os efeitos do corte da coalhada e de seu aquecimento a 42°C demonstraram ser de grande importância no fenômeno da sinerése.

Por outro lado, FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1979), realizaram trabalho visando determinar as cifras de transição para a fabricação de queijo Prato, o que permite não só obter uma idéia do aproveitamento dos componentes do leite como também estabelecer fórmulas empíricas para prever o rendimento em uma fabricação deste queijo.

O fermento láctico é um agente preponderante na maturação dos queijos, sendo portanto responsável pelo sabor, aroma e olhaduras dos mesmos. Tendo isto em vista, HOSKEN & GAUDERETO (1973), realizaram interessante trabalho visando obter um queijo Prato (variedade lanche) com qualidade superior, com o emprego de variedades diferentes de culturas lácticas, como *Streptococcus lactis*, *L. dextranicum*, *Streptococcus thermophilus* e *L. bulgaricus* entre outros. Verificaram que a combinação de cultura láctica do ILCT 0,5% (*Streptococcus lactis* e *Streptococcus cremoris*) mais *L. bulgaricus* 0,5% propiciou desenvolvimento de todas as características organolépticas (suave, puro e agradável) e as olhaduras regulares e brilhantes tão almejadas pelos consumidores. No mesmo trabalho, os autores estudaram a qualidade do queijo Prato parafinado (após 15 dias de cura) e embalado em Cry-O-Vac (após a salga e secagem), concluindo que os queijos parafinados receberam melhor classificação.

Preocupados com a perda de umidade e conseqüentemente a perda de peso do queijo Prato durante a salga, FURTADO et al.(1979) estudaram uma metodologia onde o queijo é mergulhado em banho de água gelada por tempo determinado antes da sua salga em salmoura. Durante este processo o queijo em meio menos concentrado ganha peso (aumento do teor de umidade) pelo fenômeno de osmose. Teoricamente, antepondo-se este tratamento ao da salga em salmoura, este ganho de peso pode eventualmente compensar a perda de umidade no período de salga, que apresenta evidentes vantagens econômicas para quem pesa os queijos após a salga em salmoura.

Sendo assim, é indiscutível a importância econômica deste tipo de queijo no Brasil, e o período de maturação ocupa lugar de destaque nesse sentido. Reduzir este tempo seria de grande valia para fabricantes e consumidores desse queijo que obteriam o produto com custos reduzidos. A aceleração da maturação surge como uma opção viável e segura para se alcançar esse objetivo.

Esse assunto tem sido pouco explorado no Brasil, em virtude de ser uma tecnologia consideravelmente nova no país, sendo necessário informações mais detalhadas sobre o assunto em literatura de países como EUA, Egito, França e Canadá, onde essa tecnologia é comumente empregada.

MARTINS et al. (1979) estudaram a influência da inoculação de *Pediococcus pentosaceus*, juntamente com fermento LD, na aceleração do processo de maturação do queijo tipo Prato. A curva do índice de maturação mostrou uma elevação ligeiramente mais acentuada nas primeiras duas semanas nos queijos com pediococos quando comparadas ao padrão. Esta aceleração não foi porém, detectada pela equipe de provadores.

VAN DENDER et al.(1986) realizaram importante trabalho visando acelerar o processamento do queijo tipo Prato por meio de variações no processo convencional de fabricação, como o uso de quantidades diferentes de fermento láctico em relação ao volume de leite utilizado, adição de água ao leite e uso de formas "Perfora", dentre

outros, para otimizar os métodos de aceleração. Além disso, foram realizados experimentos visando comparar dois sistemas de embalagem durante a maturação (cry-o-vac e verniz). Com a adição de água ao leite foi obtido um queijo com alta umidade e baixa acidez e com tempo de maturação mais curto. Isto ocorreu pois a acidez está diretamente envolvida na plasticidade e flexibilidade da massa do queijo, ou seja, quanto maior o teor de ácido láctico no queijo, mais firme e quebradiça será a textura da massa, e também pelo fato do queijo ser mais úmido, favorecendo as reações bioquímicas envolvidas na cura. Os queijos foram fabricados com 1,0% e 1,5% de fermento láctico, sendo que o queijo com 1,0% se apresentou melhor quanto ao sabor, corpo e textura. Esse experimento é de grande importância uma vez que o fermento está relacionado com a produção de acidez, ajuda na ação do coalho, na dessoragem da massa; portanto é um agente preponderante na maturação dos queijos responsável pelo sabor, aroma e olhaduras. Além disso, VAN DENDER et al. (1986) também concluíram que o sistema cry-o-vac, em comparação ao verniz, continua sendo o melhor meio de se proteger o queijo contra bolores, leveduras, ações mecânicas e contra perda de umidade durante o período de cura. Sendo assim, o verniz tem seu uso dirigido para queijos duros pois apresentam menor quantidade de água, não sendo tão susceptíveis à ação desses agentes.

Nesse trabalho, VAN DENDER et al. (1986) buscaram, em última análise, contribuir para minimizar o processo de descaracterização que o queijo Prato vem sofrendo ao longo do tempo em virtude da utilização de equipamentos pouco produtivos e da falta de estudos sistemáticos dos processos de fabricação no Brasil.

3.2-Processamento e Qualidade do Queijo Prato

3.2.1-Leite

Para se obter um queijo Prato de boa qualidade é muito importante a escolha da

matéria-prima. No conceito moderno e industrial, o leite destinado à fabricação de queijos deve obedecer às mesmas exigências de qualidade e de conservação requeridas para o leite pasteurizado (OLIVEIRA, 1986), com ênfase maior para a ausência de antibióticos que podem ocasionar inibição das culturas lácticas responsáveis pelo desenvolvimento da acidez, aroma e sabor dos queijos (SCOTT, 1986).

A composição do leite influi diretamente nas características finais dos queijos. A gordura, por exemplo, tem um papel extremamente importante na cor, na consistência, no sabor e no aroma do queijo Prato (OLIVEIRA, 1986).

O queijo Prato é fabricado com leite de vaca pasteurizado (63°C por 30 minutos) contendo, em média, 3,5% de gordura e acidez não superior a 18°D (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979).

3.2.2- Pasteurização do Leite

Dentre os tratamentos do leite destinado à fabricação de queijo Prato, o mais importante é sem dúvida a pasteurização (OLIVEIRA, 1986). Tal tratamento tem por finalidade a destruição dos microrganismos patogênicos e a eliminação de grande parte da flora microbiana normal do leite, favorecendo assim o crescimento dos microrganismos posteriormente inoculados (SCOTT, 1986) e salvaguardando a saúde do público consumidor. Por outro lado, a pasteurização pode ocasionar uma insolubilização do cálcio disponível no leite, o qual é fundamental no processo de coagulação enzimática do leite, agindo como elemento de ligação das micelas de caseína (KOSIKOWSKI, 1978; SCOTT, 1986).

3.2.3-Emprego de Culturas Lácticas

A função primária da adição de culturas lácticas na fabricação de queijos é converter a lactose em ácido láctico, o qual reduz o pH do sistema, auxiliando na eliminação do soro durante o processo de fabricação e na fase inicial da maturação

(BONASSI et al., 1981; SCOTT, 1986). Além disso, o ácido láctico formado exerce uma efetiva inibição sobre o crescimento de microrganismos indesejáveis e ajuda na ação do coalho e na coagulação da massa (OLIVEIRA, 1986).

O fermento láctico utilizado na fabricação do queijo Prato é composto basicamente de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, os quais degradam a lactose do leite unicamente em ácido láctico, podendo ainda, ser incluída pequena porcentagem de espécies de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* variedade *diacetylactis* que, através da fermentação do citrato, produzem compostos aromáticos como o diacetil e o acetaldeído, além de pequena quantidade de CO₂, responsável pelas olhaduras típicas do produto final (OLIVEIRA, 1986; SCOTT, 1986).

3.2.4-Inoculação das Culturas Lácticas

Após a pasteurização, o leite é então resfriado para uma faixa de temperatura de 32°C a 35°C e realiza-se a inoculação. Normalmente, recomenda-se o emprego de fermento láctico com acidez de 80°D, em média, e na proporção de 1,5% (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979).

3.2.5-Coagulação Enzimática

Na fabricação de queijo Prato emprega-se a coagulação enzimática, utilizando coalho rico em enzimas proteolíticas de origem animal, extraído do abomasso de bovinos lactentes ou adultos. Quando se utiliza o de bovinos lactentes, o qual é composto basicamente de quimosina, o coalho obtido é denominado renina (GORRETA, 1980).

A caseína é o principal elemento nitrogenado do leite e se encontra em seu estado normal sob a forma de grandes partículas coloidais esféricas (micelas) de

fosfocaseinato. (ILCT, 1977).

As micelas de caseína são constituídas de quatro frações protéicas principais que são: α_1 -caseína, α_2 -caseína, β -caseína e κ -caseína. A fração κ -caseína, embora represente somente 10 a 20% da caseína, exerce um papel protetor importante sobre as micelas de caseína, evitando que as mesmas se coagulem na presença de cálcio solúvel (OLIVEIRA, 1986).

A coagulação das micelas de caseínas devido à ação proteolítica do coalho, é dividida em duas fases, sendo a primeira fase enzimática e a segunda não enzimática (KOSIKOWSKI, 1978; WOLFSCHOON-POMBO, 1983). A primeira fase consiste na ação enzimática da renina (quimosina) sobre a ligação peptídica Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da fração κ -caseína, com a resultante liberação de um composto solúvel denominado de glucopeptídeo (porção hidrofílica compreendida na seqüência peptídica 106 a 169). A segunda fase caracteriza-se por uma agregação do fragmento hidrofóbico (sequência peptídica 1 a 105) denominado de para-caseína (desestabilizada), à qual na presença de cálcio solúvel, por ser instável, dá origem a um coágulo brilhante, elástico e hidratado, denominado de para-caseinato de cálcio (KOSIKOWSKI, 1978; SCOTT, 1986; WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

A temperatura de coagulação empregada na fabricação do queijo Prato situa-se em torno de 32°C e normalmente, usa-se cloreto de cálcio (25g por 100 litros de leite) com a finalidade de suprimir uma possível deficiência de cálcio solúvel causada pelo processo de pasteurização do leite (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979; OLIVEIRA, 1986).

O coalho destinado à produção de queijo Prato deve ser diluído em água antes de sua adição ao leite, ter sua atividade comprovada e ser adicionado em proporção suficiente para promover a coagulação do leite em 45 minutos (OLIVEIRA, 1986).

3.2.6-Tratamento da Massa

3.2.6.1-Corte da Massa

Ao atingir o ponto final da coagulação, decorrido em torno de 45 minutos da adição do coalho, tem-se o chamado "ponto de corte", quando então, a massa é cortada com o auxílio de liras verticais e horizontais (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979).

O corte da coalhada tem por finalidade provocar e acelerar a saída do soro. Nesta etapa a massa é então dividida em pequenos cubos (grãos) que permanecem submersos no soro que vai saindo rapidamente do interior dos mesmos. Na superfície de cada grão forma-se uma ligeira película elástica que retém a gordura e, até certo ponto, o soro dentro do mesmo (ILCT, 1977).

Segundo OLIVEIRA (1986), para o queijo Prato, o corte da massa deve ser realizado até se obter cubos medindo cerca de 0,4cm a 0,5cm de aresta, para que o produto obtido tenha as características ideais.

3.2.6.2-Primeira Mexedura

Após o fracionamento da coalhada o grão começa a apresentar cada vez mais tendência de submergir no soro. A densidade do grão vai subindo. Se após ao corte, os grãos forem deixados em repouso por muito tempo no fundo do tanque, eles se aderem uns aos outros e formam uma massa branda e compacta (ILCT, 1977).

Para conservar o grão individualizado e evitar que se formem grumos e se perca o ritmo da dessoragem, é necessário manter o grão em constante movimento por meio de agitação. Esta agitação deve ser lenta a princípio e mais rápida à medida que a densidade e consistência dos grãos aumentam (ILCT, 1977).

A duração da primeira mexedura é de aproximadamente 20 minutos (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979).

3.2.6.3-Pré-cozimento

A etapa de pré-cozimento da massa visa acelerar e intensificar a dessoragem, além de alterar a textura, dando mais elasticidade à massa, controlar o desenvolvimento do fermento láctico e inibir o crescimento de certos microrganismos indesejáveis (OLIVEIRA, 1986).

Na fabricação do queijo Prato o aumento da temperatura do tanque para realização do pré-cozimento da massa pode ser efetuado pela adição de água a 42°C diretamente sobre a massa ou aumentando a temperatura do tanque de coagulação, pela injeção de vapor na camisa do tanque (OLIVEIRA, 1986).

A adição de água a 42°C diretamente sobre a mistura de massa e soro é o procedimento mais tradicional de aquecimento. Tal prática permite intensificar o processo de dessoragem, aumentar a firmeza dos grãos, além de diminuir a concentração de ácido láctico na massa do queijo Prato, visando retardar o processo de maturação e proporcionar um sabor mais suave no produto final (OLIVEIRA, 1986).

Por outro lado, o pré-cozimento da massa do queijo Prato efetuado com o aumento da temperatura pela injeção de vapor fluente na camisa do tanque, é realizado lentamente, indicando-se a elevação de 1°C a cada 4 minutos até atingir a temperatura de 41°C (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979). Em alguns casos esta temperatura pode chegar a 42°C, porém tem sido comprovado que, em temperaturas acima de 40°C há inibição do fermento láctico mesófilo constituído basicamente de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (OLIVEIRA, 1986).

O ponto final da massa é verificado através do processo tradicional, ou seja,

quando os grãos se apresentarem ligeiramente firmes, secos, individualizados e, quando pressionados demonstrarem boa coesão e elasticidade (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979). O tempo necessário para os grãos da massa atingirem essas características é variável podendo citar como média 45 minutos.

3.2.6.4-Pré-prensagem

Após a massa atingir o "ponto" é realizado seu escoamento juntamente com o soro, através do registro de saída do tanque de coagulação para o tanque de pré-prensagem, onde a massa sofrerá uma pré-prensagem efetuada através de placas metálicas movidas por pistões hidráulicos, com pressão até duas vezes superior ao peso estimado da massa existente no tanque durante 20 minutos (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979). Tal procedimento tem a finalidade de auxiliar a expulsão do soro do interior da massa e compactar os grãos (OLIVEIRA, 1986).

3.2.6.5-Corte, Enformagem e Prensagem Final

Após a pré-prensagem, a massa é cortada em blocos, os quais são colocados em formas de plástico de peso, tamanho e formato desejados, aparelhadas com dessoradores de nylon (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979).

A prensagem final dos queijos é efetuada em prensas coletivas com número determinado de formas, sob pressão que varia de acordo com o peso dos queijos a serem prensados, visando dar a forma, consistência e umidade requeridas pelo produto, dentro de suas características intrínsecas (OLIVEIRA, 1986).

3.2.7-Salga

A salga é uma operação de grande importância na fabricação dos queijos de um modo geral, e do queijo Prato em particular, ocorrendo entre o final da fabricação e o

início da maturação (FURTADO & SOUZA, 1981).

A salga do queijo é efetuada com as finalidades principais de:

- conferir qualidades de sabor que os fazem mais apreciáveis
- dar ao produto maior conservação
- inibir ou retardar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis
- selecionar a flora normal do queijo (ILCT, 1977).

A salga regula de certo modo também o corpo e textura do queijo, influenciando na solubilidade dos compostos nitrogenados e facilita em certas condições a saída do soro, verificando-se a máxima peptização quando a concentração do sal na umidade do queijo é de 5%. Com concentrações apropriadas de sal, a coalhada incha-se e absorve umidade e as transformações da caseína pelo coalho e ação enzimática das bactérias são facilitadas. A quantidade de sal pode influir no processo da maturação ao regular e selecionar o desenvolvimento das bactérias, controlando portanto, a formação de ácido láctico e o desdobramento e formação dos produtos de degradação das proteínas, já que as bactérias fortemente proteolíticas são muito sensíveis à ação do sal. O *Lactococcus lactis* subsp *lactis* desenvolve-se a 4% de sal na umidade, mas não a 6,5% e o *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* não se desenvolve em meios com 4% de sal ou mais (ILCT, 1977).

Para poder compreender a ação do sal como elemento inibidor do desenvolvimento das bactérias, deve-se relacionar o conteúdo de sal do queijo com sua umidade. Na realidade, o sal no queijo encontra-se dissolvido na água retirada no produto (ILCT, 1977).

Desta forma, como as bactérias necessitam da água para se desenvolver, pode-se entender que uma porcentagem de sal aparentemente baixa no queijo pode atuar como agente de controle microbiano, especialmente quando atua em conjunto com a acidez (ILCT, 1977).

Embora genericamente existam três tipos de salga, na massa, na superfície e em salmoura, o queijo Prato é normalmente salgado em salmoura.

3.2.7.1-Processo de Salga em Salmoura

A salga em salmoura consiste na imersão dos queijos em uma solução de cloreto de sódio de concentração aproximadamente igual a 20% (p/v), numa temperatura de 12°C por tempo de exposição que varia de acordo com o peso e o formato do queijo. Por exemplo, o queijo Prato variedade Lanche de 1,0kg deve permanecer 24 horas na salmoura, com pH ajustado para 5,3 (FONSECA, 1986; FURTADO & SOUZA, 1981; OLIVEIRA, 1986).

No processo de salga em salmoura, o sal penetra no queijo através do processo osmótico, caracterizado pela troca de líquidos de diferentes concentrações no sentido salmoura-queijo-salmoura (FURTADO & SOUZA, 1981).

3.2.8-Embalagem

Praticamente todo queijo Prato fabricado no Brasil é comercializado em embalagens plásticas seladas à vácuo. A embalagem visa, principalmente, proteger os queijos contra a invasão de microrganismos e a perda de umidade por evaporação na superfície externa, protegendo os queijos durante a maturação e armazenamento, além de servir como embalagem definitiva para a comercialização. De modo geral, na elaboração do queijo Prato, o produto é embalado no período entre 1 a 2 dias após a salga (OLIVEIRA, 1986).

3.3-Maturação

O queijo fresco é constituído por caseína, gordura, sais insolúveis e parte da

água do leite, que por sua vez contém lactose, ácido láctico, sais solúveis, outros constituintes do leite e cloreto de sódio (ILCT, 1977).

As características iniciais do queijo vão mudando, e estas mudanças aparentes das propriedades físicas e do odor são resultantes de mudanças químicas dos diferentes componentes da coalhada fresca e constituem o processo de maturação (ILCT, 1977).

Define-se maturação como sendo o período em que os queijos são deixados em "condições especiais" visando dar oportunidade à ocorrência de modificações químicas, físicas e microbiológicas, a fim de transformar a massa insípida e sem forma definida do início, em um produto rico em aroma e sabor e com textura, consistência e coloração próprias (KOSIKOWSKI, 1978; WANDECK, 1972).

A maturação de queijo é um processo complexo que envolve uma série de reações bioquímicas, que podem ser agrupadas em proteólise, lipólise e metabolismo de lactose/lactato. A extensão e o tipo de estocagem, temperatura, composição do queijo (especialmente umidade e concentração de sal), tipos de atividade enzimática, microrganismos presentes, bem como mudanças físicas e químicas que ocorrem durante a maturação determinam as qualidades organolépticas do queijo (LAW, 1987).

A maturação do queijo compreende três estágios: fabricação, maturação primária e maturação secundária. Na fabricação o leite é inoculado com bactérias que produzem ácido láctico a partir da lactose. O leite inoculado é coagulado pela ação da renina e o coágulo depois é aquecido, dessorado, salgado, prensado e embalado para estocagem. O processo de maturação ocorre durante a estocagem do queijo que antecede o consumo. A maturação primária do queijo inclui a hidrólise de proteínas e polipeptídeos a pequenos peptídeos e aminoácidos. Este processo contribui para o "flavour" e a textura do queijo. A maturação secundária, que ocorre simultaneamente com a maturação primária, inclui a modificação desses aminoácidos. O produto da maturação secundária (aminas, aldeídos, etc.) está presente em baixas concentrações

no queijo (nanogramas/grama de queijo) e contribui para o "flavour", textura e aroma (LAW, 1987). A Figura 01 mostra as principais transformações que ocorrem durante o processo de maturação dos queijos.

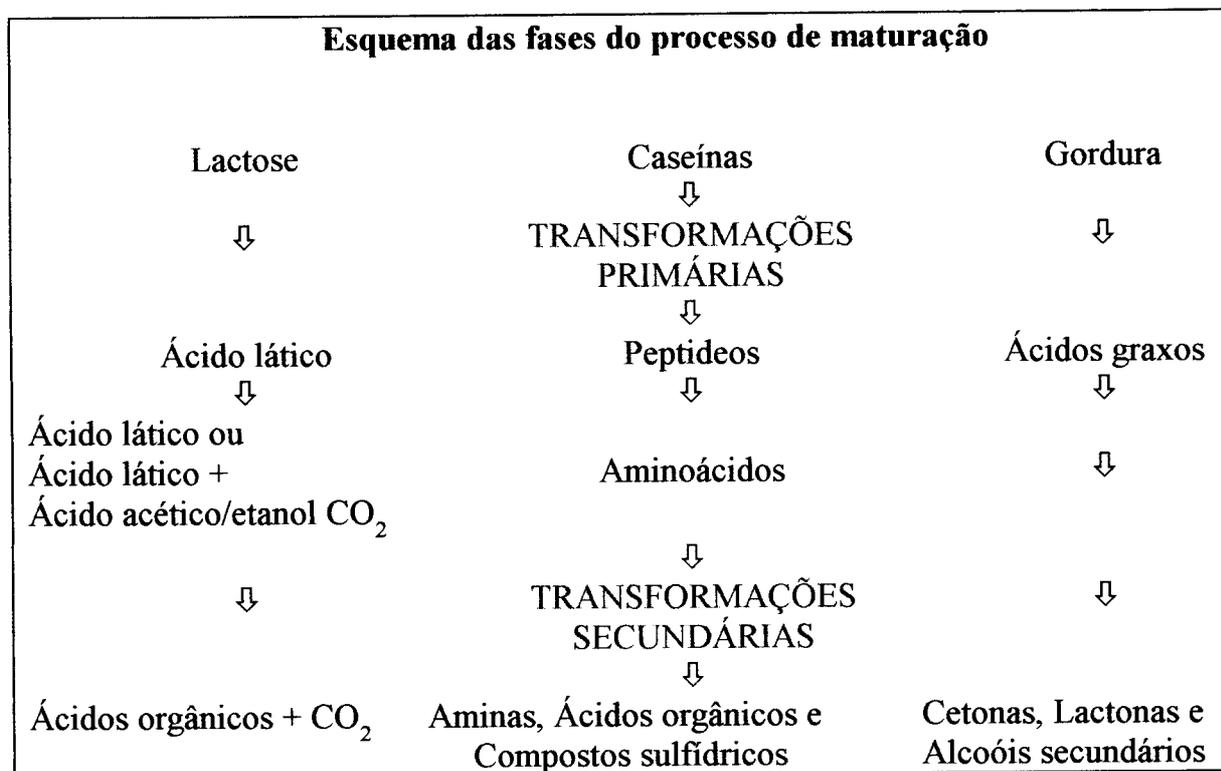


FIGURA 01: Representação esquemática dos processos de transformações químicas ocorridas durante as fases da maturação dos queijos.

3.3.1-Fermentação da Lactose

A transformação da lactose em ácido láctico por ação bacteriana começa ainda antes de adicionar o coalho ao leite, continua durante todo o processamento da coalhada no tanque e na prensa (ILCT, 1977).

Durante o trabalho do grão no soro, o ácido láctico se forma mais rapidamente dentro do grão do que no soro, porque o grão retém quase 90% dos microrganismos presentes no leite. Deste modo, parte apreciável da acidez do soro provém dos grãos, por osmose e também por efeito de sinérese que ocorre devido à contração dos grãos. Este fato é evidenciado quando se retira parte de soro depois do corte; a acidez no soro remanescente aumenta de imediato mais rapidamente do que antes, pois o soro ácido que sai do grão passa a diluir-se em menor quantidade de soro circundante (ILCT, 1977).

A lactose não é metabolizada diretamente por nenhum organismo; ela é hidrolisada pela β -galactosidase, que é uma endoenzima, em glucose e galactose. A glucose é rapidamente transformada, ao passo que a galactose pode continuar presente por um longo período. A fermentação é caracterizada pela formação de ácido láctico acompanhada pelo aparecimento de ácidos voláteis, álcool e pequenas quantidades de outros produtos secundários (ILCT, 1977).

Este ácido láctico, por sua vez, à medida que vai se formando reage com o paracaseinato bicálcio da coalhada dando origem ao paracaseinato monocálcio e, quando há excesso de ácido láctico, este hidrolisa o paracaseinato monocálcio para formar paracaseinato e lactato de cálcio (ILCT, 1977).

Com acidificação progressiva, a coalhada sofre transformações e se torna cada vez mais elástica, podendo esticar, especialmente se for submetida à ação do calor. Com a continuação da acidificação e formação do paracaseinato livre, a coalhada perde a elasticidade e torna-se dura e quebradiça, porque o paracaseinato é insolúvel, e a presença de componentes “tampão”, que vão equilibrando a reação, intervém acentuadamente na composição da proteína e nas características de textura e corpo do queijo (ILCT, 1977).

A importância do ácido láctico na fabricação e na maturação do queijo, deve-se

ao fato de sua ação favorecer a coagulação, estimular a sinérese, dar plasticidade à massa da coalhada, ajudar a ação proteolítica das enzimas do coalho e regular a ação das enzimas dos microrganismos (ILCT, 1977).

3.3.2-Proteólise

Sendo a maturação de queijo Prato predominantemente proteolítica, é de se ressaltar a importância deste processo na textura e formação do "flavour" do queijo. A combinação de endopeptidases, oriundas da atividade coagulante secundária, das bactérias do fermento, da microflora secundária e de proteinases nativas do leite (plasmina) atuam nas proteínas do queijo, quebrando sua estrutura e originando mudanças no corpo e textura. As enzimas também dão origem a peptídeos que atuam como substratos principalmente para as enzimas intracelulares da microflora do queijo, responsáveis pela liberação de aminoácidos. Esses aminoácidos contribuem para o desenvolvimento do "flavour" característico no queijo, sendo precursores de seus componentes voláteis (LAW, 1987).

A caseína é hidrolisada a peptídeos pela quimosina e por proteinases dos microrganismos do fermento láctico. Muitos destes peptídeos podem ser amargos (ou não ter nenhum sabor em potencial) dando origem, pela ação das peptidases intracelulares dos fermentos, a aminoácidos e peptídeos pequenos que tenham propriedades de intensificar o sabor (KIRBY, 1989).

As principais proteínas do leite são as caseínas que floculam quando o pH do leite atinge o valor de aproximadamente 4,5. A floculação ácida contém cerca de 75% de α -caseína, 22% de β -caseína e 3% de κ -caseína (YAMAUCHI, 1992).

3.3.2.1-Mecanismo de Degradação da Proteína durante a Maturação

O coalho é o primeiro agente proteolítico envolvido no mecanismo de degradação da caseína na fabricação de queijos como um todo, e do queijo Prato em

particular. O processo de coagulação envolve um estágio enzimático no qual a renina (quimosina) hidrolisa a ligação peptídica Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -caseína, solubilizando uma fração desta proteína, denominada de glucopeptídeo (DESMAZEAUD et al., 1976; SCOTT, 1986; WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

Segundo LAW (1987), embora a função da renina (quimosina) no processamento de queijos seja a formação do coágulo, ela está envolvida na hidrólise da proteína durante o processo de maturação, uma vez que fica retida no coágulo, mesmo após o processo de dessoragem e prensagem final da massa.

Aproximadamente 6% da quimosina adicionada ao leite na fabricação de queijo Cheddar é retida na coalhada, e em muitas variedades de queijos tem sua ação principal na proteólise inicial das caseínas (FOX et al., 1996).

As frações α S₁, α S₂ e β -caseína não são hidrolisadas durante a coagulação do leite mas podem ser hidrolisadas durante a maturação do queijo (FOX et al., 1996).

A primeira ação da quimosina na paracaseína é a hidrólise da α S₁-caseína nos fragmentos 1-23 e 24-199. Isto contribui para a formação da fração solúvel (NS) e subsequente quebra desta fração, pelas proteinases da membrana celular das bactérias “starters”, em pequenos fragmentos. Finalmente tais fragmentos são hidrolisados, por outras peptidases, em aminoácidos e pequenos peptídeos, como indica a Figura 02. (VAN DEN BERG & EXTERKATE, 1993).

A hidrólise da fração α S₁-caseína ao peptídeo α S₁-I provoca o enfraquecimento da rede protéica. Acredita-se que a clivagem da banda Phe₂₃-Phe₂₄ possa ser responsável pela maciez na textura do queijo e o pequeno peptídeo (α S₁CN f 1-23) é novamente hidrolisado pelas proteinases das bactérias “starters” (FOX et al., 1996).

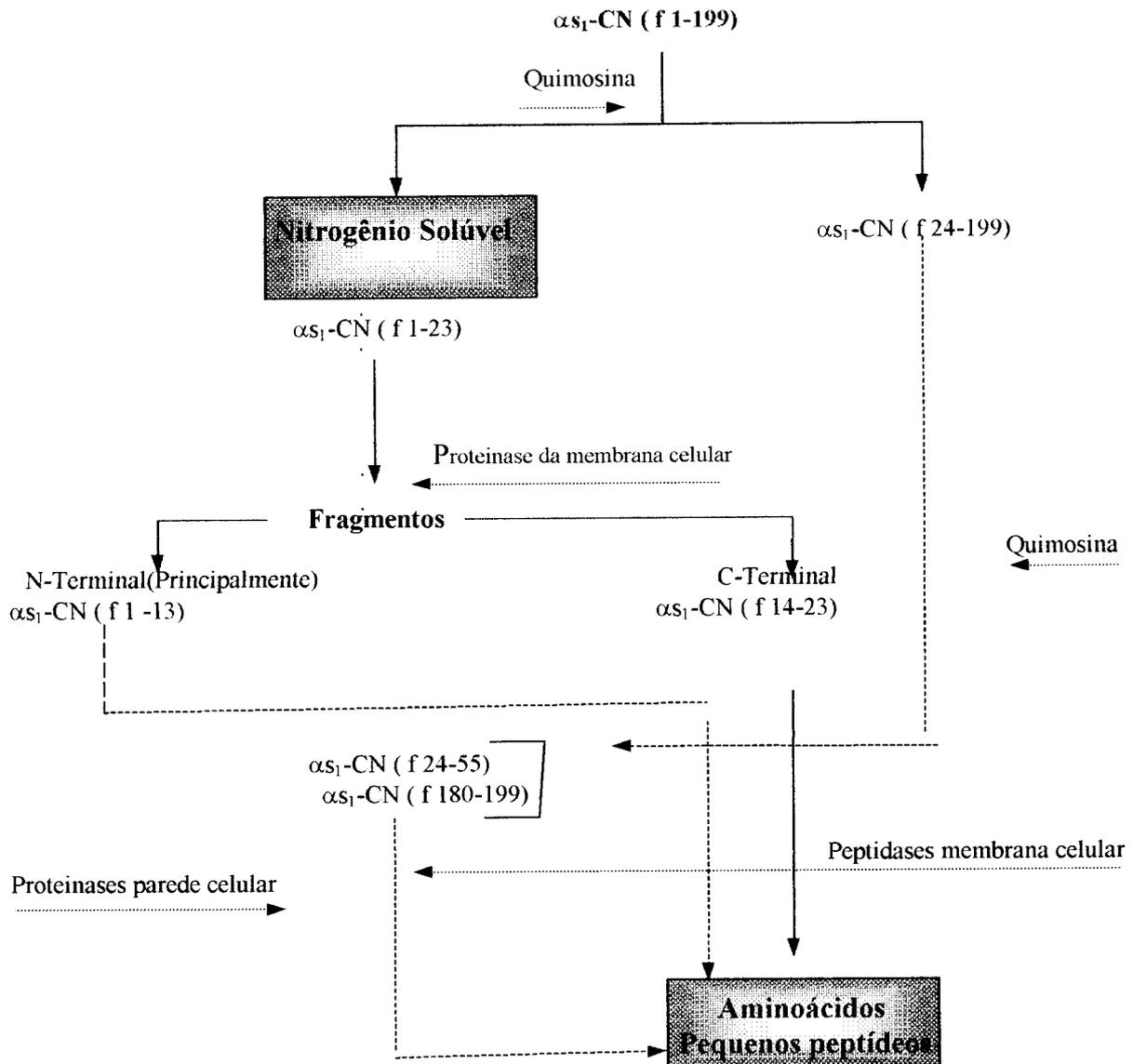


FIGURA 02: Rotas da proteólise da α_1 -caseína em queijo fabricado usando-se bactérias “starters” mesofílicas (VAN DEN BERG & EXTERKATE, 1993).

* Os números entre parenteses representam o número de resíduos de aminoácidos na α_1 -caseína. O fragmento α_1 -CN (f 1-13) acumulado no queijo é lentamente convertido.

_____ Rota primária; - - - - - Rota secundária.

Nos primeiros estágios da maturação do queijo a maior parte do nitrogênio solubilizado é procedente da hidrólise da fração α_1 -caseína pela ação da renina. Posteriormente, a fração β -caseína começa a ser degradada mais lentamente e em menor quantidade devido, principalmente, ao aspecto inibidor do cloreto de sódio existente na fase aquosa do queijo, contribuindo com a fração de nitrogênio solúvel

(VAN DEN BERG & EXTERKATE, 1993).

DESMAZEAUD et al. (1976), relataram que em vários trabalhos realizados com queijos processados apenas com coalho, sem a participação do fermento láctico, pode ser observado que nos primeiros estágios de maturação a renina agia vigorosamente sobre a fração α_1 -caseína, mostrando com isso, que a ação da renina representa uma importante parte na proteólise dos queijos durante a maturação. Os autores relataram também que estudos eletroforéticos mostraram que a ação da renina sobre a fração β -caseína foi menos intensa do que sobre a fração α_1 -caseína.

Já com relação à ação das peptidases das culturas lácticas na fabricação dos queijos, pode-se dizer que a mesma está relacionada mais especificamente com a proteólise secundária, agindo sobre os compostos nitrogenados resultantes da proteólise primária, liberando peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres. Isto porque as culturas lácticas possuem principalmente atividade de aminopeptidase e, com menor intensidade, de endopeptidase, diferindo assim, da ação do coalho que não produz ou libera aminoácidos livres mas libera, principalmente, peptídeos de elevado peso molecular (DEMAZEAUD et al., 1976).

3.3.2.2- Processos Enzimáticos

A fabricação e a maturação de queijos coagulados pela renina são processos essencialmente enzimáticos, provenientes de quatro ou cinco fontes: coalho, leite, culturas "starters", culturas não "starters" e inóculo secundário (em certos tipos de queijo). Essas enzimas podem ser exógenas ou endógenas (FOX & STEPANIAK, 1993).

3.3.2.2.1-Enzimas exógenas

Excluindo o uso de enzimas adicionadas para acelerar a maturação, somente

duas enzimas são empregadas tradicionalmente na fabricação de queijos: proteinases como coagulantes em todos queijos em que se utiliza renina; e lipases convencionalmente usadas em certas variedades de queijos italianos (FOX & STEPANIAK, 1993).

Na fabricação do queijo tipo Prato normalmente, utiliza-se coalho bovino, que contém aproximadamente 20% de quimosina mais 80% de pepsina, para efetuar a coagulação enzimática do leite. A quimosina é uma enzima proteolítica (proveniente do coalho) que tem ação na α_1 -caseína, que é rápida e é completamente hidrolisada a α_1 -I e em outros peptídeos. Também a α_2 -caseína em solução é susceptível à ação da quimosina (FOX & STEPANIAK, 1993).

3.3.2.2.2-Enzimas endógenas

O leite possui cerca de sessenta enzimas, das quais algumas já foram isoladas e caracterizadas. Muitas dessas enzimas contribuem em vários aspectos para a maturação de queijos, porém o mecanismo do processo ainda não foi totalmente esclarecido (FOX & STEPANIAK, 1993).

As enzimas endógenas que mais contribuem para a maturação do queijo são: plasmina, lipase lipoprotéica, fosfatase ácida e xantina oxidase. Todas essas enzimas, exceto a lipase, são resistentes a pasteurização a 72°C/15seg. (FOX & STEPANIAK, 1993).

A plasmina é a proteinase nativa do leite mais importante, que hidrolisa proteínas e peptídeos a nível de resíduos Lys-x que contribuem para formação do "flavour". O leite contém sistemas de plasminas: plasmina, plasminogênio, inibidores da plasmina, ativadores plasminogênicos e inibidores dos ativadores plasminogênicos. A plasmina, plasminogênio e ativador da plasmina são associados à micela de caseína e são incorporadas ao coágulo originário da fabricação do queijo. Já o inibidor da

plasmina e inibidor do ativador plasminogênico estão presentes no soro e são perdidos na dessoragem (FOX & STEPANIAK, 1993).

A β -caseína é hidrolisada mais rapidamente pela plasmina que a α_1 -caseína no leite. Já a α_2 -caseína é também rapidamente hidrolisada pela plasmina em diversos peptídeos. A κ -caseína e as proteínas do soro são resistentes à ação da plasmina (FOX & STEPANIAK, 1993).

A atividade da plasmina no queijo é afetada por diversos fatores (VAN DEN BERG & EXTERKATE, 1993), dentre os quais destacam-se:

- 1- Quantidade presente no leite (época): há uma diferença periódica (sazonal) na quantidade de enzima presente no leite, geralmente nas micelas de caseína;
- 2- Intensidade da pasteurização do leite: a atividade é aumentada pela pasteurização do leite antes da fabricação do queijo;
- 3- Temperatura de cozimento: um aumento na temperatura de cozimento estimula a atividade da plasmina;
- 4 - pH durante a preparação da coalhada: como a associação da plasmina com a caseína é reduzida em pH baixo, durante a preparação da coalhada, em que o pH está baixo, há liberação de plasmina que é perdida no soro;
- 5- Concentração de sal no queijo: a concentração ótima de sal na umidade do queijo é de 2% (DELACROIX-BUCHET&TROSSAT, 1991), e
- 6- pH do queijo: plasmina tem atividade maior em pH alto, com um nível ótimo entre 7,5-8,0 (FOX & STEPANIAK, 1993).

VISSER & DE GROOT-MOSTERT (1977) mostraram a contribuição da plasmina em queijo tipo Gouda, que é muito semelhante ao queijo tipo Prato (massa semi-cozida e lavada), pela aparição de peptídeos de baixo peso molecular e pequenas quantidades de aminoácidos, principalmente Lys, Ser e Glu, contribuindo desta forma para a formação de aroma e sabor dos queijos, só que em menor proporção que as produzidas pelas enzimas do coalho e culturas "starters".

Para aumentar a velocidade das reações bioquímicas e químicas que ocorrem no período de cura do queijo, é necessário fazer uso de uma tecnologia de aceleração que alcance esse objetivo sem alterar a qualidade do produto final. Segundo KIRBY (1989), os principais objetivos almejados com a aceleração da maturação são:

- incremento na margem de benefícios para os fabricantes;
- aumento da confiabilidade do desenvolvimento do sabor curado;
- compensar as mudanças de sabor produzidas pela introdução de tecnologia nova;
- incrementar a gama de produtos/sabores disponíveis para o consumidor.

3.3.3- Processos para acelerar a maturação

Existem vários métodos utilizados para acelerar a maturação. Dentre eles, destacam-se a elevação da temperatura de maturação, a modificação das bactérias do fermento láctico, a produção de "slurry cheese" e a adição de enzimas extracelulares.

3.3.3.1-Elevação da temperatura de maturação

Ainda que a elevação da temperatura de maturação seja um dos melhores métodos disponíveis (fácil execução e custo baixo), poucos trabalhos têm sido realizados a nível internacional sobre o assunto. NUÑEZ et al.(1986) mostraram um aumento de aproximadamente 90% no nitrogênio solúvel em queijo Manchego maturado a 20°C, quando comparado com o queijo maturado a 5°C.

O método de elevação da temperatura tem possibilidades significativas desde que aplicado de um modo cuidadoso. Alguns critérios de composição do queijo que foram estabelecidos por KIRBY (1989) para serem seguidos antes de pôr em prática o método, aparecem na Tabela 02.

É necessário ter o queijo na composição correta. Os níveis de sal e umidade (expressos por teor de sal na umidade) são importantes em qualquer queijo; se a temperatura de cura do queijo vai ser aumentada é recomendável manter estes

parâmetros dentro dos intervalos mostrados. A recomendação é que as bactérias que não são do fermento (particularmente bactérias lácticas na coalhada) devem ser de 1000g^{-1} na coalhada. O limite superior de temperatura para a maturação acelerada deverá ser de 15°C . Qualquer temperatura superior pode acarretar problemas na textura do queijo, resultando em uma pasta arenosa (KIRBY, 1989).

TABELA 02-Composição ideal do queijo utilizado para aceleração de maturação pelo método de elevação da temperatura.

Sal em umidade	4,0-5,0%
pH	5,3
Bactérias na coalhada(exceto fermento)	1000g^{-1}
Esporos na coalhada	ausente em 1g

Alguns fabricantes têm utilizado a combinação de vários métodos de aceleração a fim de se reduzir o tempo de cura. A combinação da elevação da temperatura, aumento na população de bactérias modificadas (lactose negativa, proteinase negativa), e adição de neutrase à coalhada do queijo foi estudada por FEDRICK et al. (1986) para acelerar a maturação. De acordo com o estudo, a elevação da temperatura (16°C versus o usual 8°C) garantiu uma redução de 50% no tempo de maturação. Tem sido especulado que a caseinólise, peptidólise e o desenvolvimento do sabor proveniente dos aminoácidos precursores podem ser afetados pelo aumento da temperatura (KIRBY, 1989).

3.3.3.2- Modificação das bactérias do fermento láctico

É um método de aceleração onde são empregadas células bacterianas atenuadas que perderam a capacidade de produzir ácido em excesso a partir da lactose. O queijo

apresentando pouca concentração de ácido não possui o pH baixo, o que deixa a massa macia e não quebradiça. Para se atenuar as bactérias utilizam-se principalmente o choque térmico, a lisozima ou a alteração genética.

3.3.3.2.1-Choque térmico

O choque térmico consiste em aplicar calor ou baixas temperaturas por um determinado período de tempo (que varia de acordo com as cepas) nas bactérias do fermento, deixando-as com capacidade reduzida de fermentar a lactose, sem no entanto, alterar seu sistema enzimático que é de suma importância para o processo de maturação (KIRBY, 1989).

EL ABBOUDI et al. (1991) realizaram um trabalho com tratamento térmico pelo calor em *Lactobacillus*, verificando que bactérias tratadas a 67°C/22seg. e adicionadas ao leite antes da coagulação apresentaram uma boa taxa de incorporação e distribuição homogênea no queijo Cheddar. Também se obteve um aumento na lise das células aumentando assim a velocidade das reações de proteólise e peptidólise.

A adição de células tratadas com o calor tem grande importância para suplementar sistemas enzimáticos. O aumento potencial na proteólise do queijo tem especial consideração na degradação da caseína, de modo que o processo de degradação permanece balanceado. Esta degradação balanceada é de grande importância na eliminação de peptídeos amargos devido ao fato das células tratadas pelo calor serem uma fonte suplementar não somente de proteases mas também de peptidases. Estas talvez hidrolisem peptídeos responsáveis pelo sabor amargo no queijo quando se faz uso, por exemplo, de Neutrase® para acelerar a maturação (EL SODA & PANDIAN, 1991). A adição de *Lactobacillus* também permite simultaneamente o aumento das enzimas proteolíticas e sistema enzimático supostamente responsáveis pela conversão dos produtos de proteólise a componentes do sabor.

O método do choque térmico pelo calor é simples e conveniente e não interfere com o processo de fabricação do queijo. Na adição a técnica não representa barreiras legais ou complicações tecnológicas, pois pode ser feita em uma unidade de pasteurização que é acessível em qualquer fábrica de queijos (EL ABOUDI et al., 1991).

As bactérias tratadas termicamente pela baixa temperatura (freeze-shocked) de *L. helveticus* mostraram acelerar a proteólise, o desenvolvimento do sabor e a degradação de peptídeos responsáveis pelo amargor quando adicionada em queijo Gouda (EL SODA & PANDIAN, 1991). Esse método é menos utilizado que o de calor por ser um processo tecnologicamente mais complicado

3.3.3.2.2-Lisozima

A lisozima é uma enzima exógena capaz de lisar a parede celular polissacarídica do fermento deixando-o sem capacidade de metabolizar a lactose do queijo, não produzindo ácido. O método da lisozima é pouco utilizado para se atenuar células do fermento, pois existem métodos mais eficazes, como o choque térmico e alteração genética. A lisozima tem seu uso dirigido para prevenção do crescimento de *Cl. tyrobutyricum* em queijos tipo holândes e suíço e como alternativa para uso do nitrato, evitando o estufamento tardio em países onde o uso de nitrato é proibido (FOX & STEPANIAK, 1993).

3.3.3.2.3-Alteração genética

A alteração genética é um processo onde as bactérias do fermento são modificadas no intuito de aumentar a taxa de proteólise (protease⁺) e diminuir a acidificação do queijo (lactase⁻). A modificação genética tem sido usada para o desenvolvimento da resistência bacteriofágica bem como mecanismos de inibição "in vivo" de microrganismos indesejáveis. A suposição de que a proteólise excessiva

causada pela lac⁻ adicionada ao queijo levaria à formação de sabor amargo, mostrou que é melhor misturar as bactérias mutantes com as starters (EL SODA & PANDIAN, 1991).

STADHOUDERS et al. (1988), investigaram a possibilidade de adição de variedades Prt⁺ ou Prt⁻ às bactérias normais dos starters durante a fabricação de queijo Gouda. Os autores concluíram que culturas exclusivamente Prt⁺ não foram úteis para um bom desenvolvimento de sabor. Entretanto, a presença de 20% de Prt⁻ foi suficiente para levar à máxima proteólise e ao desenvolvimento de sabor.

FARKYE et al. (1990), realizaram experimentos com Prt⁺ *Lact. lactis ssp. cremoris* UC-317 e sua variante Prt⁻ UC-041, para verificar o desenvolvimento de textura e sabor em queijo Cheddar. O trabalho permitiu concluir que há diferenças significativas nos dois casos, com exceção do nitrogênio solúvel em queijo Prt⁺ e Prt⁻ de mesma idade que não apresentaram diferença significativa. Já o queijo Prt⁺ mostrou um alto nível de nitrogênio não protéico durante a maturação. Queijo proteinase positiva teve melhor classificação para desenvolvimento de sabor e textura que proteinase negativa de mesma idade.

O papel que a bactéria exerce na maturação do queijo varia com o gene e a espécie de bactéria alterada (EL SODA & PANDIAN, 1991).

3.3.3.2.4- "Slurry" Cheese

"Slurry" é uma pasta semi-sólida maturada a 30°C por 4-5 dias que contém cerca de 40% de sólidos, 3-5% de solução de cloreto de sódio e fermento. Após o período de maturação, o "slurry" é adicionado na coalhada durante o processo de fabricação de queijo para acelerar a maturação.

Com a intenção de intensificar o desenvolvimento do sabor típico em queijos

“slurries”, a influência da adição de certos aditivos e condições de maturação dos mesmos tem sido estudada por vários pesquisadores. KRISTOFFERSEN et al. (1967) adicionaram aos "slurries" 10 a 100 ppm de glutathione (GSH), que possui a capacidade de dissociar peptídeos e proteger grupos enzimáticos, e verificaram o desenvolvimento completo de sabor em queijo Cheddar (ao longo da formação de ácido butírico), cadeias longas de ácido graxo, aumento de proteína solúvel e aceleração do crescimento de bactérias. SINGH & KRISTOFFERSEN (1970) observaram que a combinação da adição de 100ppm de GSH e incubação a 30°C ou 35°C foi necessária para o desenvolvimento intenso do flavour de Cheddar após 7 dias. Estes pesquisadores também observaram melhora na intensidade do sabor pela agitação diária do "slurry" e adição de citrato de sódio (500ppm), manganês ou $MnSO_4$ (5ppm) e riboflavina (2ppm).

SOOD & KOSIKOWSKI (1979) adicionaram protease de fungos selecionados e preparado de lipase em vários níveis, verificando que enzimas microbiológicas requerem uma quantidade ótima para aceleração do sabor em "slurries" de Cheddar (0,0015% de proteinase fúngica e 0,0003% de lipase). Os "slurries" tratados com enzimas microbianas contêm um alto nível de proteína solúvel, alto teor de ácidos graxos livres, grande quantidade de bactérias, degradação de α_s e β - caseína, e um alto valor de pH.

O método de "slurries" ainda é pouco utilizado para acelerar a maturação de queijos, tendo seu uso dirigido para petiscos, biscoitos e imitações de produtos lácteos (EL SODA, 1993).

3.3.3.2.5- Adição de enzimas extracelulares

A adição de enzimas extracelulares é o método mais direto onde basicamente as enzimas são adicionadas para aumentar a taxa de proteólise e/ou lipólise (proteínases e lipases, respectivamente). Peptidases também são adicionadas na tentativa de aumentar a concentração de aminoácidos livres bem como a proteólise total.

As lipases e proteinases são as principais enzimas utilizadas atualmente, sendo a lipase utilizada para queijos gordos como Azul, Feta, Parmesão etc, onde a lipólise é o fenômeno predominante e responsável pela formação dos ácidos graxos voláteis (KIRBY, 1989).

Dentre as proteinases comerciais mais usadas para a aceleração da maturação destacam-se a Neutrase®, Maxatase®, Rulactine® e Corolase®, sendo que a proteinase mais comumente utilizada é a Neutrase® pura ou em combinação com outras peptidases (EL SODA, 1993).

A adição de proteinases de diversas origens, desde bactérias até fungos, tem sido utilizada para aumentar a degradação protéica, mas muitas delas desenvolvem um sabor amargo no queijo com diminuição do rendimento. A protease que tem apresentado melhores resultados é protease neutra de *Bacillus subtilis* (CARVALHO & SILVA, 1993).

A Neutrase® é enzima extracelular produzida por uma cepa selecionada de *Bacillus subtilis*, sendo uma endoprotease bacteriana, aplicável na maioria dos casos em que se queira degradar de maneira moderada ou extensiva, uma substância protéica em peptídeos. É uma metaloprotease (Zn) estabilizada com Ca^{+2} e as suas condições ótimas de funcionamento são 45-55°C e pH de 5,5-7,5. Sua estabilidade a uma certa temperatura é afetada pelo tipo e concentração das proteínas presentes. A hidrólise das proteínas utilizando-se a Neutrase ® resulta na quebra das macromoléculas de proteína a pequenos peptídeos e, no caso de serem usadas enzimas adicionais, a aminoácidos (NOVO NORDISK).

LAW & WIGMORE (1982) mostraram que a Neutrase® combinada com peptidases produzidas por *Lactococcus* resulta em um queijo aceitável. Esses experimentos conduziram ao desenvolvimento de um produto comercial conhecido como "Accelase".

O uso de uma única enzima tem apresentado distúrbios no equilíbrio dos componentes que formam o sabor do queijo. Portanto, foram desenvolvidos "Coquetéis de enzimas" como o "Naturage" (protease + peptidase + cultura), "Flavourage" (protease + lipase), e a "Accelase" (protease + peptidases) (EL SODA, 1993), como mostra a Tabela 03.

Na tentativa de diminuir essa alteração no sabor quando da adição de uma única enzima, vários autores têm utilizado combinações de métodos de aceleração e coquetéis de enzimas

TABELA 03- Misturas de enzimas usadas para a maturação de queijo.

Nome	Mistura enzimática	Produtor
Naturage	Protease +Peptidase +cultura	Miles
Flavourage	Protease + Lipase	Hansen's Laboratories
Accelase	Protease + Peptidase	Imperial Biotechnology

Os métodos de adição de enzimas aos queijos consistem em uma das maiores limitações ao uso de enzimas extracelulares para acelerar a maturação. Se as enzimas são adicionadas ao leite, a caseína (que é o principal substrato) é atacada prematuramente e pequena parte da enzima é retida na massa, o que aumenta o custo, além de inviabilizar o soro. A adição de proteinases ao leite também resulta em uma redução no rendimento do queijo e no aparecimento de defeitos de sabor durante a fabricação e no estágio próximo da maturação. Um método para reter as enzimas seria a adição à coalhada utilizando sal como diluente e veículo (EL SODA, 1993; KIRBY, 1989).

A adição de enzimas à coalhada é eficiente somente no caso de queijos em que

a remoção do soro é feita antes da prensagem dentro da sua forma final (EL SODA, 1993).

A eficiência de qualquer enzima adicionada à coalhada para acelerar a maturação depende dos seguintes fatores (WILKINSON et al., 1992):

- dosagem da enzima, proporção de peptidase para atividade da proteinase,
- distribuição uniforme da enzima na coalhada (para evitar manchas avermelhadas oriundas da atividade proteolítica),
- estabilidade da enzima na coalhada,
- substrato específico,
- quantidade de enzima perdida na prensagem e temperatura de armazenamento do queijo.

TYE et al. (1988) utilizaram uma protease bacteriana adicionada ao leite pasteurizado na fabricação do queijo Cheddar obtendo um produto maturado mais rapidamente que o queijo controle produzido tradicionalmente. Aminoácidos com sabor doce (serina, glicina, hidroxiprolina, prolina, treonina e valina) e aqueles que conferem um sabor amargo (metionina, histidina, lisina, leucina, isoleucina, arginina e fenilalanina) apareceram em concentrações mais altas no queijo com adição de protease. Na análise sensorial os queijos com adição de protease obtiveram preferência na escala hedônica alcançando pontuações superiores ao controle.

TRÉPANIER et al. (1992) utilizaram a associação de três processos: *L. casei-casei* L2A para controlar a microflora indesejável, células de *L. casei-casei* L2A tratadas termicamente pelo calor na concentração de 1,0%, e Neutrase® na concentração não maior que 1.010^{-5} AU/g de queijo, e concluíram que este sistema levou a um aumento de 60% na intensidade do sabor de queijo Cheddar quando comparado com o queijo controle.

MINUSSI et al. (1995) estudaram três métodos de aceleração de maturação de

queijo tipo Prato. Os queijos foram elaborados usando-se fermento com maior número de células viáveis (cultura concentrada), cultura em meio hidrolisado e cultura tradicional adicionada de mistura de enzimas proteolíticas e lipolíticas e observaram um aumento progressivo do teor de nitrogênio solúvel dos queijos, medido pelo índice de extensão de maturação. Entretanto, todos os queijos apresentaram gosto amargo após sessenta dias de maturação.

NUÑEZ et al. (1986) observaram maior degradação de α_s e β -caseína na maturação de queijo Manchego produzido pela adição de Neutrase a 0,004 Anson/litro de leite, com um concomitante aumento no sabor e redução no tempo de cura.

A Tabela 04 mostra as diversas formas da adição de enzima no queijo segundo LAW (1987).

TABELA 04 - Métodos alternativos de adição de proteinase no queijo.

	Direto ao leite	Encapsulamento	Direto na coalhada
Distribuição	Boa	Boa	Pobre
Textura da coalhada	Pobre	Normal	Normal
Rendimeto	Reduzido	Normal	Normal
Contaminação do soro	Completa	nenhuma (?)	soro pós prensagem

O encapsulamento consiste num sistema onde as enzimas são revestidas por gelatina, gordura de leite ou lipossomas de fosfolipídeos, que liberam as enzimas após a dessora quando a maturação se inicia, evitando a perda e a contaminação do soro (KIRBY, 1989).

Usando este método, a indústria de queijo pode rapidamente explorar o sistema de enzimas para variedades de queijos como Cheddar, que são salgados internamente. A distribuição não é perfeita, entretanto; queijos de superfícies salgadas não são

susceptíveis a tal tratamento. Idealmente a enzima pode ser adicionada ao leite para proporcionar um sistema homogêneo de distribuição, independentemente da técnica de fabricação (LAW, 1987), o que pode ser conseguido através do microencapsulamento. LAW & KING (1985), usaram lipossomas para adicionar proteinase neutra de *B. subtilis* ao leite para fabricação de queijo Cheddar e obtiveram êxito, permanecendo cerca de 90% das enzimas na coalhada. O encapsulamento pode portanto, proporcionar a futura geração de métodos enzimáticos para maturação de queijo, porém necessita de estudos mais aprofundados (LAW, 1987).

3.3.4- Índice de Maturação

A detecção e quantificação dos produtos de degradação das proteínas do queijo são usados como parâmetros para expressar o índice de maturação, uma vez que a extensão da degradação das proteínas tem implicações diretas no desenvolvimento da textura, sabor e aroma da maioria dos queijos maturados. (LAW, 1987).

O índice de maturação dos queijos se caracteriza pela quantidade de substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular que se tornam solúveis na fase aquosa do queijo, através da ação da renina sobre a caseína. Essas substâncias são acumuladas durante a maturação e são referidas como porcentagens do nitrogênio total presentes no queijo (KOSIKOWSKI, 1978; LAW, 1987; WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

A precipitação fracionada (ou solubilização), visa a separação dos componentes nitrogenados em diferentes frações solúveis e seu conteúdo é determinado pelo método de Kjeldhal. Ela oferece a base dos métodos mais simples e rápidos para a medida da quantidade de proteínas do queijo solubilizadas pela ação de enzimas proteolíticas (LAW, 1987; VISSER, 1977). Estas técnicas estão resumidas na Tabela 05. A solubilidade em água ou em pH 4,6 é, provavelmente, o método mais usado para o fracionamento inicial dos compostos nitrogenados do queijo, ou como um índice bruto de proteólise (FARKYE et al., 1990).

Segundo CHRISTENSEN et al. (1991) a solubilização em tampão citrato, seguida por precipitação a pH 4,6, é um procedimento eficiente e deve ser preferido porque apresenta melhor dispersão a pH 7-8, é prático para determinação do conteúdo de nitrogênio total na solução de queijo onde os componentes não nitrogenados precipitam.

TABELA 05: Composição de frações nitrogenadas solúveis usadas como índice de maturação de queijos (LAW, 1987).

ÍNDICE	COMPOSIÇÃO
N solúvel em água (água, soluções salinas, pH 4,6)	Proteínas, peptídeos, aminoácidos.
N não protéico (solúvel TCA, solúvel em água)	Peptídeos, aminoácidos.
N solúvel SSA N solúvel PTA N solúvel ácido pícrico	Peptídeos muito pequenos, aminoácidos.

TCA: ácido tricloroacético

SSA: ácido sulfosalicílico

PTA: ácido fosfotúngstico

3.3.5-Índice de Profundidade de Maturação

O índice de profundidade de maturação dos queijos abrange as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, que se acumularam durante o período de maturação, como os aminoácidos livres e os peptídeos de baixo peso molecular, pela ação das enzimas microbianas (GRIPON et al., 1975; LAW, 1987; WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

A precipitação de componentes nitrogenados com TCA tem sido utilizada em diferentes concentrações, variando de 2-2,5% a 12%, sendo que estes valores se referem à concentração de TCA ao final da solução.

KUCHROO & FOX (1982) demonstraram que 44% do nitrogênio solúvel em pH 4,6 foi solúvel em TCA 12%. A fração solúvel em TCA 12% contém pequenos peptídeos e aminoácidos. O TCA apresenta bons resultados quando usado no subfracionamento da fração solúvel em pH 4,6 e em água (CHRISTENSEN et al., 1991). A fração solúvel em TCA 12% tem sido usada como um indicador para a maturação do queijo. Foi verificado que a ação das enzimas do fermento levam à formação de pequenos peptídeos e aminoácidos, que são a fonte de detecção do nitrogênio solúvel com este reagente.

A profundidade da maturação pode ser quantificada através do teor de nitrogênio não-protéico (NNP) solúvel em solução de ácido tricloroacético, quantificada pelo método de Kjeldahl e expresso como porcentagem do nitrogênio solúvel total, expresso por $NNP/NT \times 100$ (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

3.3.6- Lipólise

Durante o processo de maturação, as enzimas lipolíticas presentes nos queijos são responsáveis pela degradação da fração lipídica, liberando ácidos graxos livres, os quais são componentes importantes no desenvolvimento do aroma em queijos maturados (SCOTT, 1986).

Quando não é feita a adição de lipase no processo de fabricação, a lipase microbiana é a principal responsável pela hidrólise dos ácidos graxos durante o período de maturação, já que a lipase nativa do leite é inativada no processo de pasteurização (RENNER, 1987).

De acordo com SCOTT (1986), embora o aroma desenvolvido nos queijos maturados seja uma mistura química extremamente complexa, os ácidos graxos que mais contribuem na sua formação são: ácido butírico (C_4), ácido capróico (C_6), ácido caprílico (C_8), ácido cáprico (C_{10}), ácido láurico (C_{12}) e ácido mirístico (C_{14}). Todos estes ácidos graxos de cadeias curtas podem dar origem a compostos mais simples

como as cetonas, que representam um dos principais componentes do aroma em queijos maturados.

Segundo BONASSI (1978), dentre os compostos que contribuem para a formação do aroma em queijo Prato, estão incluídos os ácidos graxos. Através de uma avaliação quantitativa dos ácidos graxos livres voláteis liberados durante a maturação, foi possível constatar que o queijo Prato apresentou, no final de sessenta dias de maturação, maiores concentrações de ácido acético (75,2mg/100g de queijo) e butírico (41,4mg/100g de queijo), valores médios de ácido capróico (20,1mg/100g de queijo) e quantidades bem pequenas para os ácidos propiônico (2,5mg/100g de queijo) e isovalérico (1,3mg/100g de queijo).

3.3.7- Textura e maturação

As características reológicas de textura são de fundamental importância na aceitação de produtos alimentícios uma vez que estão associadas às propriedades sensoriais, sendo que estas características são percebidas principalmente pelos órgãos do tato. (CAMPOS, 1989).

As características reológicas servem como parâmetros das condições de processo e dimensionamento de equipamentos, pois a partir da análise reológica podem-se controlar alguns atributos conferidos ao produto pelo próprio consumidor, permitindo assim, ao fabricante, obter um produto com qualidade satisfatória e com economia de produção. (CAMPOS, 1989).

A percepção sensorial da textura depende principalmente da deformação resultante da aplicação de pressão e/ou das propriedades de superfície, tais como rugosidade, suavidade ou adesividade, avaliadas pelo sentido do tato.

As propriedades reológicas dos queijos afetam a consistência percebida na boca, o uso do produto (por exemplo, o corte), a garantia de manutenção do seu

formato, dentre outras. Essas propriedades variam de acordo com o tipo de queijo e podem mudar durante a maturação. Conseqüentemente, a consistência é um importante símbolo de qualidade. A consistência depende da composição do queijo, notadamente dos teores de umidade, gordura e sal, do pH e da degradação de proteínas (VISSER, 1991).

Durante a maturação ocorrem várias mudanças que podem ser importantes no desenvolvimento da textura: a) a estrutura e composição se tornam mais uniformes, particularmente nos estágios iniciais, devido à fusão dos grãos de coalhada e redução dos gradientes de sal, umidade e pH; b) os queijos perdem água por evaporação e pelo avanço da sinérese (especialmente próximo às extremidades) e devido à proteólise; c) a maturação implica principalmente no rompimento da rede de paracaseinato; causa também ligeiro aumento do pH, devido à formação de grupamentos alcalinos em decorrência da proteólise e da degradação de ácido láctico (CREAMER & OLSON, 1982; LAWRENCE et al., 1987).

Existem duas fases no desenvolvimento da textura durante a maturação. A primeira fase compreendida entre os primeiros 7 a 14 dias quando a textura plástica do queijo novo é rapidamente convertida para uma textura macia e há obtenção de um produto mais homogêneo. Isto se deve ao enfraquecimento da rede de caseínas que compõe a microestrutura do queijo, que ocorre quando aproximadamente 20% da α_{s1} -caseína é hidrolisada pelo coagulante dando origem ao peptídeo α_{s1} -I. A segunda fase envolve uma mudança mais gradual na textura, pois a caseína é hidrolisada mais lentamente (CREAMER & OLSON, 1982; LAWRENCE et al., 1987). Em alguns queijos uma fração da caseína (α_{s1} -caseína) ainda pode ser encontrada intacta mesmo depois de vários dias ou até semanas. Em um trabalho realizado com queijo Gouda observou-se que 90% da β -caseína permanecia intacta após 10 semanas de maturação (LAWRENCE et al., 1987).

Segundo LAWRENCE et al.(1983), o queijo é formado por uma estrutura

básica que pode ser modificada durante a maturação. Esta estrutura é afetada principalmente pela variação do pH e umidade, além das frações protéicas formadas durante a proteólise. A textura de um queijo está diretamente relacionada à estrutura básica e é influenciada principalmente pelo pH e pela taxa de caseína intacta presente na massa.

A textura de um queijo novo muda com relativa rapidez, quando as estruturas das moléculas de α_{s1} -caseína são clivadas pelo coalho residual. Em queijos tipo Cheddar e Gouda, estas alterações se refletem principalmente no aumento da firmeza e em uma diminuição da elasticidade. Em parte, isto é causado pela perda dos elementos estruturais, mas uma outra característica da proteólise provavelmente é significativa. A clivagem de cada ligação peptídica gera dois novos grupos iônicos, que competirão pela água disponível no sistema. Assim, a água disponível para solvatação das cadeias de proteínas se liga aos novos grupos iônicos, tornando o queijo mais firme e menos facilmente deformável. Esta mudança, em combinação com aquelas observadas na matriz protéica, dá o efeito observado na textura (LAWRENCE et al., 1987).

Quanto menor a relação de umidade/caseína, mais firme será a matriz de caseína no queijo. Pequenas variações na relação umidade:caseína resultam também em grandes mudanças na umidade disponível, uma vez que a maioria da umidade está ligada à caseína e aos seus produtos de degradação. Mesmo pequenos decréscimos na atividade de água, provocam diminuição na atividade proteolítica do queijo. O teor de renina residual em relação à caseína é menor em queijos de baixa umidade e a variação da textura, nesse caso, será mais lenta (LAWRENCE et al., 1987).

O queijo é considerado um material visco-elástico, o que significa que suas características reológicas podem variar de elástico a viscoso, dependendo do tipo de queijo (duro, semi-duro, mole, semi-mole). O queijo tipo Prato é um queijo semi-duro, de massa semi-cozida e possui propriedades físicas bem definidas que dependem também da idade do queijo.

O comportamento reológico de queijos semi-duros é descrito em termos da reologia de um material composto. Os glóbulos de gordura presentes agem como partículas acumuladas na matriz aquosa dos agregados protuberantes da caseína (VISSER, 1991).

A textura é expressa por um conjunto de características físicas como a firmeza e a adesividade. A firmeza é o parâmetro avaliado com maior frequência. Correlações satisfatórias foram obtidas com relação ao parâmetro de dureza do “Texture Profile Analyses”(TPA), como sendo a máxima força da curva de força de compressão. A adesividade, no entanto, é de difícil correlação entre as análises instrumental e sensorial (ZOON, 1991).

A característica reológica do queijo, pode ser quantificada pelos seguintes parâmetros (VISSER, 1991): a) o módulo de compressão (mede a firmeza do queijo); b) a deformação relativa na fratura (mede o encolhimento/alongamento da estrutura do queijo); c) a força da fratura, relacionada também com a firmeza.

A avaliação da textura pode ser realizada de várias formas, mas o método mais utilizado é o da penetração do cone, que está subdividido em força constante e velocidade constante. O método de penetração por força constante se baseia em penetrar uma amostra com um cone sob uma força constante até uma determinada profundidade e é medida em relação a um certo tempo. O de velocidade constante é aquele em que a penetração se dá a uma velocidade constante e, nesse caso é medida a força necessária para se obter uma certa distância de penetração. Em ambos os métodos a força pode ser empregada pelo peso do cone ou simplesmente por um aparato de compressão. Uma vantagem desse método é a constância da razão de força que é recomendada para queijos devido às suas características mecânicas e, possivelmente incluindo a elasticidade, depende do grau de deformação. Mas a maior vantagem do teste de penetração é a facilidade de se aplicá-lo uma vez que em muitos queijos pode ser feita diretamente na peça, na própria embalagem (VAN VLIET, 1991).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1-MATERIAL

4.1.1-Matéria-prima

Para os processamentos dos queijos tipo Prato, o leite de vaca tipo B cru, não padronizado quanto ao teor de gordura, foi fornecido pela Cia. Agropecuária Tuiuti (Shefa), situada no município de Amparo, no estado de São Paulo. O leite foi pasteurizado no Centro de Tecnologia de Laticínios (Tecnolat) ITAL. As análises físico-químicas, realizadas no leite antes da pasteurização, resultaram nos valores médios apresentados na Tabela 06.

TABELA 06: Resultados médios das análises físico-químicas do leite tipo B (Processos A, B e C).

Análises	Valores
pH	6,65
Acidez (°D)	16,00
Densidade	1,0315
Gordura (%)	3,40
Extrato seco total (%)	11,74
Cinzas (%)	0,72
Lactose (%)	4,95
PT (%)	3,15
NNP (%)	0,20
NS-pH 4,6 (%)	0,80
Ponto crioscópico (°H)	-0,538
Ca (ppm)	1196,039
Mg (ppm)	97,731
P (ppm)	1503,835

4.1.2-Coadjuvantes Técnicos

- **Coalho:** Para a coagulação do leite (32°C/45min.) foi utilizado o coalho líquido comercial (constituído por mistura de cerca de 80% de pepsina bovina e 20% de renina), da marca Chr. Hansen's®.
- **Corante:** Utilizou-se corante vegetal da marca Chr. Hansen's®.
- **Fermento-láctico:** Empregou-se fermento láctico DVS tipo LD (Chr. Hansen's®), constituído pelas seguintes bactérias lácticas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* variedade *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*.
- **Cloreto de cálcio:** Foi utilizado cloreto de cálcio 50% da marca Chr. Hansen's.
- **Nitrato de potássio:** Utilizou-se nitrato de potássio da marca J.T. Baker.
- **Cloreto de sódio:** A salmoura foi preparada com cloreto de sódio comercial.
- **Enzima:** Para a fabricação do queijo tipo Prato (método modificado) foi empregada uma protease bacteriana, a Neutrase®, proveniente da Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil, Araucária-PR. O produto foi utilizado em forma líquida (Neutrase ® 0,5 L - 0,5 AU/g).

4.2 - MÉTODOS

4.2.1- Tecnologia de fabricação

Foram realizados 6 experimentos, cada um constando de 2 fabricações em paralelo, uma pelo método padrão e outra pelo modificado com adição de enzima proteolítica. Foram utilizados 300L de leite tipo B cru em cada fabricação

(padrão e modificado), num total de 600L por experimento.

Processos A, B e C - Elaboração do queijo tipo Prato pelo método tradicional, de acordo com os dados de literatura especializada (OLIVEIRA, 1986; VAN DENDER et al., 1986) e fabricação do queijo tipo Prato pelo método modificado, com a adição de enzimas proteolíticas à massa do queijo numa concentração de **25, 15 e 10mg enzima/quilo de leite**, respectivamente. A elaboração dos queijos tipo Prato, foi feita segundo a Tabela 07.

Tabela 07: Resumo das principais características dos processos.

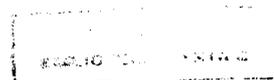
	Processo A		Processo B		Processo C	
	Tradicional	Modificado	Tradicional	Modificado	Tradicional	Modificado
Leite cru						
Integral	300 litros	300 litros	300 litros	300 litros	300 litros	300 litros
Enzima	—	25mg/kg	—	15mg/kg	—	10mg/kg
Neutrase®		leite		leite		leite

4.2.1.1. Metodologia

De modo geral, as etapas dos processamentos foram as seguintes :

I-Método tradicional

- a- Recepção do leite a 4°C.
- b- Pasteurização do leite a 63°C durante 30 minutos.
- c- Resfriamento a 32°C e adição de cloreto de cálcio (50mL/100L de leite), fermento láctico (LD-1%), corante vegetal (10mL/100L de leite), nitrato de potássio (15g/100L de leite).
- d- Coagulação do leite a 32°C, utilizando quantidade suficiente de coalho para coagular em 45 minutos. O ponto de corte foi determinado pela verificação da resistência do coágulo.
- e- Corte da coalhada em pequenos grãos com auxílio de uma lira.
- f- Agitação lenta e cuidadosa durante 20 minutos (primeira agitação) e a seguir, dessoragem de 30% do volume (primeira dessoragem).
- g- Aquecimento gradativo da massa de forma indireta (através da camisa do tanque de fabricação) e direta com 17% de água a 80°C, até atingir 40°C, de modo a obter uma elevação de temperatura de 1°C para cada 3min, sempre agitando a massa. O tempo total de aquecimento foi de 24 minutos. Agitação mais vigorosa, completando 40 minutos (segunda agitação), até alcançar o ponto de massa (verificado pela consistência dos grãos).
- i- Dessoragem e pré-prensagem durante 20 a 30 minutos, aplicando-se uma pressão equivalente a cerca do dobro do peso da massa.
- l- Corte, enformagem em formas retangulares de 1,0 kg, próprias para queijos Prato tipo Lanche, com dessoradores.
- m- Prensagem durante 30 minutos com ar comprimido (25 libras). Os queijos foram tirados da forma, virados e procedeu-se a prensagem com prensa mecânica até o dia seguinte.
- n-Salga (19°Bé \cong 20% sal) por 24 horas.
- o- Secagem em temperatura ambiente.
- p- Embalagem à vácuo em embalagens plásticas termoencolhíveis (“cryovac”).
- q- Os queijos foram pesados e levados para a câmara de maturação, com temperatura 12°C (\pm 1°C) e 90% UR por 40 dias.



II- Método modificado:

Para o método modificado as etapas foram basicamente as mesmas até a massa alcançar o “ponto”. Retirou-se então aproximadamente 70% do soro (restando uma quantidade suficiente para cobrir levemente a massa), adicionou-se a enzima Neutrase® na forma líquida, previamente dissolvida em soro (Figura 03), na concentração de 25mg/kg leite (Processo A), 15mg/kg leite (Processo B) e 10 mg/kg leite (Processo C). Enquanto se fazia a adição da enzima, a massa era agitada com o auxílio de um garfo de aço inoxidável próprio para fabricação de queijos. A seguir a massa foi deixada em repouso durante 20 minutos a 42°C. Após decorrido este tempo, o restante do soro foi retirado e pesado e procedeu-se como no método tradicional para as demais etapas



FIGURA 03: Adição da enzima Neutrase® previamente dissolvida em soro à massa dos queijos, durante a fabricação.

As Figuras 04 e 05, apresentadas a seguir, fornecem informações resumidas sobre o processamento de queijo tipo Prato pelos processos tradicional e modificado, respectivamente.

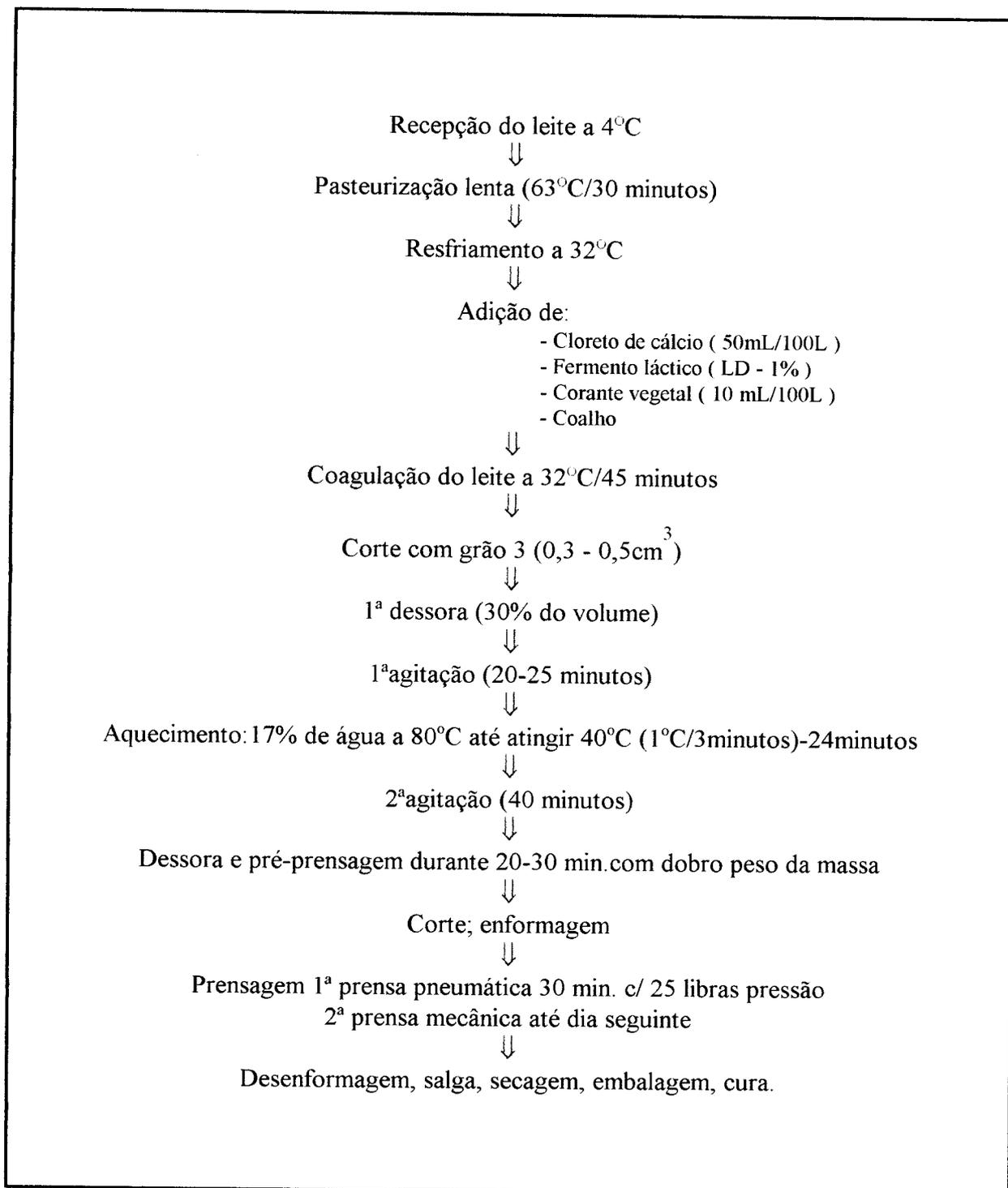


FIGURA 04: Fluxograma das principais etapas do processo de fabricação de queijo tipo Prato pelo método tradicional.(VAN DENDER et al., 1986).

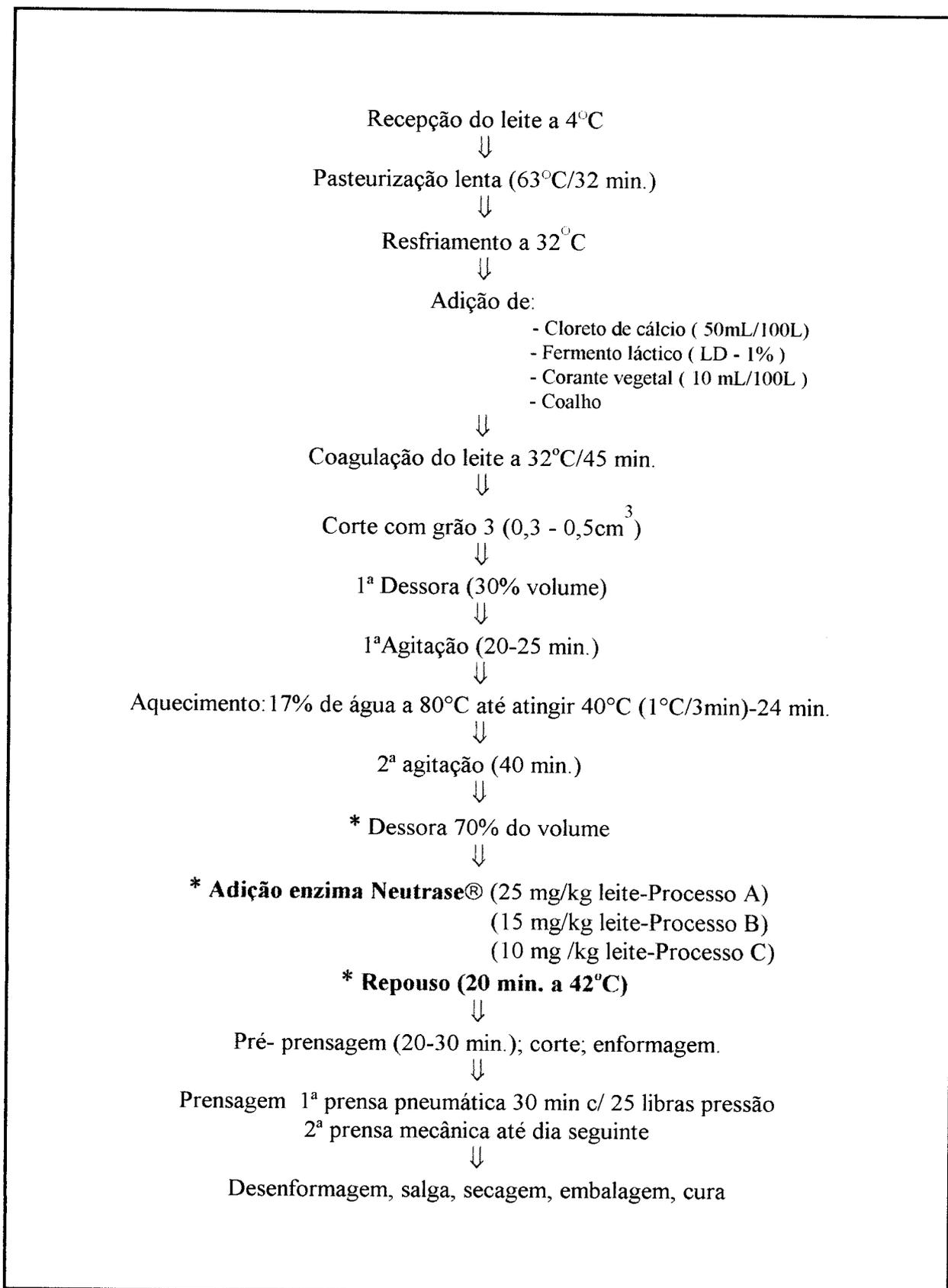


FIGURA 05: Fluxograma do processo modificado de fabricação de queijo tipo Prato.

*variações em relação ao método tradicional

4.2.2 - Determinações analíticas

4.2.2.1 - Análises físicas e químicas

As análises físicas e químicas da matéria-prima, do fermento láctico e do soro no momento do ponto final na fabricação tradicional e modificada bem como dos queijos com 1 dia de fabricação e durante a estocagem refrigerada (13°C) foram realizadas de acordo com os métodos descritos a seguir. As análises foram feitas em triplicata.

- **Amostragem:** As amostras do leite, soro e coágulo foram retiradas diretamente dos recipientes, após uma pequena agitação visando homogeneizar o produto. As amostras do queijo foram trituradas e homogeneizadas em um multiprocessador.
- **pH:** O pH do leite, soro, fermento láctico e queijo foi determinado por meio de um potenciômetro pH-Metro Micronal B 375.
- **Densidade:** Foi determinada no leite por meio do termolactodensímetro B375 de Quevenne (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).
- **Extrato seco total:** O teor de extrato seco total (EST) do leite, do soro e do queijo foi determinado pelo método de secagem das amostras mais areia tratada até peso constante (7 horas), em estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$. (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1982).
- **Gordura:** Para as determinações do teor de gordura presente no leite e soro foi utilizado o método de Gerber, e no queijo foi empregado o método de Gerber-van Gulik (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).
- **Acidez:** A acidez do soro e dos queijos foi determinada por titulação com NaOH 0,1N, sendo expressa em percentagem de ácido láctico. A acidez do leite e fermento láctico foi determinada pelo método de Dornic (NaOH 0,11N), sendo expressa em

graus Dornic (°D) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

- **Lactose:** A determinação de lactose foi realizada de acordo com o método fenol-sulfúrico de ACTON (1977), sendo utilizadas 0,25g de leite, 2,0 e 4,0 g para os queijos.

- **Cloreto de sódio:** O teor de sal do queijo foi determinado pela titulação com tiocianato de amônia, do excesso de nitrato de prata adicionado (SERRES et al., 1973).

- **Gordura no extrato seco (GES):** O teor de gordura no extrato seco (GES) para o queijo foi calculado pela fórmula:

$$GES = \left(\frac{\% \text{ de gordura}}{\% \text{ E.S.T.}} \right) \times 100$$

- **Cinzas:** As cinzas do queijo foram determinadas em mufla regulada para a temperatura de $550 \pm 5^{\circ}\text{C}$ (HORWITZ, 1975. Proc. 16223).

- **Teor de cálcio total, de magnésio e de fósforo:** O teor de cálcio total, de magnésio e de fósforo das amostras foi determinado em espectrofotômetro de emissão plasma por argônio (IMO INDUSTRIES INC-ICP, 1990).

- **Ponto crioscópico:** O abaixamento do ponto de congelamento do leite foi avaliado por meio de um crioscópio digital microprocessado modelo M-90 da LAKTRON, sendo expresso em graus Hortvet (°H).

- **Nitrogênio total:** O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método oficial de Kjeldahl. O teor de **proteína total** foi calculado multiplicando-se o valor do nitrogênio total por 6,38 (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1962; 1964).

- **Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6):** O teor de nitrogênio solúvel dos queijos foi determinado pela dosagem do nitrogênio total do sobrenadante obtido após precipitação isoelétrica das caseínas (VAKALERIS & PRICE, 1959). O valor final foi multiplicado por 6,38
- **Nitrogênio solúvel em TCA 12% ou Nitrogênio não protéico (NNP):** O teor de nitrogênio não protéico foi determinado pela dosagem do nitrogênio total no sobrenadante obtido após precipitação da totalidade das proteínas em presença do ácido tricloroacético a 12%, segundo o método de ASCHAFFENBURG & DREWRY (1959). O valor final foi multiplicado por 6,38,
- **Determinação da atividade de água (Aw):** Foi determinada através de crioscopia eletrônica (VAN DENDER et al. , 1995).

4.2.3 - Fracionamento das substâncias nitrogenadas para avaliação direta da proteólise

A matéria nitrogenada nos queijos com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias foi fracionada de acordo com o protocolo descrito a seguir:

- Homogeneização de 10g de queijo com 40 mL de solução de citrato de sódio 0,5M e cerca de 80 mL de água, por aproximadamente 3 minutos, usando o homogeneizador Virtis. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL e o volume foi completado com água destilada (Fração 1→ Nitrogênio total).
- Uma alíquota de 100 mL desta solução (fração 1) foi misturada com 10 mL de HCl 1,41N e o volume foi completado para 125 mL com água destilada. A mistura foi filtrada em papel Whatman nº 42 obtendo-se uma solução cristalina contendo a porção de nitrogênio solúvel no ponto isoelétrico (Fração 2→ Nitrogênio solúvel - pH 4,6).

- Uma alíquota da fração 2 foi tratada com igual volume de TCA (ácido tricloroacético) 24% e filtrada em papel Whatman nº 42, obtendo-se uma solução límpida contendo a porção nitrogenada não protéica (Fração 3 → Nitrogênio não-protéico).

4.2.4 – Métodos para avaliação direta da proteólise

4.2.4.1 – Determinação dos índices de extensão (IEM) e de profundidade da maturação (IPM)

Estes índices foram obtidos em função dos teores de nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (Ns-pH 4,6) e nitrogênio solúvel em TCA 12% ou nitrogênio não-protéico relacionados pelas fórmulas (a) e (b), respectivamente (VAKALERIS & PRICE, 1959; WOLFSCHOON- POMBO, 1983, 1989).

$$(a) \text{ IEM} = (\text{NS-pH 4,6} / \text{NT}) \times 100$$

$$(b) \text{ IPM} = (\text{NNP} / \text{NT}) \times 100$$

4.2.4.2 – Determinação dos teores dos aminoácidos tirosina e triptofano

Os teores de tirosina e triptofano solúveis foram determinados seguindo-se o método espectrofotométrico descrito por VAKALERIS & PRICE (1959), na fração obtida por precipitação isoelétrica das caseínas (Nitrogênio solúvel – pH 4,6). Após leitura espectrofotométrica a 270 e 290nm, as concentrações de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) foram calculadas usando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Tyr (mM/L)} = (0,95 \times A_{270} - 1,31 \times A_{290}) \times 2$$

$$\text{Tyr (mg/100g de queijo)} = \text{mM/L} \times 453$$

$$\text{Trp (mM/L)} = (0,307 \times A_{290} - 0,020 \times A_{270}) \times 2$$

$$\text{Trp (mg/100g de queijo)} = \text{mM/L} \times 510,5$$

4.2.4.3- Determinação dos teores de aminoácidos livres totais

4.2.4.3.1- Reação com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)

A determinação de α -aminonitrogênio (aminoácidos livres totais) nas frações nitrogenadas 1 a 3 obtidas no item 4.2.2 foi feita pela reação com TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico), segundo metodologia descrita por ADLER-NISSEN (1979) e CLEGG et al. (1982). Este método fundamenta-se na leitura espectrofotométrica do cromóforo formado pela reação do TNBS com aminas primárias. A reação ocorre em meio ligeiramente alcalino e é interrompida pela diminuição do pH. A reação colorimétrica foi realizada tomando-se 0,25 mL da amostra, 2,0 mL de solução tampão fosfato 0,2125 M pH 8,2 e 2,0 mL de solução de TNBS a 0,1%. A mistura foi incubada durante 1 hora a 50°C, ao abrigo da luz. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 4,0 mL de HCL 0,1N e deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos. A absorbância foi lida a 340 nm contra o branco. A concentração de α -HN₂ foi calculada usando-se uma curva padrão de L-leucina, feita a partir de uma solução contendo 1,5 μ moles/mL desse aminoácido.

4.2.4.3.2- Reação com ninidrina-cádmio

A fração 2 foi analisada quanto ao teor de aminoácidos livres totais usando-se uma modificação do método de ninidrina-cádmio, descrito por FOLKERTSMA & FOX (1992). O reagente de ninidrina foi preparado dissolvendo-se 0,8 g de ninidrina numa mistura contendo 80mL de etanol absoluto e 10 mL de ácido acético glacial. À solução resultante adicionou-se 1g de cloreto de cádmio dissolvido em 1mL de água destilada. Este reagente deve ser preparado na hora de usar. A reação colorimétrica foi realizada tomando-se alíquotas de 10 a 100 μ L de amostra (para um volume final de 1mL) e adicionando-se 2,0 mL do reagente de ninidrina. A mistura resultante foi incubada a 84°C durante 5 minutos, resfriada e a absorbância lida num espectrofotômetro a 507nm contra o branco. A concentração de α -HN₂ foi calculada usando-se uma curva padrão de L-leucina.

4.2.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia –PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (géis de separação a 12,5% e de concentração a 4%), foi realizada nas amostras dos queijos tipo Prato tradicional e modificado para a obtenção do perfil das frações de caseína usando-se uma unidade vertical Protean II xi (Bio-Rad), de acordo com uma modificação do método descrito por ANDREWS (1983). Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue (CBB), seguindo-se metodologia descrita por BLAKESLEY & BOEZI (1977).

4.2.6- Determinação da atividade proteolítica para calcular o teor de enzima Neutrase® adicionada que foi perdida no soro

Foi realizada de acordo com metodologia descrita por BERGMAYER (1965) e IADEROZA & BALDINI (1991). A atividade proteolítica é determinada pela hidrólise enzimática da caseína a 1,0%, pH 7,0 a 37°C durante 30 minutos, seguindo-se de precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA). A quantidade de produtos hidrolíticos não precipitados, ou seja, de peptídeos solúveis em TCA, foi determinada a 280nm.

Uma unidade de atividade (UP) foi definida como a quantidade de enzima que, nas condições de análise, libera em 30 minutos, a partir de uma solução de caseína, uma quantidade de peptídeos que tem absorvância a 280nm equivalente a 1,0 mg de tirosina.

4.2.7 – Determinação instrumental da textura

A textura dos queijos tipo Prato fabricados pelos processos tradicional e modificado foi avaliada utilizando-se o texturômetro TA-XT2 Stable Micro Systems (SMS), computadorizado, cujo software é auto-explicativo. Os resultados são apresentados de forma gráfica e a integração é feita pelo software específico do

equipamento proporcionando a interpretação dos resultados. O procedimento adotado foi o de perfuração, onde é medida a força necessária para penetrar o queijo com um cone de 45°C é medida. Foram medidos os parâmetros força máxima, força máxima negativa, área positiva e área negativa em cinco pontos aleatórios nas fatias de queijo. As condições de operação do equipamento foram:

- Velocidade constante = 2 mm/s
- Distância = 10 mm
- Resultados obtidos em função do tempo requerido para penetrar a amostra até 10 mm.

4.2.7.1 - Preparo das amostras para análise de textura

De cada peça de queijo tipo Prato (tradicional e modificado) foram retiradas fatias de 30 mm de espessura da ponta e do meio de cada queijo, como mostra a Figura 06, destinadas à análise de textura. Os resultados foram expressos como a média das leituras obtidas em ambas as fatias.

As amostras foram embaladas em pequenos sacos plásticos, devidamente fechados, para evitar o seu ressecamento. A fim de se evitar a influência da temperatura na textura, as amostras foram mantidas em temperatura controlada (aproximadamente 10°C) dentro de um recipiente isotérmico, por uma hora antes do início da análise. Durante o teste, foi verificada a homogeneidade e a uniformidade das amostras (presença de olhaduras, defeitos de prensagem, superfície lisa) visando uniformizar as medidas.

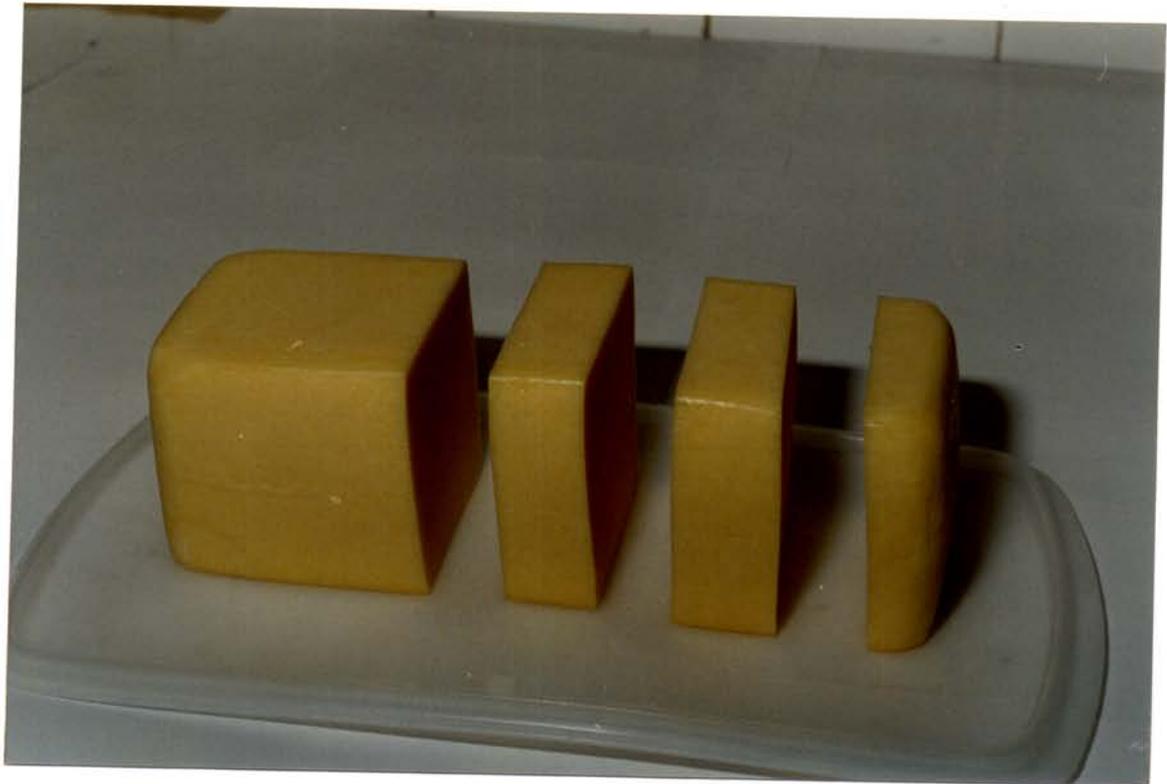


FIGURA 06: Retirada das fatias para análise de textura nos queijos.

4.2.8- Análise Sensorial

Para realização dos testes de análise sensorial foi selecionada uma equipe de 12 provadores, que foram treinados no Laboratório de Análises Físicas, Sensoriais e Estatísticas (LAFISE) do ITAL. Os provadores foram treinados primeiramente usando-se sete diferentes marcas comerciais de queijo tipo Prato.

A análise descritiva tem como objetivo a descrição das características sensoriais percebidas em um produto e suas intensidades. A fase inicial de uma análise descritiva é a obtenção da lista de características a serem avaliadas. Para isso, foi utilizado o Método Rede (“Grid”), em que são apresentados 3 pares de amostras (3 amostras combinadas 2 a 2) solicitando-se aos provadores que anotem as similaridades e

Os atributos selecionados pela equipe sensorial foram:

Aparência: cor e presença de olhaduras.

Aroma: leite, iogurte e queijo.

Sabor: queijo Prato maturado, salgado, amargo, ácido, doce.

Textura: elasticidade, flexibilidade, firmeza e resistência à mastigação.

Com estes parâmetros foi montada a ficha para avaliação da intensidade dos atributos selecionados nos queijos tradicional e modificado dos processos A, B e C, utilizando escalas lineares não estruturadas de 9cm. (STONE et al., 1974).

A avaliação sensorial do queijo tipo Prato foi realizada em cabines individuais no Laboratório de Análise Sensorial LAFISE- ITAL, utilizando o sistema computadorizado de análise sensorial COMPUSENSE versão 4.2. As amostras foram cortadas uniformemente, servidas em pratinhos brancos, codificadas com números aleatórios de três dígitos. A ordem de apresentação das amostras servidas aos provadores foi feita obedecendo-se a um sorteio. A cada provador eram servidas duas amostras codificadas (queijo tradicional e modificado). Juntamente com a amostra era oferecido o vocabulário com a descrição de cada atributo, uma fatia de pão e água para lavagem da boca.

4.2.9- Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi feita através de análise de variância e teste de Dunnet, utilizando o programa S.A.S (Statistical Analysis System).

As análises realizadas nos queijos, obedeceram o seguinte cronograma:

D+1 = 1 dia após fabricação

D+7 = 7 dias após fabricação

D+14 = 14 dias após fabricação

D+21 = 21 dias após fabricação

D+28 = 28 dias após fabricação

D+40 = 40 dias após fabricação

4.2.10- Cálculo do rendimento

O rendimento dos queijos foi calculado segundo VIOTTO et al. (1996), dividindo-se o peso do queijo após resfriamento pelo peso total do leite menos o peso das amostras retiradas até a adição do coalho. A comparação direta de rendimento dos queijos não é muito significativa, já que as diferenças no teor de umidade e sal distorcem qualquer comparação da recuperação de sólidos do leite. Por esse motivo, calculou-se então o rendimento ajustado para todos os queijos. O rendimento com ajuste de umidade e sal (**RAJ**) foi calculado considerando-se o conteúdo desejado de sal de 1,8% e umidade de 43%.

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

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Etapa de processamento

Os resultados das Tabelas 08 e 09 referem-se ao comportamento do soro e da coalhada respectivamente, nas três primeiras fases do processo, em relação à acidez, pH e umidade dos métodos tradicional e modificado dos processos A, B e C.

TABELA 08: Resultados médios das análises do soro nas três primeiras fases dos processamentos de queijo tipo Prato (processos A, B e C).

	Etapa do processo	Tradicional		Modificado	
		pH	Acidez (% AL)	pH	Acidez (% AL)
Processo A	Corte	6,56	13,32	6,55	13,32
	1ª dessoragem	6,57	13,87	6,58	12,76
	2ª dessoragem	6,59	10,54	6,59	11,10
Processo B	Corte	6,45	13,20	6,46	13,20
	1ª dessoragem	6,33	13,75	6,44	13,75
	2ª dessoragem	6,19	14,31	6,15	13,76
Processo C	Corte	6,40	12,29	6,40	12,29
	1ª dessoragem	6,38	12,29	6,38	12,78
	2ª dessoragem	6,35	10,32	6,37	10,32

TABELA 09: Resultados médios das análises da coalhada obtida em diversas fases dos processamentos de queijo tipo Prato (processos A, B e C).

	Etapa do processo	Tradicional			Modificado		
		pH	Acidez (%AL)	Umidade (%)	pH	Acidez (%AL)	Umidade (%)
Processo A	1ª dessoragem	6,59	0,05	76,53	6,56	0,05	77,00
	2ª dessoragem (Ponto)	6,58	0,05	63,54	6,56	0,05	64,03
	Após pré-prensagem	6,54	0,11	54,54	6,55	0,11	52,05
	Após prensagem	5,16	0,77	43,40	5,16	0,81	43,97
Processo B	1ª dessoragem	6,11	0,04	74,73	6,11	0,09	74,66
	2ª dessoragem (Ponto)	5,88	0,09	65,43	5,98	0,10	64,43
	Após pré-prensagem	5,78	0,15	57,42	5,57	0,20	51,28
	Após prensagem	5,15	0,99	41,30	5,12	0,99	44,00
Processo C	1ª dessoragem	6,47	0,19	73,66	6,50	0,13	68,39
	2ª dessoragem (Ponto)	6,42	0,10	62,78	6,43	0,15	61,66
	Após pré-prensagem	6,26	0,05	49,55	6,27	0,05	49,75
	Após prensagem	5,34	0,94	44,09	5,67	0,59	43,63

O pH do soro se manteve praticamente constante nos processos A e C devido principalmente à adição de água durante o aquecimento. No processo B o pH dos queijos tradicionais e modificados apresentou um leve declínio após a 2ª dessoragem.

Nos processos A, B e C o desenvolvimento de acidez no soro manteve-se praticamente igual nos dois métodos, sendo que no A e C houve um pequeno declínio após a 2ª dessoragem, o que é considerado normal devido à lavagem da massa durante o processo, que acaba diminuindo a concentração de ácido láctico. No Processo B ocorreu um pequeno aumento após a 2ª dessoragem, que coincidiu com o declínio do pH, o que pode indicar uma maior atividade das bactérias do fermento neste processo.

Com relação à coalhada dos queijos no processo A o desenvolvimento de acidez foi praticamente igual nos dois métodos. Os queijos modificados se apresentaram levemente mais ácidos do que os tradicionais, após a prensagem. No B, a acidez na massa do queijo modificado foi maior do que no tradicional, da 1ª dessoragem até o final da pré-prensagem, tendo se igualado após a prensagem. Isto ocorreu provavelmente devido ao fato de que o corte da massa no método modificado demorou um pouco mais para ser realizado, resultando em massa com maior acidez na 1ª dessoragem. No processo C os queijos tradicionais se apresentaram mais ácidos que os modificados após a prensagem. Isto pode ter ocorrido devido ao tempo em que a coalhada do método modificado permaneceu em repouso a 42°C, para proporcionar uma melhor ação da enzima Neutrase®. A menor acidificação pode ter ocorrido pelo fato do fermento mesófilo não se desenvolver bem em temperaturas altas, o que retardou a acidificação após a prensagem dos queijos modificados.

O pH teve um declínio após a prensagem nos métodos tradicional e modificado, para os processos A, B e C. Esta diminuição nos valores de pH era esperada porque o final da prensagem ocorre no dia seguinte à fabricação dos queijos, aproximadamente doze horas após o início do processo de prensagem. Ao final da prensagem o pH dos queijos era de 5,16 nos métodos tradicional e modificado (processo A), de 5,15 para os queijos tradicionais e 5,12 para os modificados (processo B) e de 5,34 e 5,67 para

os queijos tradicional e modificado, respectivamente no processo C.

O soro dos queijos fabricados no processo B foi o que apresentou pH mais baixo e maior acidez ao final da prensagem em comparação aos soros dos processos A e C. Além disso, a coalhada deste processo, quando comparada à do processo A, apresentou uma acidez mais elevada e um menor pH, durante todas as etapas do processamento, tanto nos queijos tradicionais como nos modificados. Quando comparada ao C, a coalhada do processo B estava também mais ácida após a pré-prensagem, e o pH mais baixo durante todo o processamento para os dois métodos. Estes valores mais elevados para acidez e mais baixos de pH podem ter levado a uma maior retenção de coalho residual na massa dos queijos fabricados pelo processo B.

5.2 -Atividade proteolítica da enzima e do soro

A atividade proteolítica da enzima Neutrase® e do soro dos queijos fabricados pelo método modificado, foi analisada a partir da enzima na forma líquida (0,5 L-0,5AU/g), usada nos trabalhos práticos e do soro retirado e pesado após o repouso de 20 minutos a 42°C, no método modificado. A Tabela 10 mostra os resultados médios da atividade proteolítica da enzima e do soro dos processos A, B e C.

TABELA 10: Resultados médios da atividade proteolítica da enzima Neutrase® e do soro antes e após sua adição, à coalhada no método modificado dos processos A, B e C.

PROCESSO	Enzima Adicionada(UP)	ATIVIDADE (UP/mL)		Peso do soro (kg)**	Total no soro (UP)
		Soro antes da adição de enzima	Soro após a adição de enzima		
A -25 mg Neutrase/kg ∴ 7,5/300kg	7679,10	-	0,084	77,40	6501,60 *(1177,50)
B -15 mg Neutrase/kg ∴ 4,5/300kg	4607,46	-	0,062	55,00	3410,00 * (1197,46)
C -10 mg Neutrase/kg ∴ 3,0/300kg	3071,64	0,018	0,049	30,01	930,47 * (2141,17)
Neutrase®		1023,88			

*os números entre parênteses indicam a quantidade de enzima que ficou retida na massa.

**retirado e pesado após os 20 min. de repouso.

Através da análise da atividade proteolítica foi possível obter a porcentagem de enzima adicionada e que foi perdida no soro, obtendo-se a concentração real retida na massa. Observa-se na Tabela 10 que no processo A a quantidade de enzima adicionada foi maior, mas a quantidade (peso) de soro retirada também foi maior, quando comparado aos processos B e C. Conseqüentemente a concentração de enzima retida na massa do processo A foi menor do que nos processos B e C, ao passo que no processo B a retenção foi menor que no C.

5.3- Produto final

Os resultados médios das análises físico-químicas dos queijos obtidos nos processos A, B e C com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação constando basicamente dos valores de pH, acidez, umidade, extrato seco total (EST), gordura (Gb), gordura no extrato seco (GES), cinzas, lactose, cloretos, proteína total (PT), minerais (Ca, Mg, P) e atividade de água (Aa) são apresentados nas Tabelas 11 a 16.

TABELA 11: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos tradicionais durante o período de maturação (processo A).

Determinações	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	40 dias
pH	5,29	5,34	5,36	5,35	5,37	5,50
Acidez (%AL)	0,77	0,96	0,74	0,78	0,77	0,82
Umidade (%)	41,99	39,37	39,61	39,45	40,35	39,86
EST (%)	58,00	60,63	60,38	60,54	59,64	60,14
Gb (%)	31,74	34,60	32,42	32,91	33,71	31,40
GES (%)	54,73	57,07	53,69	54,36	56,51	52,21
Cinzas (%)	3,55	3,99	4,00	3,95	4,10	3,78
Lactose (%)	0,108	0,096	0,081	0,089	0,079	0,043
Cloretos (%)	1,84	1,83	1,88	1,88	1,95	1,89
PT (%)	21,77	23,14	23,31	22,84	22,47	23,02
Ca (ppm)	8409,71	8754,15	8747,95	8591,26	8523,02	8558,97
Mg (ppm)	286,05	278,57	277,81	269,94	270,69	268,66
P (ppm)	4392,90	4960,09	5153,02	5112,27	5119,77	5164,24
Aa	0,9633	0,9575	0,9600	0,9576	0,9576	0,9586

TABELA 12: Resultados médios das análises químicas e bioquímicas dos queijos modificados durante o período de maturação (processo A).

Determinações	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	40 dias
pH	5,25	5,31	5,32	5,30	5,30	5,35
Acidez (%AL)	0,75	1,31	0,96	1,14	1,15	1,18
Umidade (%)	43,39	40,03	40,14	40,72	40,68	40,44
EST (%)	56,62	59,95	59,86	59,27	59,31	59,55
Gb (%)	30,00	33,92	33,93	32,36	32,37	31,73
GES (%)	52,87	56,58	56,7	54,6	54,57	53,28
Cinzas (%)	3,72	3,93	4,10	4,08	4,16	3,93
Lactose (%)	0,121	0,104	0,097	0,083	0,058	0,032
Cloretos (%)	1,87	2,08	2,01	1,92	2,03	1,93
PT (%)	21,64	22,34	22,96	23,25	21,84	22,64
Ca (ppm)	8409,71	8794,15	8747,95	8591,26	8523,02	8558,97
Mg (ppm)	259,87	268,76	266,89	268,77	270,51	266,03
P (ppm)	4528,33	4964,57	5036,75	5158,06	5307,00	5171,11
Aa	0,9587	0,9553	0,9531	0,9571	0,9547	0,9569

TABELA 13: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos tradicionais durante o período de maturação (**processo B**).

Determinações	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	40 dias
pH	5,18	5,25	5,26	5,30	5,30	5,40
Acidez (%AL)	0,93	0,66	0,72	0,61	0,83	0,80
Umidade (%)	41,40	40,85	41,02	40,65	40,69	40,82
EST (%)	58,60	59,15	58,98	59,35	59,31	59,18
Gb (%)	29,91	30,70	29,63	30,04	32,28	29,88
GES (%)	51,04	51,90	50,24	50,61	54,42	50,49
Cinzas (%)	3,76	3,96	3,99	4,00	3,74	3,67
Lactose (%)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cloretos (%)	1,97	1,97	1,90	2,18	2,00	1,81
PT (%)	22,93	22,76	22,00	22,36	23,29	22,06
Ca (ppm)	8635,06	8768,35	8308,06	8412,82	8159,77	8354,46
Mg (ppm)	274,63	248,41	258,13	283,27	271,66	275,89
P (ppm)	5549,08	5202,67	5155,30	5670,27	5519,55	5707,51
Aa	0,9657	0,9571	0,9593	0,9618	0,9619	0,9612

nd: não detectado.

TABELA 14: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos modificados durante o período de maturação (**processo B**).

Determinações	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	40 dias
pH	5,17	5,26	5,29	5,29	5,30	5,30
Acidez (%AL)	0,94	0,83	0,88	0,83	0,88	0,90
Umidade (%)	40,22	38,54	39,76	39,80	39,56	39,15
EST (%)	59,78	61,46	60,24	60,20	60,44	60,85
Gb (%)	30,22	31,33	30,52	31,17	32,58	30,31
GES (%)	50,55	50,98	50,66	51,78	53,90	49,81
Cinzas (%)	3,70	3,86	3,83	3,62	3,61	3,55
Lactose (%)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cloretos (%)	1,88	1,87	1,74	1,89	1,76	1,76
PT (%)	23,41	22,61	22,97	23,51	22,90	23,52
Ca (ppm)	8285,17	8126,09	8378,03	8099,59	8659,77	8259,63
Mg (ppm)	247,82	233,66	271,925	247,38	267,12	278,03
P (ppm)	5373,81	5190,10	5641,81	4892,93	5658,74	5665,45
Aa	0,9599	0,9635	0,9675	0,9695	0,9683	0,9575

nd: não detectado.

TABELA 15: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos tradicionais durante o período de maturação (processo C).

Determinações	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	40 dias
pH	5,22	5,21	5,25	5,25	5,28	5,23
Acidez (%AL)	0,75	0,52	0,60	0,53	0,40	0,72
Umidade (%)	40,97	37,17	36,35	36,14	36,75	36,74
EST (%)	59,03	62,83	63,65	63,86	63,25	63,26
Gb (%)	32,28	34,14	34,92	34,82	35,05	34,69
GES (%)	54,68	54,34	54,86	54,52	55,41	54,84
Cinzas (%)	3,29	3,66	2,97	2,97	3,28	3,62
Lactose (%)	0,089	0,069	0,066	0,065	0,001	0
Cloretos (%)	1,42	1,67	1,78	1,65	1,68	1,57
PT(%)	21,77	22,63	22,55	23,08	22,86	22,68
Ca (ppm)	6868,77	7846,79	7588,06	7521,93	7248,91	8236,98
Mg (ppm)	203,35	243,53	237,23	238,19	222,16	244,46
P (ppm)	4558,88	5063,82	4916,85	4795,67	4749,99	4729,03
Aa	0,9753	0,9704	0,9673	0,9701	0,9685	0,9676

TABELA 16: Resultados médios das análises físicas e químicas dos queijos modificados durante o período de maturação (processo C).

Determinações	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	40 dias
pH	5,18	5,31	5,18	5,26	5,34	5,30
Acidez (%AL)	0,75	0,55	0,61	0,65	0,55	0,74
Umidade (%)	40,47	36,83	36,61	36,77	36,82	36,42
EST (%)	59,53	63,17	63,39	63,23	63,18	63,58
Gb (%)	32,17	33,68	35,39	34,80	36,04	35,10
GES (%)	54,04	53,32	55,83	55,04	57,04	55,20
Cinzas (%)	3,46	3,66	3,02	3,43	3,29	3,81
Lactose (%)	0,090	0,064	0,063	0,070	0,001	0
Cloretos (%)	1,49	1,63	1,65	1,64	1,80	1,68
PT(%)	22,60	23,01	23,26	24,28	22,56	23,78
Ca (ppm)	7046,04	7838,83	7650,45	7484,95	6843,07	8302,40
Mg (ppm)	209,27	247,12	237,99	236,44	212,28	245,89
P (ppm)	4645,86	5077,19	4935,92	4866,17	4558,57	4759,32
Aa	0,9736	0,9703	0,9687	0,9684	0,9688	0,9679

pH

De acordo com literatura especializada o pH do queijo Prato se situa em torno de 5,30 logo após a salga (FURTADO & SOUZA, 1981; OLIVEIRA, 1986) e o valor para o produto final varia entre 5,00 a 5,70 (ROGICK, 1951).

Ao comparar os resultados de pH obtidos nos queijos dos processos A, B e C, foi possível constatar que os valores obtidos nos três processos estão de acordo com a literatura. Os queijos apresentaram uma variação de pH de 5,29 a 5,50 no tradicional e de 5,25 a 5,35 no modificado para o processo A, ao passo que no processo B, permaneceram mais baixos, variando de 5,18 a 5,40 no tradicional e de 5,17 a 5,30 no modificado. No processo C, a variação foi de 5,22 a 5,23 no método tradicional e de 5,18 a 5,30 no modificado.

Com relação à evolução do pH durante o período de maturação pode-se observa-se que nos processos A e B o pH inicial foi mais baixo, uma consequência do processo de fermentação durante a fabricação, com uma tendência normal de ascensão do pH em direção ao final da maturação. O aumento do pH durante o período de maturação se deve à formação de compostos solúveis na fase aquosa dos queijos, os quais contribuem para a alcalinidade do meio (SCOTT, 1986). Isto mostra que nestes processos houve uma boa capacidade proteolítica, com liberação de compostos que tendem a neutralizar a massa do queijo. MINUSSI et al (1995) observaram também um aumento de pH em trabalho sobre aceleração de maturação de queijo tipo Prato, no qual foi utilizado um coquetel de enzimas (Flavorage). Já no processo C, os queijos não apresentaram a tendência de elevação do pH, sendo que os valores obtidos neste caso se mantiveram praticamente constantes. Estes resultados estão de acordo com as observações de EZZAT (1990) e VAFPOULOU et al. (1988) com relação a queijos Ras e Feta, respectivamente. Os autores estudaram a fabricação destes queijos adicionando a mesma enzima nos dois casos e não observaram um aumento significativo de pH para os queijos controle e com adição de enzima.

Acidez titulável e lactose

Nos processos B e C os resultados obtidos confirmaram aqueles apresentados pela literatura, de que a maior quantidade de ácido láctico se forma durante as primeiras 18-48 horas após a fabricação dos queijos (ROGICK, 1951). No processo B, os queijos fabricados pelo método modificado permaneceram mais ácidos do que os queijos tradicionais durante o período de maturação.

No processo A os resultados diferem da literatura consultada, uma vez que o maior desenvolvimento de acidez ocorreu após uma semana de maturação; o que pode ter acontecido devido a problemas encontrados no controle da temperatura da câmara de maturação. Também neste processo os queijos modificados permaneceram mais ácidos do que os queijos tradicionais.

Ainda, segundo a literatura a lactose tem tendência a zero no final da maturação (SCHIFTAN & KOMATSU, 1980). Esta tendência foi observada nos queijos dos processos A e C. No processo B não foi detectada a presença de lactose desde o início da maturação o que confirma a possibilidade do fermento mesófilo neste processo estar mais ativo.

Umidade

O queijo Prato deve apresentar, segundo legislação vigente, o teor máximo de umidade igual a 45% (SCHIFTAN & KOMATSU, 1980). Os queijos obtidos nos processos A, B e C apresentaram valores que estão de acordo com a literatura. No processo A, a variação foi de 41,99 a 39,86%, para os queijos obtidos pelo método tradicional e, de 43,39 a 40,44% para o método modificado; enquanto no processo C foi de 40,97 a 36,74% para os queijos tradicionais e de 40,47 a 36,42% para os modificados. No processo B o teor de umidade variou de 41,40 a 40,82% no método tradicional e de 40,22 a 39,15% no modificado. No processo A os queijos obtidos se apresentaram ligeiramente mais úmidos do que no processo B, ao passo que no

processo C os queijos estavam mais secos. De modo geral os valores apresentados pelos métodos tradicional e modificado foram praticamente iguais nos três processos.

Gordura no Extrato Seco (G.E.S.)

De acordo com a literatura, o conteúdo de gordura no extrato seco de queijo Prato se situa na faixa de 47,7 a 51% (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979; SCHIFTAN & KOMATSU, 1980). Comparando os valores da literatura com os obtidos, verifica-se que o conteúdo de G.E.S nos processos A e C foi ligeiramente mais alto, tanto no método tradicional como no modificado (em torno de 53 a 57 %); no processo B, os valores obtidos coincidem com os dados da literatura situando-se em torno de 51% para os dois métodos. Isto é importante pois indica que a adição de enzimas proteolíticas ao queijo Prato não altera o conteúdo de G.E.S., o que possibilita a obtenção de produtos com igual plasticidade ao utilizado como padrão (método tradicional).

Cloretos (NaCl)

Os teores de cloretos nos queijos dos processos A e B, para os métodos tradicional e modificado situaram-se na faixa de 1,8 a 2,0%, o que está de acordo com a literatura. No processo C estes valores foram ligeiramente mais baixos tanto para o processo tradicional como para o modificado, variando de 1,42 a 1,78% no tradicional e de 1,49 a 1,80% no modificado.

Cinzas e Minerais (Ca, Mg, P)

Os resultados obtidos para os teores de cinzas nos processos A, B e C para os queijos tradicionais e modificados estão de acordo com a literatura, que aponta a faixa de 2,1 a 5,3% (SCHIFTAN & KOMATSU, 1980).

Os queijos fabricados pelo método modificado nos processos A, B e C apresentaram valores de Ca, Mg, e P praticamente iguais aos queijos fabricados pelo método tradicional, indicando que a adição da enzima Neutrase® à massa do queijo não ocasiona a perda de minerais.

5.4- Proteólise

A avaliação direta da proteólise dos queijos tradicional e modificado foi realizada por meio das análises das frações nitrogenadas pelo método de Kjeldahl, da reação colorimétrica com TNBS e com ninidrina-cádmio e determinação dos teores de tirosina e triptofano.

5.4.1- Nitrogênio solúvel em pH 4,6 e em TCA 12% (Kjeldahl)

A Tabela 17 mostra os resultados médios obtidos para as análises de nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 e em TCA 12% (nitrogênio não protéico - NNP), obtidos pelo método de Kjeldahl, para os três processos (A, B e C) durante o período de maturação. Na Tabela 18 observa-se a variação das análises de NS em pH 4,6 e NNP entre os processos estudados.

TABELA 17: Resultados médios das análises de NS em pH 4,6 e NNP dos queijos fabricados pelos métodos tradicional e modificado dos processos A, B e C.

		Processo A		Processo B		Processo C	
		NS-pH4,6(%)	NNP (%)	NS-pH 4,6(%)	NNP (%)	NS-pH 4,6(%)	NNP (%)
1 dia	Tradicional	1,45 ^a ± 0,02	0,62 ^a ± 0,01	1,87 ^a ± 0,07	0,65 ^a ± 0,00	1,40 ^a ± 0,07	0,43 ^a ± 0,04
	Modificado	2,47 ^b ± 0,09	1,00 ^b ± 0,03	3,75 ^b ± 0,04	0,85 ^b ± 0,04	1,79 ^b ± 0,07	0,72 ^b ± 0,00
	dms	0,431	0,148	0,332	0,174	0,430	0,167
7 dias	Tradicional	1,76 ^a ± 0,05	0,91 ^a ± 0,06	2,23 ^a ± 0,05	0,88 ^a ± 0,05	1,89 ^a ± 0,03	0,96 ^a ± 0,02
	Modificado	3,87 ^b ± 0,03	1,31 ^b ± 0,02	4,53 ^b ± 0,03	1,46 ^b ± 0,02	2,31 ^b ± 0,04	1,18 ^b ± 0,00
	dms	0,289	0,274	0,284	0,244	0,217	0,080
14 dias	Tradicional	2,37 ^a ± 0,08	1,32 ^a ± 0,16	2,53 ^a ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	2,42 ^a ± 0,10	1,22 ^a ± 0,02
	Modificado	4,47 ^b ± 0,11	1,84 ^a ± 0,08	5,60 ^b ± 0,02	1,78 ^b ± 0,00	3,63 ^b ± 0,00	1,77 ^b ± 0,02
	dms	0,618	0,749	0,121	0,002	0,433	0,139
21 dias	Tradicional	2,36 ^a ± 0,06	1,15 ^a ± 0,01	3,01 ^a ± 0,11	1,22 ^a ± 0,02	2,85 ^a ± 0,00	1,52 ^a ± 0,00
	Modificado	4,94 ^b ± 0,04	2,21 ^b ± 0,08	6,18 ^b ± 0,00	2,52 ^b ± 0,04	4,07 ^b ± 0,70	1,93 ^b ± 0,09
	dms	0,330	0,363	0,495	0,207	0,707	0,388
28 dias	Tradicional	2,51 ^a ± 0,07	1,25 ^a ± 0,07	3,25 ^a ± 0,10	1,24 ^a ± 0,00	2,85 ^a ± 0,00	1,90 ^a ± 0,02
	Modificado	4,54 ^b ± 0,00	2,12 ^b ± 0,06	6,03 ^b ± 0,01	2,52 ^b ± 0,00	4,89 ^b ± 0,10	2,25 ^b ± 0,05
	dms	0,315	0,383	0,456	0,002	0,446	0,235
40 dias	Tradicional	2,94 ^a ± 0,05	1,54 ^a ± 0,01	3,39 ^a ± 0,11	1,30 ^a ± 0,16	3,38 ^a ± 0,08	2,18 ^a ± 0,04
	Modificado	5,89 ^b ± 0,01	2,97 ^b ± 0,13	6,15 ^b ± 0,01	2,62 ^b ± 0,02	5,12 ^b ± 0,00	3,13 ^b ± 0,03
	dms	0,228	0,569	0,475	0,699	0,353	0,233

dms: Diferença mínima significativa do teste de Tukey ao nível de erro de 5%.

Em uma mesma coluna, médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de erro de 5%.

TABELA 18: Resultados da análise de variância entre os processos A, B e C para as análises de NS-pH 4,6 e NNP.

		Tradicional		Modificado	
		NS pH4,6(%)	NNP (%)	NS pH 4,6(%)	NNP (%)
1 dia	Processo A	1,45 ^a ± 0,03	0,62 ^b ± 0,01	2,47 ^b ± 0,10	1,00 ^b ± 0,03
	Processo B	1,87 ^b ± 0,07	0,65 ^b ± 0,00	3,75 ^c ± 0,04	0,85 ^{ab} ± 0,01
	Processo C	1,40 ^a ± 0,07	0,43 ^a ± 0,04	1,79 ^a ± 0,07	0,72 ^a ± 0,00
	dms	0,347	0,142	0,426	0,174
7 dias	Processo A	1,76 ^a ± 0,06	0,91 ^a ± 0,06	3,87 ^b ± 0,03	1,31 ^b ± 0,02
	Processo B	2,23 ^b ± 0,06	0,88 ^a ± 0,05	4,53 ^c ± 0,03	1,46 ^c ± 0,02
	Processo C	1,89 ^a ± 0,03	0,96 ^a ± 0,02	2,31 ^a ± 0,04	1,18 ^a ± 0,00
	dms	0,297	0,284	0,211	0,091
14 dias	Processo A	2,37 ^a ± 0,08	1,32 ^a ± 0,16	4,47 ^b ± 0,11	1,84 ^a ± 0,08
	Processo B	2,53 ^a ± 0,00	1,00 ^a ± 0,00	5,60 ^c ± 0,03	1,78 ^a ± 0,08
	Processo C	2,42 ^a ± 0,10	1,22 ^a ± 0,02	3,63 ^a ± 0,00	1,77 ^a ± 0,02
	dms	0,449	0,536	0,405	0,277
21 dias	Processo A	2,36 ^a ± 0,06	1,15 ^a ± 0,01	4,94 ^b ± 0,04	2,21 ^{ab} ± 0,08
	Processo B	3,01 ^b ± 0,11	1,22 ^b ± 0,02	6,18 ^c ± 0,00	2,52 ^b ± 0,04
	Processo C	2,85 ^b ± 0,00	1,52 ^c ± 0,00	4,07 ^a ± 0,16	1,93 ^a ± 0,09
	dms	0,392	0,07	0,573	0,446
28 dias	Processo A	2,51 ^a ± 0,07	1,25 ^a ± 0,07	4,54 ^a ± 0,00	2,12 ^a ± 0,05
	Processo B	3,25 ^b ± 0,10	1,24 ^a ± 0,00	6,03 ^c ± 0,01	2,52 ^b ± 0,00
	Processo C	2,85 ^a ± 0,00	1,90 ^b ± 0,02	4,89 ^b ± 0,10	2,25 ^a ± 0,05
	dms	0,437	0,242	0,355	0,240
40 dias	Processo A	2,94 ^a ± 0,05	1,54 ^a ± 0,01	5,89 ^b ± 0,01	2,97 ^{ab} ± 0,13
	Processo B	3,39 ^a ± 0,11	1,30 ^a ± 0,16	6,15 ^c ± 0,01	2,62 ^a ± 0,02
	Processo C	3,38 ^a ± 0,08	2,18 ^b ± 0,04	5,12 ^a ± 0,01	3,13 ^b ± 0,03
	dms	0,498	0,570	0,064	0,465

dms: Diferença mínima significativa do teste de Tukey ao nível de erro de 5%.

Em uma mesma coluna, médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de erro de 5%.

Como se pode observar na Tabela 17 os queijos fabricados pelo método modificado apresentaram valores de NS-pH 4,6 significativamente maiores ($p < 0,05$) do que aqueles fabricados pelo tradicional, durante todo o período de maturação para todos os processos estudados (A, B e C). VAFOPOULOU et al. (1988) adicionaram a enzima Neutrase® ao leite na fabricação de queijo Feta e obtiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) nos teores de NS-pH 4,6 com 20, 40, 80 e 120 dias de cura quando comparados ao queijo controle; mas com 8 meses de maturação a diferença não foi significativa. Os dados da análise estatística apresentados na Tabela 18 mostram que no processo B os teores de NS-pH 4,6 foram significativamente mais elevados ($p < 0,05$) do que os obtidos nos processos A e C em todos os dias de cura. O processo A apresentou valores significativamente ($p < 0,05$) maiores que o C. A maior acidez da coalhada dos queijos modificados durante a fabricação no processo B pode ter ocasionado uma maior retenção de coalho na massa, o que poderia explicar a alta concentração de NS-pH 4,6 observada neste tratamento. Os queijos fabricados pelo método modificado no processo A apresentaram valores de NS-pH 4,6 menores do que no processo B ($p < 0,05$), apesar da quantidade de enzima adicionada neste processo ter sido maior do que em B. O que pode ter levado a isto é o fato da concentração de enzima retida na massa de A ter sido menor do que em B e a coalhada destes queijos ter se apresentado menos ácida, como já citado anteriormente. Os queijos fabricados pelo método modificado no processo C, quando comparados àqueles dos processos A e B apresentaram porcentagens de NS-pH 4,6 menores ($p < 0,05$), apesar da maior quantidade de enzima na massa dos queijos C. Essa diferença pode ter sido causada pelo fato da porcentagem de ácido láctico presente na coalhada durante a fabricação dos queijos do processo C ter sido bem menor do que da massa dos queijos modificados dos processos A e B. Os queijos modificados do processo C estavam mais secos e com teor de sal mais baixo durante todo o período de maturação, quando comparados aos processos A e B, o que pode ter contribuído para a diminuição nos teores de NS-pH 4,6. A menor quantidade de soro deixada na massa no momento da adição da enzima aos queijos modificados do processo C pode ter colaborado para uma menor atividade da mesma. A enzima Neutrase® pode também possuir sua maior atividade nos 20 minutos em que a massa é deixada em repouso, o

que explicaria o fato dos processos A e B, que possuíam uma maior concentração da enzima terem apresentado valores de NS mais altos. VAFPOULOU et al, (1989) estimaram a estabilidade da enzima Neutrase® em solução tampão (pH 5,2) contendo 6% de NaCl a 16°C e obtiveram como resultado que a proteinase neutra perdeu 75% da sua atividade original após 3 dias e 90% após 7 dias.

GUINEE et al. (1991), observaram uma aceleração em todos os níveis da proteólise quando adicionaram Neutrase® na fabricação de queijo Cheddar. Observa-se na Tabela 17 que os queijos fabricados pelo método modificado apresentaram desde o primeiro até o 40º dia de maturação, valores de NNP bem mais elevados ($p < 0,05$) do que aqueles fabricados pelo tradicional. Contudo observa-se na Tabela 18 que a variação foi mais homogênea entre os processos sendo diferente daquela encontrada para os valores de NS-pH 4,6. Segundo VAFPOULOU et al. (1989), o efeito da enzima usada parece ser maior durante a maturação primária. NUÑEZ et al.(1991) reportaram que a fração NS-pH 4,6 foi a mais afetada pela adição da enzima Neutrase® na fabricação de queijo Manchego. Já FERNANDEZ-GARCIA et al. (1994) estudando aceleração de maturação de queijo Manchego, verificaram um maior aumento no NS em TCA.

Extensão da maturação

A formação de nitrogênio solúvel em pH 4,6 é um bom indicador da atividade proteolítica devido a ação do agente coagulante. Foram determinados os peptídeos de peso molecular alto e médio provenientes da α_1 -caseína e β -caseína, podendo também estar incluídos peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos (CHRISTENSEN et al, 1991; FARKEY et al., 1990). Os resultados do conteúdo de nitrogênio solúvel em pH 4,6 foram relacionados com o conteúdo de nitrogênio total e expressos como índice de extensão de maturação (I.E.M.) e de NNP relacionados com o de nitrogênio total e expressos como índice de profundidade da maturação (I.P.M.). Estes índices são considerados índices brutos e não refletem a totalidade das transformações que as proteínas sofrem durante o processo de maturação.

O índice de extensão da maturação (I.E.M.-relação NS-pH_{4,6}/NT), é um fator de grande importância na composição final e nas características organolépticas do produto, caracterizando-se pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis na fase aquosa dos queijos, produzidas a partir da degradação da caseína por ação do coalho e acumuladas durante o processo de maturação. O acompanhamento do índice de extensão de maturação permite conhecer melhor o índice de aproveitamento dos elementos do leite na coalhada, a atividade proteolítica do coalho, do fermento e das enzimas, bem como o momento ideal de lançamento do queijo no mercado. Este índice aumenta com o avanço da maturação; de acordo com ROGICK (1951), estes valores para o queijo Prato seriam de 4,2 após 2 dias; 7,7 após 15 dias; 14,5 após 30 dias e 23,3 após 90 dias de maturação. WOLFSCHOON-POMBO (1983), determinando o índice de maturação de alguns queijos brasileiros, encontrou valores entre 5,1 a 8,2% para o queijo Prato após 4 dias e entre 11,9 a 14% após 30 dias de maturação. Os dados referentes aos índices de extensão (IEM) da maturação, dos queijos tradicionais e modificados podem ser observados na Tabela 19.

TABELA 19: Nitrogênio solúvel em pH 4,6, como % de nitrogênio total, dos queijos tipo Prato tradicional e modificado obtidos nos processos A, B e C

Maturação (Dias)	Processo A		Processo B		Processo C	
	Tradicional	Modificado	Tradicional	Modificado	Tradicional	Modificado
1	6,80	11,41	8,07	16,02	6,38	7,92
7	7,56	17,32	9,80	20,03	8,35	10,04
14	10,12	19,46	11,50	24,38	10,73	15,61
21	10,33	21,20	13,46	26,24	12,34	16,76
28	11,17	20,78	13,95	26,33	12,46	21,67
40	12,73	25,97	15,37	26,14	14,90	21,49

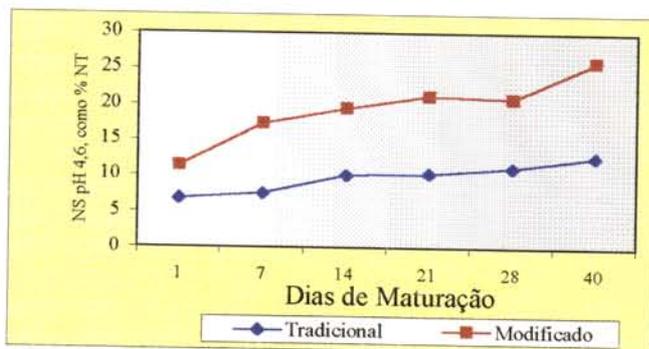
Observando-se os dados apresentados na Tabela 19 verifica-se que a proteólise nos queijos fabricados pelo método modificado foi bem mais elevada do que nos queijos tradicionais. A variação no processo A foi de 6,80 a 12,73 para o método tradicional e de 11,41 a 25,97 para o modificado. No processo B, foi de 8,07 a 15,37

para o método tradicional e de 16,02 a 26,14, para o método modificado. No processo C a variação foi de 6,38 a 14,90 no tradicional e de 7,92 a 21,49 no modificado. As curvas representando a evolução do índice de extensão durante o período de maturação nos processos A, B e C são apresentadas na Figuras 08.

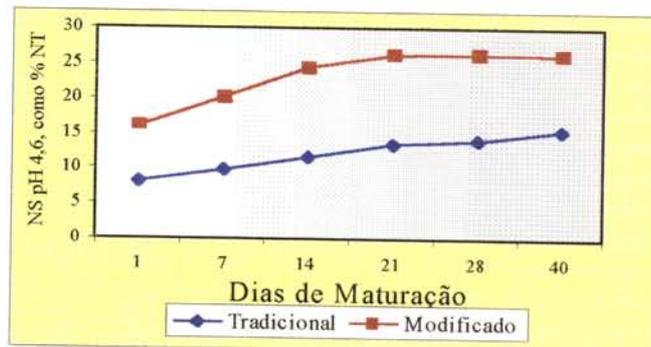
A análise de variância mostrou, já no primeiro dia de maturação e durante todo o período, um índice de extensão (% NS-pH 4,6/NT) significativamente maior ($p < 0,05$) para os queijos fabricados pelo método modificado em todos os processos. Dos três processos o B foi o que apresentou valores mais elevados para o I.E.M. MINUSSI et al. (1995) adicionaram um coquetel de enzimas (Flavorage) ao leite para acelerar a maturação do queijo tipo Prato e obtiveram até 30 dias um aumento no índice de extensão similar ao controle, sendo que a partir daí o aumento foi de 4,05% com 45 dias e de 8,23% com 60 dias.

No processo A a relação NS-pH 4,6/NT dos queijos modificados foi 67,79% maior que o tradicional com 1 dia de maturação e 104% com 40 dias. No B foi de 98,51% com 1 dia e 70,07% com 40 dias. No processo C, que foi o processo que apresentou valores mais baixos, foi 24,14% com 1 dia e 44,22% com 40 dias. No processo A os valores apresentados pelos queijos modificados com 1 dia eram próximos daqueles alcançados pelos tradicionais com 28 dias. No B os valores com 1 dia dos queijos modificados foram superiores aos alcançados com 40 dias pelos tradicionais e, no C, a % NS-pH4,6/NT para 14 dias no modificado era correspondente a 40 dias no tradicional .

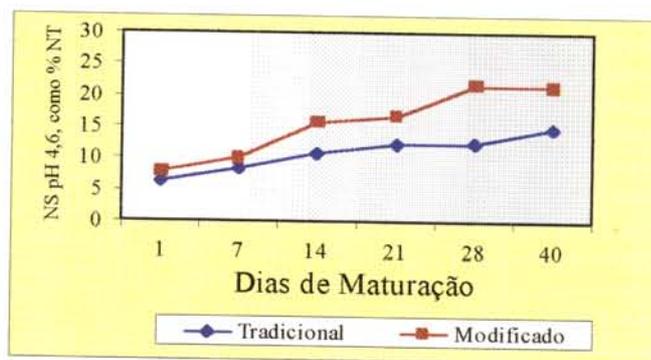
Os queijos modificados do processo A apresentaram um I.E.M. aos 7 dias (17,32) mais elevado do que o correspondente com 30 dias citado na literatura (14,0-14,5). No processo B, o valor obtido para um dia (16,02) já era maior. No processo C um valor próximo (15,61), foi alcançado com 14 dias de maturação.



Processo A



Processo B



Processo C

FIGURA 08: Índice de extensão de maturação dos queijos tradicionais e modificados fabricados pelos processos A, B e C.

Profundidade da Maturação

O índice de profundidade de maturação (I.P.M.-relação NNP/NT) foi calculado com a finalidade de se verificar a formação de substâncias de baixo peso molecular acumuladas durante o período de maturação, devido principalmente à ação proteolítica das enzimas microbianas sobre os compostos nitrogenados oriundos da degradação da caseína. Compostos característicos desta degradação são os aminoácidos, oligopeptídeos, aminas e outros compostos. A Tabela 20 mostra a evolução dos níveis de NNP/NT (I.P.M.) durante o período de cura dos queijos.

TABELA 20: Evolução do I.P.M. dos queijos Prato tradicional e modificado nos processos A, B e C.

Maturação (Dias)	Processo A		Processo B		Processo C	
	Tradicional	Modificado	Tradicional	Modificado	Tradicional	Modificado
01	2,80	4,62	2,83	3,63	1,93	3,20
07	3,93	5,81	3,87	6,45	4,24	5,13
14	4,80	8,01	4,54	7,75	5,41	7,61
21	4,99	9,50	5,46	10,71	6,58	7,95
28	5,52	9,70	5,32	11,00	8,31	9,97
40	6,64	13,12	5,89	11,14	9,57	13,16

A Figura 09 mostra a evolução do I.P.M. nos processos A, B e C. No processo A para os queijos produzidos pelo método modificado quando comparado ao tradicional, a relação NNP/NT foi 65% maior no primeiro dia de maturação e 97,59% com 40 dias. No processo B foi 28,27% maior no primeiro e 89,13% no último. No C foi 65,80% e 37,51% maior para o primeiro e último dia, respectivamente.

No I.P.M., ao contrário do que aconteceu com o I.E.M., os valores foram ligeiramente maiores para o processo A, o que pode indicar uma presença maior de aminoácidos e outros compostos que podem conferir sabor amargo. Isto talvez explique o fato dos queijos dos processos B e C terem apresentado sabor ligeiramente mais suave do que no processo A.

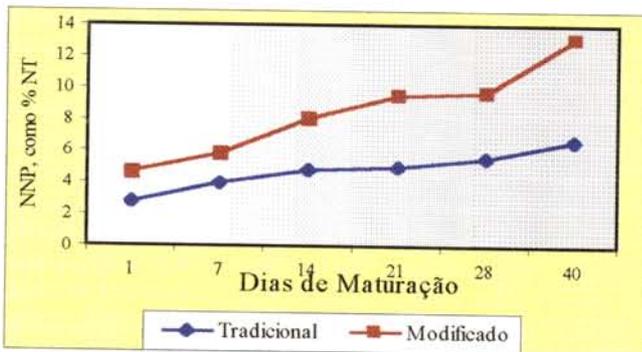
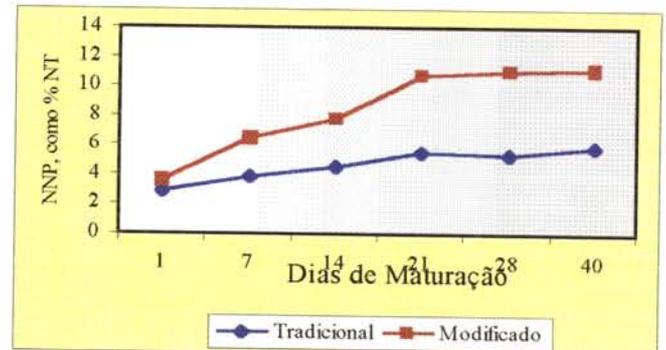
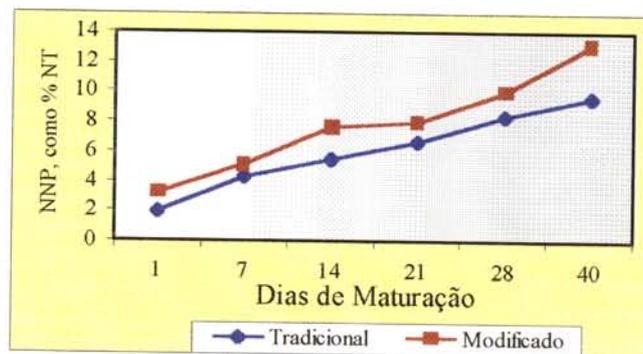
**Processo A****Processo B****Processo C**

FIGURA 09: Índice de profundidade de maturação dos queijos tradicionais e modificados fabricados pelos processos A, B e C.

5.4.2- Aminoácidos tirosina e triptofano

De acordo com VAKALERIS & PRICE (1959), a concentração de tirosina e triptofano solúveis nos queijos está estreitamente relacionada com a porcentagem de nitrogênio solúvel determinada pelo método de Kjeldahl. Estas relações expressas pelos coeficientes de correlação, foram de 0,964 e 0,886, respectivamente. Segundo os autores, a menor correlação entre o triptofano solúvel e o nitrogênio solúvel pode ser atribuída à decomposição do triptofano por processos enzimáticos, que passa a não absorver mais na região do ultra violeta. A Figura 10 apresenta as curvas resultantes da variação do teor do aminoácido tirosina durante o período de maturação dos queijos.

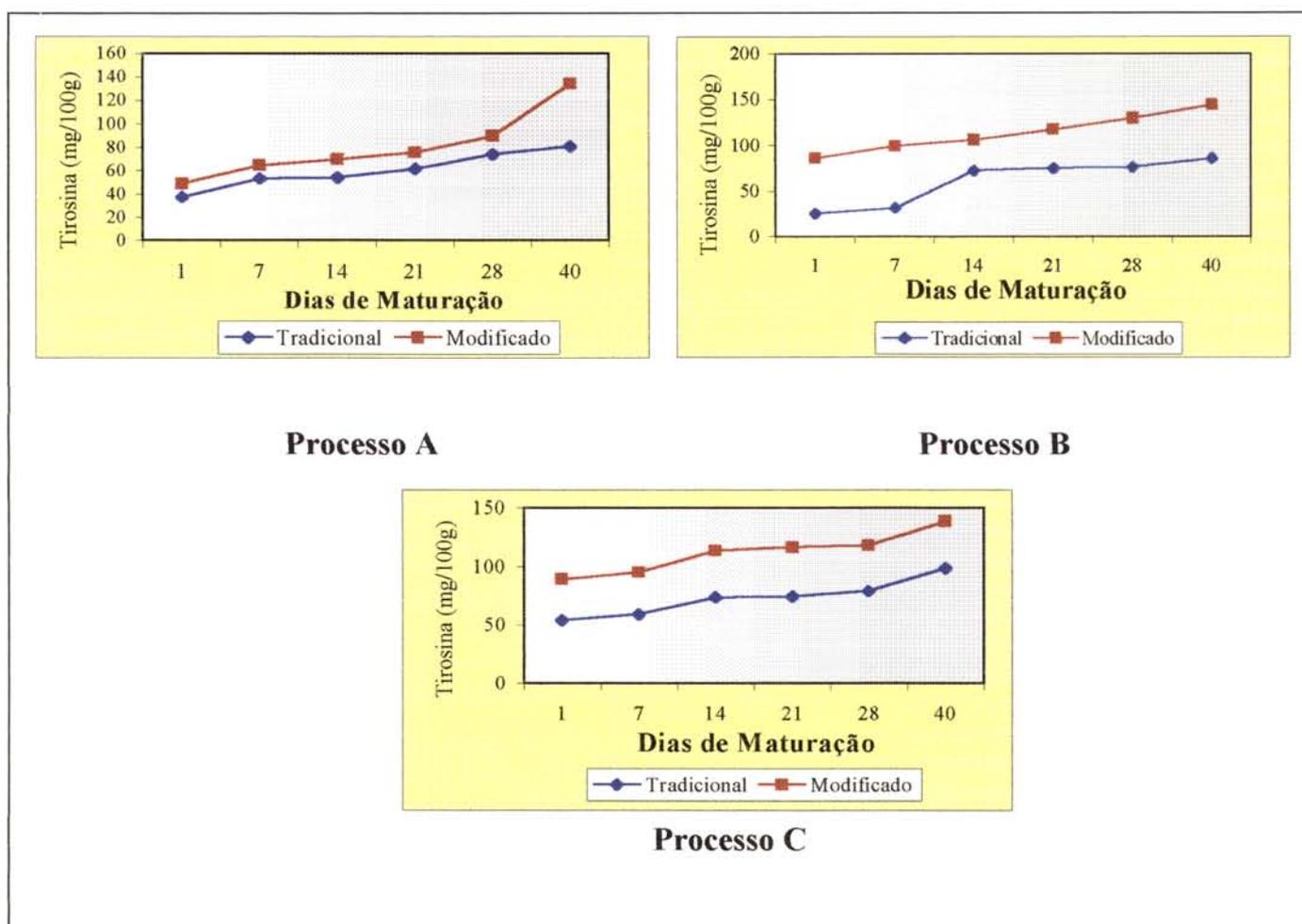


FIGURA 10: Variação do teor de tirosina durante a maturação dos queijos fabricados pelos métodos tradicional e modificado dos processos A, B e C.

A análise estatística mostrou que o aumento dos teores dos aminoácidos tirosina e triptofano foi maior ($p < 0,05$) nos queijos fabricados pelo método modificado quando comparados àqueles do tradicional. A tirosina variou de 36,87 a 80,23 no método tradicional e de 48,35 a 133,44 no modificado (processo A). No processo B, a variação foi de 25,36 a 85,75 no tradicional e de 85,76 a 144,27 no modificado e, para o C, a evolução foi de 53,46 a 98,35 para o método tradicional e de 84,59 a 138,28 no modificado, como se pode observar na Figura 10. O processo B apresentou valores mais elevados para o método modificado como aconteceu com a fração de NS- pH 4,6 analisada por Kjeldhal. A Figura 11 apresenta a evolução da concentração de triptofano durante a maturação dos queijos. Os queijos obtidos pelo método modificado apresentaram teores de triptofano significativamente maiores ($p < 0,05$) do que aqueles fabricados pelo método tradicional para os três processos estudados (A, B e C).

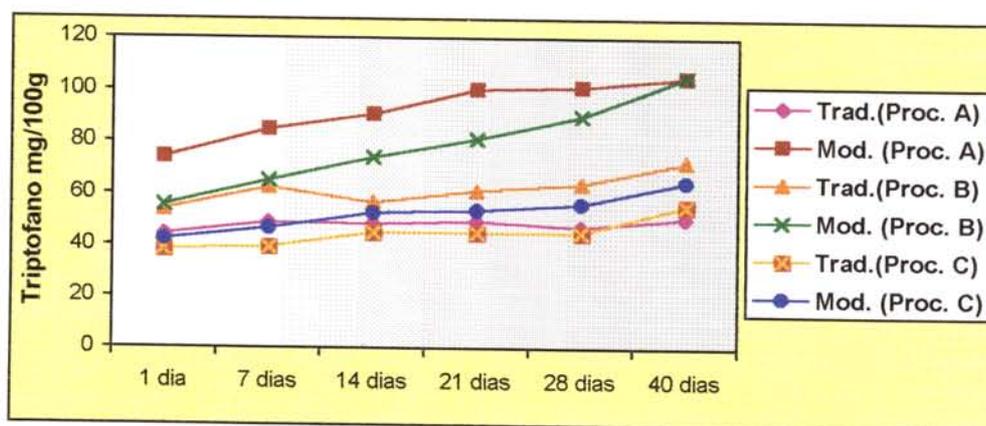


Figura 11: Variação do teor de triptofano durante a maturação dos queijos fabricados pelos métodos tradicional e modificado nos processos A, B e C.

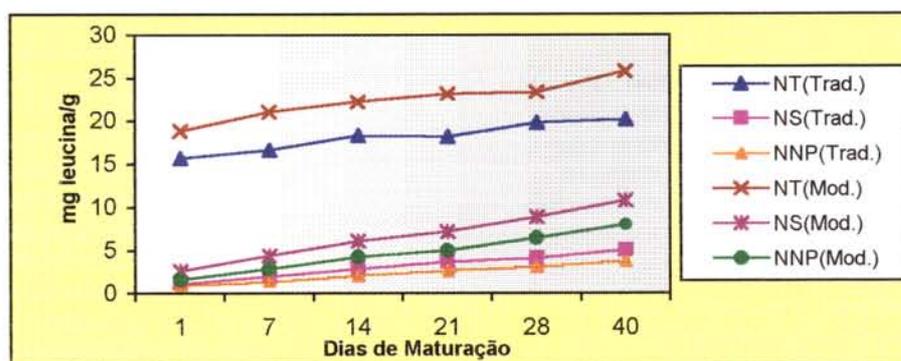
5.4.3-Formação de grupamentos amínicos em decorrência da proteólise

5.4.3.1-Reação com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)

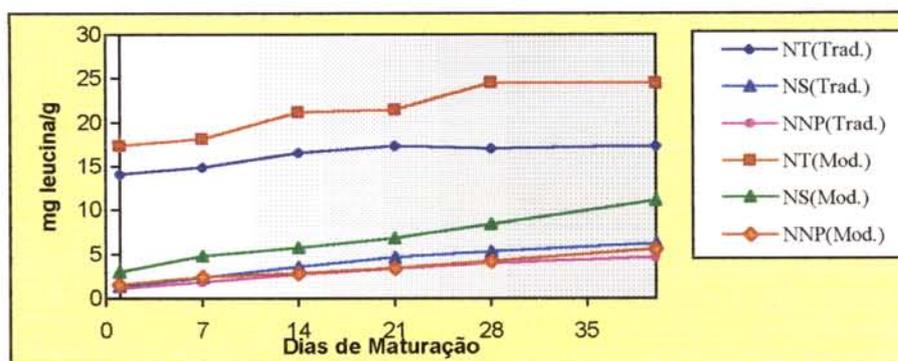
Na Figura 12 são apresentados os valores de α -aminonitrogênio determinados por reação com TNBS nas frações 1 (NT), 2 (NS-pH4,6) e 3 (NNP) durante o período de maturação dos queijos tradicional e modificado obtidos nos processos A, B e C. Os resultados foram expressos como mg leucina/g de queijo.

Avaliando-se estes dados observa-se que um aumento gradual nos teores de grupamentos amínicos livres em todas as frações nos dois processos (tradicional e modificado), com um aumento ligeiramente maior no final da maturação. Além disso, nos três casos os queijos fabricados pelo método modificado apresentaram valores bem mais elevados do que os fabricados pelo tradicional.

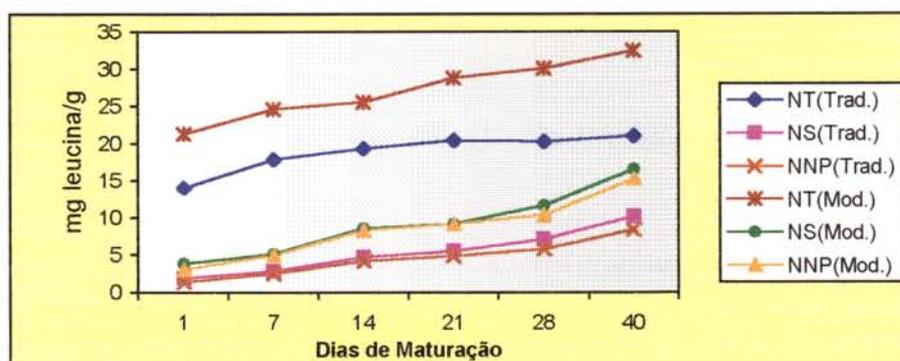
No processo A a razão NS-pH 4,6/NT variou de 17,00 a 45,20 no método modificado e de 9,19 a 35,75 no tradicional. Os valores obtidos para o modificado foram entre 1,85 a 1,24 vezes maiores do que aqueles encontrados para o tradicional. No processo B, a razão NS-pH 4,6/NT foi 2,03 a 1,65 vezes maior para os queijos modificados, variando de 6,96 a 25,38 para o processo tradicional e de 14,15 a 41,89 no modificado. No C, a variação foi de 13,27 a 48,26 nos queijos tradicionais e de 17,88 a 47,06 nos modificados. A diferença entre os queijos dos métodos modificado e tradicional encontrada para o processo C foi mais baixa do que em A e B.



Processo A



Processo B



Processo C

FIGURA 12: Efeitos da maturação nas frações nitrogenadas determinadas por reação colorimétrica com TNBS, nos queijos fabricados pelo métodos tradicional e modificado (processos A, B e C)

A razão NNP/NT variou de 8,56 a 22,60 para os queijos modificados e de 7,62 a 26,50 nos tradicionais para o processo A. Esta variação foi de 5,75 a 18,68 nos queijos fabricados pelo método tradicional e de 8,67 a 30,97 para os queijos modificados no processo B. No C, variou de 9,99 a 39,75 nos queijos tradicionais e de 14,45 a 47,06 nos modificados. A variação encontrada foi cerca de 1,06 a 1,65 vezes maior para o método modificado. Isto indica que a proteólise nos queijos fabricados pelo método modificado com adição de enzimas proteolíticas é mais intensa do que no processo tradicional já na primeira semana de maturação.

5.4.3.2- Reação colorimétrica com ninidrina-cádmio

O método que utiliza o reagente de ninidrina-cádmio é uma modificação daquele desenvolvido por DOI et al. (1981), adaptado para o monitoramento da proteólise em queijos. Esta modificação permitiu um aumento na sensibilidade da reação com ninidrina-cádmio em relação ao TNBS, para medidas de grupamentos amínicos livres, podendo ser realizado utilizando-se frações preparadas com citrato, água, ácido clorídrico (pH 4,6) ou ácido fosfotúngstico (PTA), mas não nas frações preparadas com TCA, uma vez que este reagente parece interferir no desenvolvimento de cor. KUCHAROO et al. (1983) observaram que o método do TNBS era reprodutível para o monitoramento da proteólise em queijos e concluíram que, embora pudesse ser aplicado para análise no queijo não fracionado, era mais sensível se aplicado nas frações de nitrogênio solúvel em pH 4,6.

Na Figura 13 são apresentados os valores de grupamentos amínicos livres reativos com ninidrina-cádmio para a fração 2 (NS-pH 4,6). Os resultados foram expressos como mg leucina/g queijo.

Como na reação com TNBS, os dados mostram um aumento gradual nos teores de grupamentos amínicos livres, com um aumento ligeiramente maior no final do período de maturação, em todos os processos.

Os valores obtidos para o método modificado apresentam-se mais elevados do que aqueles obtidos para o tradicional, com exceção dos valores para 1 e 7 dias do processo B.

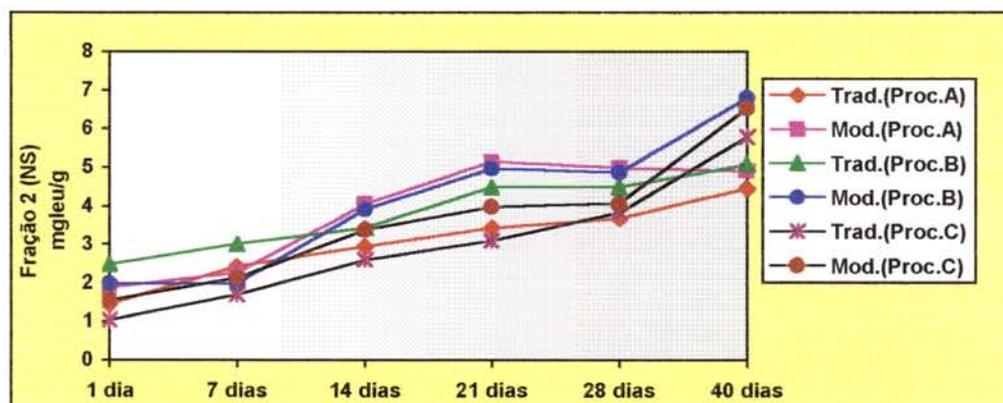


FIGURA 13: Efeitos da maturação nas frações nitrogenadas determinadas por reação colorimétrica com ninidrina-cádmio, nos queijos fabricados pelo métodos tradicional e modificado (Processos A, B e C).

5.4.4- Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE)

A proteólise primária é medida pelo aparecimento das frações α_{s1} -I e γ -caseínas, em decorrência da hidrólise da α_{s1} - e β -caseínas, respectivamente. A cadeia de α_{s1} -caseína tem muitas regiões susceptíveis à ação da quimosina. A mais sensível é a ligação entre os resíduos 23:24 ou 24:25 (CREAMER & RICHARDSON, 1974). Sua hidrólise leva à formação de um peptídeo básico contendo 23 ou 24 aminoácidos e um polipeptídeo de alto peso molecular, a α_{s1} -I (f 24 –199). Esse polipeptídeo tem caráter mais ácido que a α_{s1} -caseína e mobilidade eletroforética ligeiramente maior. A α_{s1} -I caseína é relativamente resistente à hidrólise posterior e, por essa razão, aparece em grandes quantidades na maioria dos queijos.

Na região da β -caseína há uma banda central entre duas bandas menores, geralmente mascaradas pela maior. A banda menor com velocidade de migração ligeiramente maior, provavelmente representa a fração β -I (CREAMER & MILLS, 1971). A quimosina tem uma ação limitada sobre a β -caseína, formando três peptídeos a partir da região N-terminal, denominados β -I, β -II e β -III, classificados em ordem de formação e de mobilidade eletroforética crescente. É improvável que o aumento da fração γ -caseína derivada da β seja devido à ação da quimosina, porque a β -caseína no queijo é resistente ao ataque da quimosina e em soluções diluídas dá origem a peptídeos com mobilidade eletroforética maior (CREAMER, 1975).

O perfil eletroforético dos queijos fabricados pelos métodos tradicional e modificado, nos vários estágios de maturação, dos processos A, B e C, é apresentado nas Figuras 14, 15 e 16. O perfil de separação obtido pode ser dividido em várias regiões: componentes que se movem mais rapidamente ou seja, a α_{S1} -caseína, a β -caseína e os componentes de baixa mobilidade (γ_3 , γ_1 , γ_2).

A hidrólise da β -caseína é atribuída, em parte à ação da plasmina, que causa uma hidrólise significativa desta fração, produzindo γ -caseínas e proteose-peptonas (GRAPPIN et al., 1985). Sua atividade é percebida pelas mudanças nas concentrações de β - e γ -caseínas, e parece estar relacionada com o pH do queijo (CREAMER, 1975). Níveis maiores de γ -caseínas são observados em queijos com valores mais altos de pH. Os resultados da eletroforese mostram o aparecimento de bandas de γ_3 , γ_1 e γ_2 , já visíveis com 1 dia de maturação, evidenciando uma possível ação da plasmina, atuando na degradação da β -caseína.. Analisando-se a Figura 14, observa-se a maior degradação da β -caseína no método modificado em relação ao tradicional, com maior acúmulo de alguns produtos de degradação da fração β -caseína (proteose-peptonas), com mobilidade menor do que as γ -caseínas. A concentração destes produtos de degradação aumentou durante o período de maturação. Estes resultados estão de acordo com os observados por FERNANDEZ-GARCIA et al. (1994) onde a enzima

Neutrase® foi adicionada ao leite na fabricação de queijo Manchego. Segundo estes autores a análise em Uréia-PAGE mostrou, nos queijos com adição da enzima, cerca de 60% de quebra na fração β -caseína, comparados com menos de 20% nos queijos controle. Bandas de baixa mobilidade resultantes da hidrólise da β -caseína e as γ -caseínas apareceram em maior concentração nos queijos tratados.

VAFOPOULOU et al. (1988) observaram no perfil eletroforético de queijos Feta com enzima Neutrase® adicionada ao leite, que a quebra nas frações da caseína diferiram tanto qualitativa como quantitativamente do queijo padrão.

No método modificado, nota-se uma degradação da α_{s1} com maior acúmulo de bandas com mobilidade maior, referentes a outros produtos de degradação da α_{s1} -caseína. A concentração destes produtos de degradação aumentou durante o período de maturação.

Comparando-se os processos A, B e C verifica-se apenas diferenças quantitativas em relação às três concentrações de enzima adicionadas (Figuras 14, 15 e 16). O processo C, onde a quantidade de enzima adicionada foi menor, foi o que apresentou menor concentração de produtos de degradação da α_{s1} e da β -caseínas.

O processo B (Figura 15) embora tivesse menor concentração de enzima adicionada do que no processo A, apresentou um perfil eletroforético semelhante. Provavelmente isto tenha ocorrido devido ao menor pH da massa com maior retenção de coalho e a maior quantidade de enzima retida na massa observados neste processo.

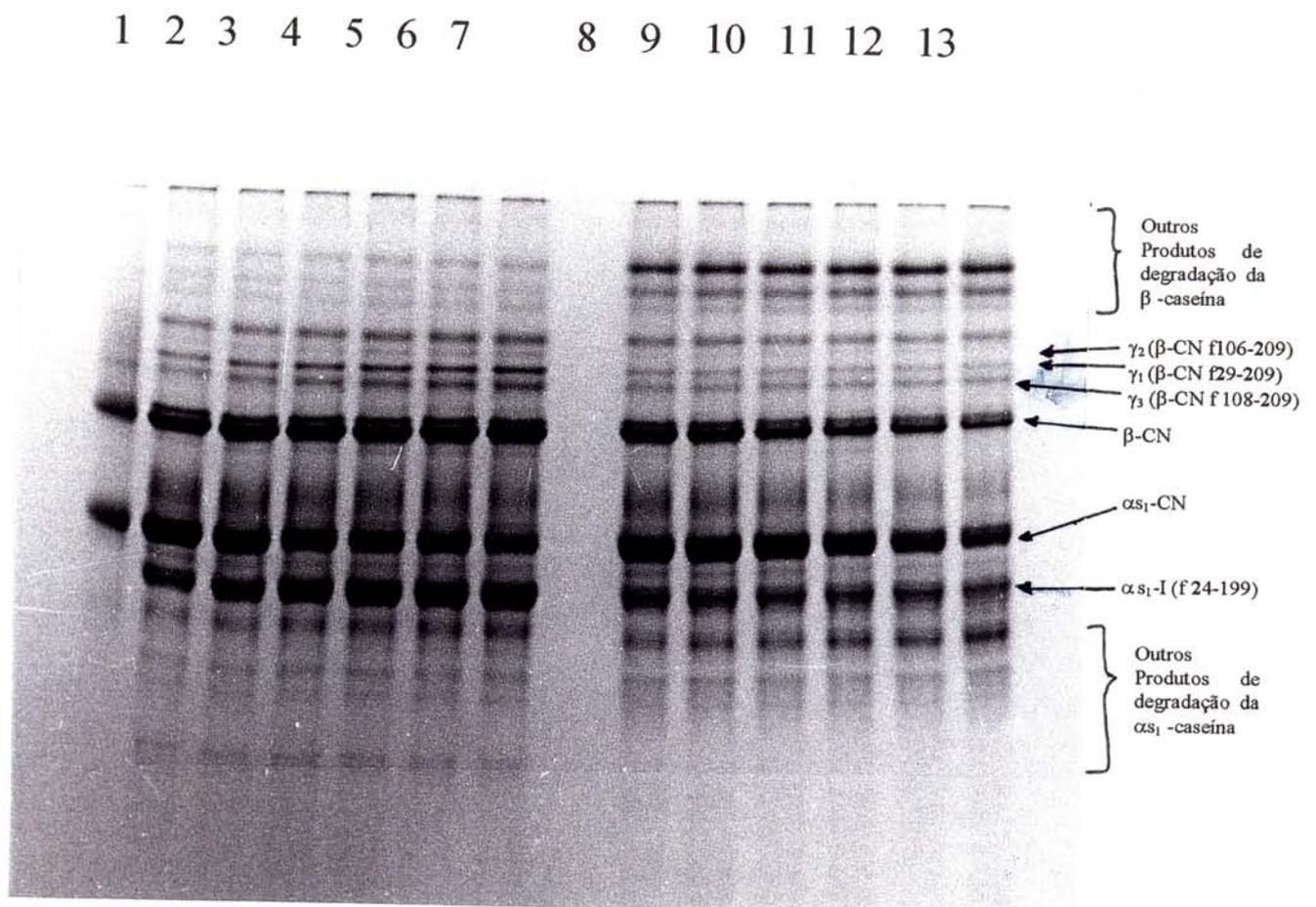


FIGURA 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) do queijo tipo Prato. **(Processo A)** Linha 1: Caseinato de sódio; linhas 2 a 7, amostras com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (queijo tradicional); linhas 8 a 13 (queijo modificado) no mesmo período.

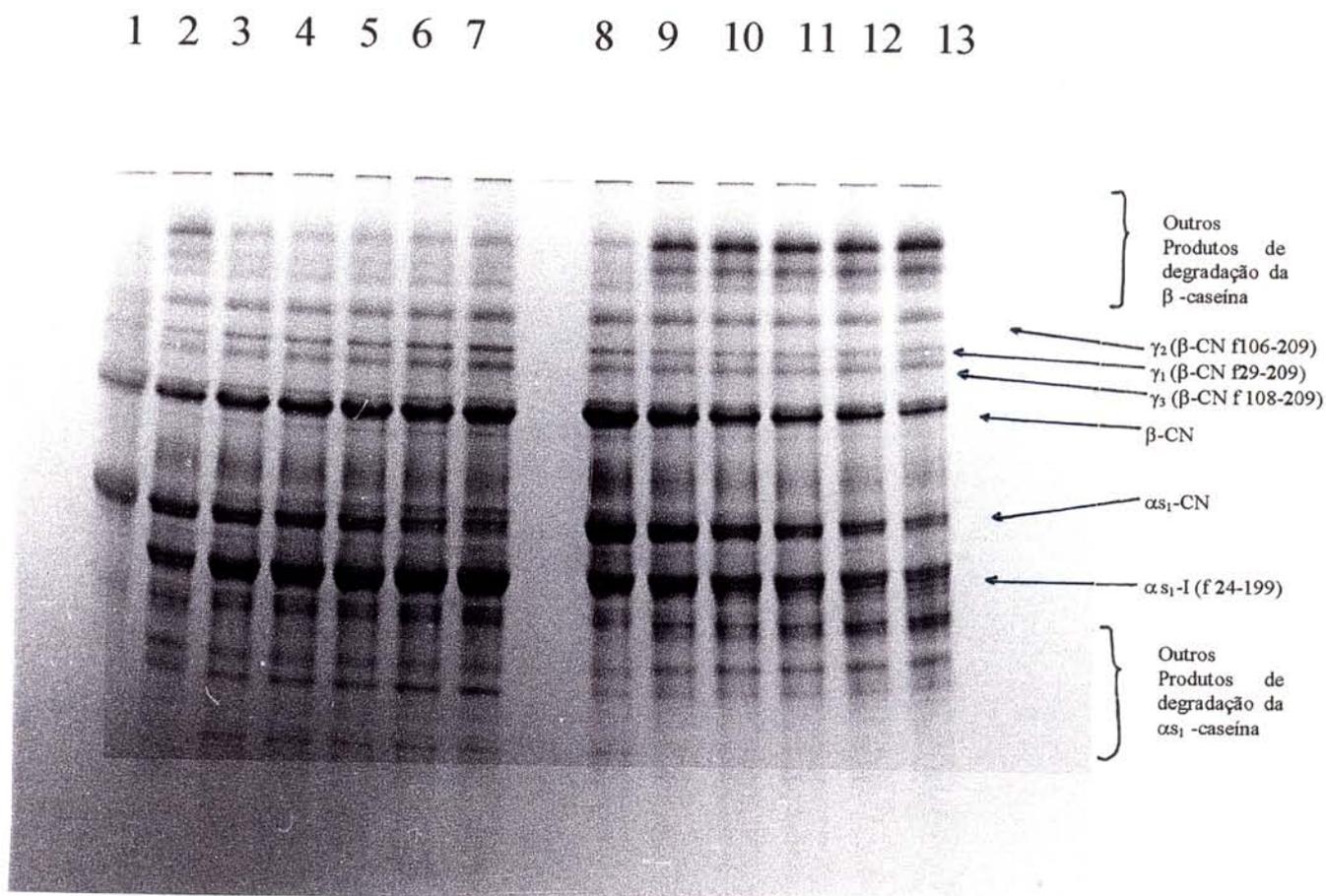


FIGURA 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) do queijo tipo Prato. **(Processo B)** Linha 1: Caseinato de sódio; linhas 2 a 7, amostras com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (queijo tradicional); linhas 8 a 13 (queijo modificado) no mesmo período.

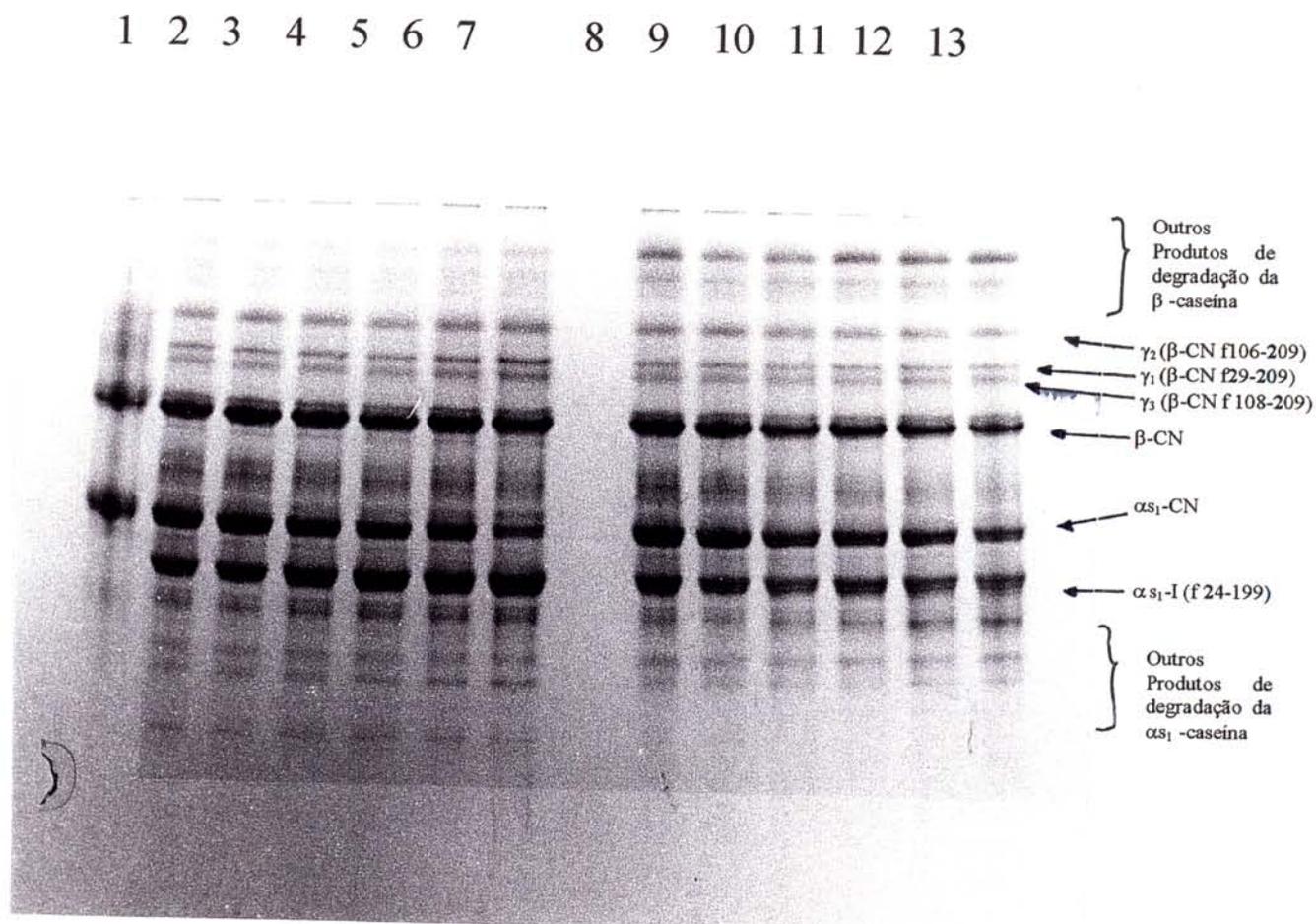


FIGURA 16: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) do queijo tipo Prato. **(Processo C)** Linha 1: Caseinato de sódio; linhas 2 a 7, amostras com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (queijo tradicional); linhas 8 a 13 (queijo modificado) no mesmo período.

5.5- Avaliação Instrumental da Textura

A análise da textura dos queijos fabricados pelos processos A, B e C foi realizada em cinco pontos aleatórios de cada amostra com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação. Fazendo-se uma análise dos gráficos obtidos no texturômetro TA-XT2, observou-se que o aspecto das curvas apresentadas por todas as amostras foi bastante semelhante. A força máxima é caracterizada por um pico bem definido e representa a firmeza da amostra, sendo que a porção negativa da curva não existiu para algumas amostras, indicando pouca ou nenhuma adesividade. Os resultados obtidos para o processo A são apresentados na Tabela 21.

TABELA 21: Resultados médios para as avaliações de textura para os queijos tradicionais e modificados (processo A).

		Firmeza (g)	Adesividade (g.s)
1 dia	Tradicional	348,667 ± 8,5 ^b	22,000 ± 1,0 ^a
	Modificado	298,667 ± 8,0 ^a	24,000 ± 1,0 ^a
	dms.	32,473	3,930
7 dias	Tradicional	338,333 ± 4,4 ^b	34,667 ± 0,3 ^b
	Modificado	282,333 ± 5,0 ^a	19,667 ± 0,3 ^a
	dms.	18,618	1,310
14 dias	Tradicional	323,667 ± 4,8 ^b	43,000 ± 3,2 ^b
	Modificado	275,667 ± 4,9 ^a	21,000 ± 0,0 ^a
	dms.	19,163	8,933
21 dias	Tradicional	305,333 ± 0,3 ^b	9,667 ± 0,3 ^a
	Modificado	233,000 ± 1,5 ^a	17,333 ± 0,3 ^b
	dms.	4,344	1,310
28 dias	Tradicional	322,000 ± 7,5 ^a	15,000 ± 0,5 ^a
	Modificado	380,333 ± 3,9 ^b	27,333 ± 1,2 ^b
	dms.	23,653	3,705
40 dias	Tradicional	281,000 ± 3,8 ^a	13,667 ± 0,3 ^a
	Modificado	255,000 ± 16,5 ^a	20,667 ± 0,3 ^b
	dms.	47,050	1,310

dms: Diferença mínima significativa do teste de Tukey ao nível de erro de 5%.

Em uma mesma coluna médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de erro de 5%.

Nos queijos provenientes do processo A, pode-se observar que tanto no tradicional como no modificado, a força máxima (firmeza) teve comportamento semelhante, isto é, os queijos apresentaram uma diminuição da firmeza.

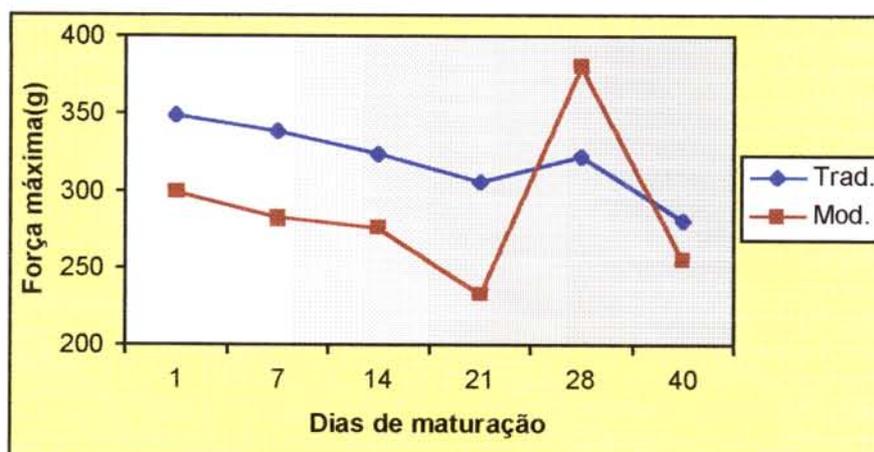


FIGURA 17: Resultados médios para o parâmetro firmeza dos queijos tradicionais e modificados durante o período de maturação. (processo A)

Os queijos fabricados pelo método modificado apresentaram valores para força máxima significativamente menores ($p < 0,05$) que os tradicionais desde o 1º até o 21º dia de maturação. Aos 28 dias, o modificado apresentou valores mais elevados e aos 40 dias os dois métodos não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$) (Tabela 21). Estes resultados podem indicar que a proteólise nos queijos modificados foi acelerada já com 1 dia de maturação.

Para uma melhor visualização, os resultados foram plotados na forma de gráfico (Figura 17). O decréscimo do índice de firmeza até o 21º dia de maturação corresponde à primeira fase da maturação, onde a quebra de aproximadamente 20% da α_{s1} -caseína leva a um enfraquecimento da rede, o que ocasiona um amolecimento da massa. CREAMER & OLSON (1982) observaram uma diminuição na firmeza do queijo Cheddar no início da maturação, que foi atribuída ao enfraquecimento desta fração da caseína.

O aumento da firmeza após 28 dias pode ter ocorrido devido à evaporação de água na superfície. De certo modo, a maturação em queijos salgados em salmoura ocorre da porção interna para a externa. A firmeza dos queijos com casca tende a aumentar durante a maturação, uma vez que a perda de umidade através da casca resulta num aumento na proporção caseína/umidade. Este efeito frequentemente anula a diminuição normal da firmeza devido à hidrólise da matriz protéica (LAWRENCE et al., 1987).

A adesividade oscilou bastante nos dois métodos estudados. No queijo tradicional, a adesividade se mostra linearmente crescente até o 14^o dia de maturação, sofrendo um decréscimo nas três semanas subseqüentes; ou seja, a adesividade atinge um pico no 14^o dia comprovando a mudança na textura durante a 1^a fase da maturação, como mostra a Figura 18.

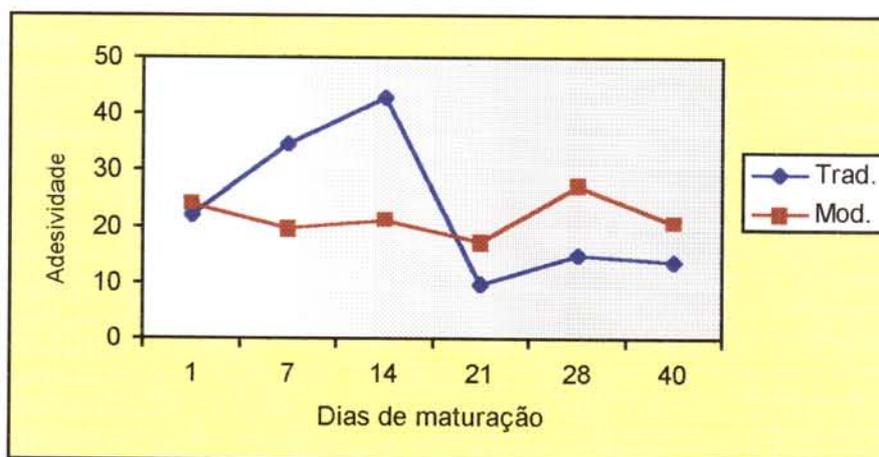


FIGURA 18: Comportamento do parâmetro adesividade durante a maturação dos queijos tradicionais e modificados (processo A).

No processo B, com o objetivo de se determinar o efeito da enzima Neutrase®, optou-se por avaliar ponta e meio do queijo, para se verificar se ocorre uma interação da umidade \times enzima. No processo B, os parâmetros avaliados foram: força máxima, força máxima negativa, área positiva e área negativa. A tabela 22 apresenta os resultados obtidos no processo B.

TABELA 22: Resultados médios dos parâmetros de textura. (processo B).

			Força Máxima	Força Máx. neg.	Área Positiva	Área Negativa
1 dia	Meio	Tradicional	692,333 ± 28,8 ^b	34,000 ± 1,0 ^b	77,333 ± 3,7 ^b	13,167 ± 2,5 ^a
		Modificado	506,333 ± 17,3 ^a	21,000 ± 1,1 ^a	56,767 ± 1,8 ^a	9,867 ± 1,8 ^a
		dms.	93,383	4,2444	11,460	8,621
	Ponta	Tradicional	661,333 ± 6,4 ^a	27,000 ± 4,0 ^a	72,133 ± 1,1 ^a	11,267 ± 3,8 ^a
		Modificado	613,667 ± 25,1 ^a	24,333 ± 1,6 ^a	66,667 ± 2,2 ^a	9,067 ± 1,5 ^a
		dms.	71,960	12,148	7,016	11,263
7 dias	Meio	Tradicional	552,667 ± 24,5 ^a	22,667 ± 0,6 ^b	63,800 ± 3,0 ^a	10,903 ± 0,5 ^b
		Modificado	459,333 ± 49,5 ^a	14,667 ± 1,2 ^a	53,543 ± 5,6 ^a	5,790 ± 0,2 ^a
		dms.	153,493	3,819	17,887	1,736
	Ponta	Tradicional	667,000 ± 0,6 ^a	27,000 ± 2,5 ^b	75,057 ± 0,7 ^a	14,597 ± 0,7 ^b
		Modificado	592,667 ± 33,6 ^a	17,667 ± 0,3 ^a	68,973 ± 4,3 ^a	5,003 ± 1,2 ^a
		dms.	93,529	7,054	12,231	4,033
14 dias	Meio	Tradicional	495,667 ± 8,2 ^a	35,000 ± 0,0 ^a	54,100 ± 0,9 ^a	28,113 ± 0,7 ^a
		Modificado	455,000 ± 20,0 ^a	36,000 ± 0,5 ^a	51,167 ± 2,0 ^a	28,893 ± 0,5 ^a
		dms.	60,316	1,604	6,221	2,515
	Ponta	Tradicional	576,667 ± 1,8 ^a	35,000 ± 3,0 ^a	62,530 ± 1,3 ^a	24,543 ± 3,9 ^a
		Modificado	580,000 ± 15,5 ^a	40,333 ± 0,8 ^a	63,040 ± 1,8 ^a	30,093 ± 0,9 ^a
		dms.	43,625	8,689	6,404	11,139
21 dias	Meio	Tradicional	402,333 ± 7,6 ^b	30,667 ± 0,8 ^a	45,373 ± 0,5 ^b	24,057 ± 0,2 ^a
		Modificado	322,333 ± 9,8 ^a	30,667 ± 1,4 ^a	37,293 ± 0,9 ^a	22,667 ± 1,8 ^a
		dms.	34,770	4,723	3,007	5,300
	Ponta	Tradicional	447,333 ± 6,2 ^b	33,333 ± 1,2 ^a	49,627 ± 1,0 ^b	24,890 ± 1,4 ^a
		Modificado	370,667 ± 4,3 ^a	26,333 ± 3,7 ^a	43,097 ± 0,7 ^a	18,350 ± 3,2 ^a
		dms.	21,143	10,960	3,663	9,805
28 dias	Meio	Tradicional	321,333 ± 0,3 ^a	10,667 ± 0,3 ^a	37,717 ± 0,1 ^a	5,153 ± 0,4 ^a
		Modificado	335,000 ± 8,0 ^a	15,000 ± 0,5 ^b	39,553 ± 0,8 ^a	9,373 ± 0,2 ^b
		dms.	22,308	1,852	2,298	1,439
	Ponta	Tradicional	345,333 ± 5,6 ^a	12,333 ± 0,3 ^a	40,933 ± 0,5 ^a	7,480 ± 0,4 ^a
		Modificado	398,000 ± 5,6 ^b	19,333 ± 0,8 ^b	46,300 ± 1,0 ^b	11,443 ± 0,8 ^b
		dms.	22,192	2,620	3,409	2,706
40 dias	Meio	Tradicional	356,333 ± 2,6 ^a	32,333 ± 0,3 ^a	40,737 ± 0,3 ^a	26,960 ± 0,5 ^a
		Modificado	356,000 ± 22,0 ^a	39,000 ± 1,0 ^b	40,253 ± 2,5 ^a	29,417 ± 0,9 ^a
		dms.	61,730	2,929	7,040	3,043
	Ponta	Tradicional	410,333 ± 3,7 ^b	34,333 ± 1,6 ^a	46,030 ± 0,4 ^b	27,120 ± 2,2 ^a
		Modificado	376,333 ± 2,9 ^a	36,333 ± 0,6 ^a	43,010 ± 0,2 ^a	22,657 ± 3,7 ^a
		dms.	13,100	4,988	1,431	12,194

dms: Diferença mínima significativa do teste de Tukey ao nível de erro de 5%.

Em uma mesma coluna médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de erro de 5%

Os queijos modificados apresentaram valores significativamente mais baixos ($p < 0,05$) que os tradicionais nas seguintes épocas da maturação: 1 dia (meio), 21 dias (meio e ponta) e 40 dias (ponta). Esses resultados indicam que neste processo a enzima atuou em todas as fases da cura dos queijos.

A variação da textura neste processo foi como no processo A, ocorrendo um decréscimo da firmeza dos queijos até o 21º dia e depois um ligeiro aumento. Este comportamento foi o mesmo nas fatias de ponta e meio dos queijos. Como já discutido no processo A, este decréscimo se ocorreu devido ao enfraquecimento da rede protéica em função da quebra da α_{s1} -caseína na primeira fase da maturação. O aumento que segue corresponderia à segunda fase e, a ligeira perda de água dos queijos poderia também influenciar.

A Figura 19 mostra que a tendência apresentada pelas curvas dos parâmetros força máxima, área positiva, força máxima negativa e área negativa foi a mesma para os dois métodos de fabricação avaliados. Através destas curvas pôde-se observar também a influência da região analisada na textura dos queijos. O índice de firmeza nas fatias retiradas da região mediana foi menor do que aquele obtido nas fatias da ponta.

A Tabela 23 mostra os resultados obtidos no processo C. Os parâmetros avaliados neste processo foram os mesmos avaliados do B. Para alguns parâmetros deste processo os queijos não apresentaram resultados e outros foram perdidos durante a realização das análises.

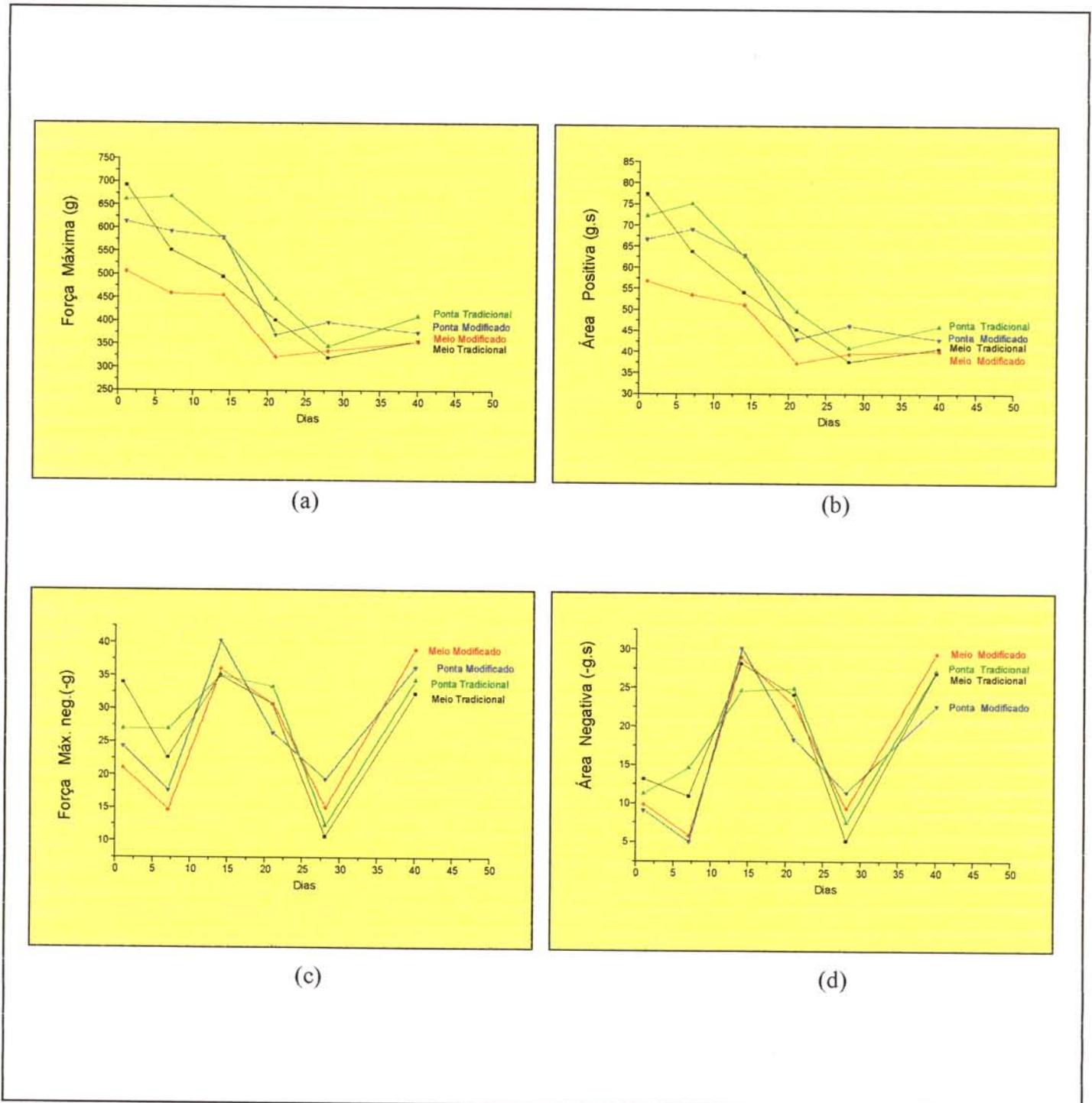


FIGURA 19: Curvas representando os parâmetros de textura avaliados durante a maturação dos queijos tipo Prato tradicionais e modificados, sendo a) força máxima, b) área positiva, c) força máxima negativa e d) área negativa.

TABELA 23: Resultados médio da textura do queijo tipo Prato (processo C).

			Força Máxima	Força Mínima	Área Positiva	Área Negativa
1 dia	Meio	Tradicional	398,333 ± 19,4 ^a	-	46,987 ± 2,7 ^a	-
		Modificado	437,333 ± 40,7 ^a	-	52,363 ± 5,5 ^a	-
		dms.	125,377	-	17,302	-
	Ponta	Tradicional	507,667 ± 12,1 ^a	-	-	54,697 ± 1,7 ^a
		Modificado	659,000 ± 56,3 ^a	-	-	68,657 ± 5,0 ^a
		dms.	160,115	-	-	-
7 dias	Meio	Tradicional	707,000 ± 28,6 ^a	-	78,607 ± 3,9 ^a	-
		Modificado	622,000 ± 20,0 ^a	-	68,270 ± 2,6 ^a	-
		dms.	97,169	-	13,169	-
14 dias	Meio	Tradicional	775,000 ± 55,0 ^a	39,000 ± 1,1 ^b	85,463 ± 4,8 ^a	1,927 ± 0,1 ^a
		Modificado	637,667 ± 107,3 ^a	18,667 ± 3,3 ^a	69,847 ± 11,5 ^a	6,130 ± 1,7 ^a
		dms.	335,270	9,933	34,682	4,789
	Ponta	Tradicional	1040,333 ± 29,5 ^b	21,000 ± 5,1 ^a	102,290 ± 4,9 ^b	4,027 ± 1,5 ^a
		Modificado	638,000 ± 16,2 ^a	11,333 ± 2,7 ^a	64,523 ± 2,3 ^a	4,060 ± 1,16 ^a
		dms.	93,736	16,309	15,225	5,330
21 dias	Meio	Tradicional	860,000 ± 89,5 ^a	21,333 ± 6,3 ^a	95,117 ± 10,1 ^a	6,147 ± 2,0 ^a
		Modificado	622,000 ± 89,0 ^a	25,000 ± 2,0 ^a	71,163 ± 10,0 ^a	9,180 ± 0,8 ^a
		dms.	350,791	18,595	39,674	6,207
	Ponta	Tradicional	1010,667 ± 62,6 ^b	27,667 ± 11,2 ^a	111,263 ± 6,7 ^b	8,487 ± 5,4 ^a
		Modificado	803,333 ± 32,4 ^a	27,000 ± 6,8 ^a	87,677 ± 4,8 ^a	11,493 ± 4,2 ^a
		dms.	196,111	36,633	23,006	19,253
28 dias	Meio	Tradicional	569,000 ± 15,5 ^b	22,000 ± 6,0 ^a	61,640 ± 2,3 ^a	8,323 ± 2,1 ^a
		Modificado	471,667 ± 30,7 ^a	24,333 ± 1,2 ^a	52,000 ± 3,6 ^a	13,330 ± 0,3 ^a
		dms.	95,692	17,080	12,077	5,926
	Ponta	Tradicional	736,333 ± 22,9 ^b	26,000 ± 7,0 ^a	82,287 ± 2,5 ^b	11,883 ± 3,6 ^a
		Modificado	519,000 ± 43,0 ^a	21,000 ± 4,9 ^a	57,880 ± 4,9 ^a	10,823 ± 3,7 ^a
		dms.	135,507	23,797	15,345	14,437
40 dias	Meio	Tradicional	866,000 ± 32,9 ^a	44,000 ± 5,5 ^a	-	-
		Modificado	883,000 ± 17,2 ^a	60,000 ± 3,7 ^a	-	-
		dms.	103,357	18,572	-	-
	Ponta	Tradicional	1076,333 ± 8,6 ^a	31,000 ± 3,2 ^a	-	-
		Modificado	1006,667 ± 33,6 ^a	50,000 ± 4,0 ^b	-	-
		dms.	96,487	14,260	-	-

dms: Diferença mínima significativa do teste de Tukey ao nível de erro de 5%.

Em uma mesma coluna médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de erro de 5%.

No processo C, a firmeza dos queijos tradicional e modificado aumentou na primeira fase de maturação (até o 21º dia) e depois decresceu no 28º dia, aumentando novamente aos 40 dias de maturação. Isso pode estar relacionado à presença da α_{s1} -caseína intacta na primeira fase e à presença de novos grupos iônicos formados durante a maturação, implicando numa certa rigidez, como observado por LAWRENCE et al. (1987). A evaporação da água na superfície do queijo e o gradiente de sal e umidade também pode levar a um aumento da firmeza. Os queijos fabricados pelo processo C, foram os que apresentaram menor umidade durante todo o período de maturação, o que pode ter levado a esta diferença de comportamento com relação à firmeza.

Os queijos modificados apresentaram valores de firmeza mais baixos que os tradicionais durante todo o período de maturação para tanto para as amostras da ponta quanto do meio. O comportamento das amostras da ponta e do meio foi o mesmo observado no processo B, com valores do meio sempre menores.

Para uma melhor avaliação da influência do teor de enzima utilizado nos diversos parâmetros químicos e instrumentais avaliados, seria viável a realização dos processos A, B e C no mesmo dia, usando um mesmo tanque de fabricação até o momento da pré-prensagem e dividindo posteriormente a massa. Para as repetições subsequentes o teor de caseína:gordura deveria ser o mesmo. Deste modo estaríamos padronizando tanto a matéria-prima como as condições de processo.

5.6- Análise Sensorial

Utilizando-se os atributos cor amarela, presença de olhaduras, aroma de leite, aroma de iogurte, aroma de queijo, sabor de queijo Prato maturado, salgado, ácido, doce, elasticidade, flexibilidade, firmeza e resistência à mastigação, conduziu-se a análise sensorial dos queijos com 7, 14, 21, 28 e 42 dias de maturação. Avaliou-se

somente o processo C devido ao fato de que quando foram realizados os processos A e B, a equipe não tinha sido formada e treinada.

Para os queijos tradicionais com 7, 14, 21, 28 e 42 dias de maturação observou-se uma coloração amarela mais forte, que diferiu significativamente ($p < 0,05$), daqueles fabricados pelo método modificado, que por sua vez estavam mais amarelos com 1 dia de maturação. Os valores obtidos variaram de 4,45 a 4,53 nos queijos tradicionais e de 2,31 a 2,85 nos modificados com 7 e 42 dias respectivamente. A distribuição da cor nos dois métodos foi homogênea e sem manchas.

Os queijos modificados apresentaram um número maior de olhaduras características com 14 e 42 dias de maturação, os valores apresentados foram 2,52 e 3,36 para os modificados e 1,66 e 1,57 para os tradicionais.

A Figura 20 mostra os resultados obtidos quanto à avaliação sensorial da firmeza nos queijos. Pode-se notar que com 7, 14 e 42 dias de maturação os queijos provenientes do método onde adicionou-se a enzima estavam mais macios do que os queijos tradicionais. A variação deste atributo foi de 4,73 a 3,39 no método modificado e de 5,36 a 3,90 no tradicional. Nos dois tratamentos observou-se uma diminuição da firmeza com o decorrer da maturação, exceto aos 42 dias do queijo tradicional. Observou-se pela análise de variância, que não houve diferença significativa entre os métodos tradicional e modificado ao longo da maturação ($p > 0,05$). Para os atributos flexibilidade e elasticidade, os queijos produzidos pelos dois métodos não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) durante todo o período de maturação; somente o queijo modificado com 14 dias apresentou valores mais baixos para flexibilidade. Os queijos com adição de enzimas apresentaram, portanto, elasticidade e flexibilidade iguais aos queijos tradicionais.

Os queijos modificados com 7 dias de maturação apresentaram uma resistência à mastigação mais baixa (3,72) do que os tradicionais (5,28), com diferença significativa ($p < 0,05$) entre eles.

Para os atributos aroma e sabor, não se verificou diferença significativa entre os queijos ($p < 0,05$), indicando que todos maturaram de maneira adequada. Deve-se destacar que o sabor amargo que é um dos problemas encontrados quando se adiciona enzimas proteolíticas em queijos não foi detectado pela equipe de provadores. Para este atributo não foi verificada diferença significativa entre os queijos ($p < 0,05$).

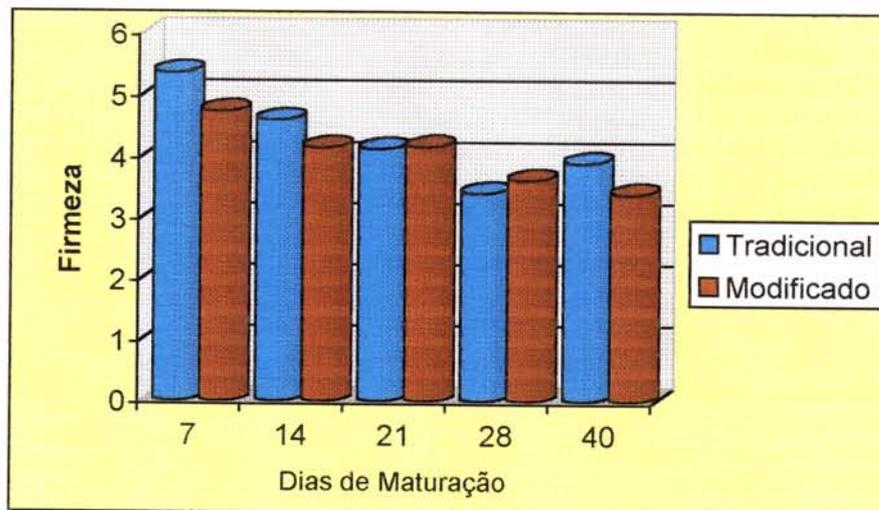


FIGURA 20: Resultados da avaliação sensorial para firmeza na textura dos queijos.

5.7- Rendimento dos queijos

A Tabela 24 apresenta os valores calculados para o rendimento dos queijos. A adição da enzima Neutrase® à massa dos queijos fabricados pelo método modificado não ocasionou perdas no rendimento. Nos processos B e C, o rendimento ajustado (RAJ) para os queijos modificados foi maior do que aquele encontrado para os queijos controle.

Tabela 24: Rendimento médio dos queijos tipo Prato fabricados nos processos A, B e C.

	Processo A		Processo B		Processo C	
	Trad.	Mod.	Trad.	Mod.	Trad.	Mod.
Rendimento	10,57	10,57	9,92	10,25	9,73	9,91
Rend. Ajustado (RAJ)	11,15	10,48	10,18	10,75	10,15	10,42

6-CONCLUSÕES

- O uso da enzima Neutrase® na sua forma líquida, acelerou o processo de maturação do queijo tipo prato.
- Neste trabalho os melhores resultados foram obtidos com 15 mg enzima kg/de leite, diluída 1:10 em soro, adicionada à coalhada mais soro após a segunda dessoragem e antes da pré-prensagem, e deixado em repouso por 20 min. a 42°C. nestas condições a enzima apresentou uma boa atividade, uma distribuição uniforme na massa, sem o aparecimento de manchas no queijo.
- Os queijos fabricados pelo método modificado apresentaram já no primeiro dia e durante todo o período de maturação, um índice de extensão (% NS-pH 4,6/NT) significativamente maior do que aqueles fabricados pelo método tradicional, nos processos A, B e C.
- Os queijos modificados do processo A (25mg enzima/kg leite) apresentaram um índice de extensão de 7 dias (17,32) mais elevado do que o correspondente com 30 dias conforme descrito na literatura (14,0 – 14,5), ao passo que no processo B (15mg enzima/kg leite) o valor obtido para os queijos com um dia (16,02) já era maior. No processo C (10mg enzima/kg leite) um valor próximo (15,61) foi alcançado com 14 dias de maturação.
- Os queijos modificados apresentaram durante todo o período de maturação valores de I.P.M. (NNP/NT) mais elevados do que aqueles fabricados pelo tradicional, nos processos A, B e C.

- A variação do NNP entre os processos foi mais homogênea, indicando que o efeito da enzima Neutrase® parece ser maior durante a maturação primária, confirmando os dados de literatura.
- A enzima Neutrase® parece possuir sua maior atividade nos 20 minutos em que a massa é deixada em repouso a 42° C.
- É importante padronizar a quantidade de soro que deve ser deixada na massa antes da adição da enzima para possibilitar um melhor controle da quantidade de enzima retida na massa.
- A adição de enzima Neutrase® à massa dos queijos modificados não levou a perdas no rendimento. Nos processos B e C o rendimento ajustado para o método modificado (10,75 e 10,42, respectivamente) foi maior do que para o tradicional (10,18 e 10,15 respectivamente).
- Os métodos espectrofotométricos usados (determinação dos aminoácidos tirosina e triptofano e reação colorimétrica com TNBS e ninidrina-cádmio) mostraram-se adequados para o monitoramento da proteólise em queijos.
- Nos processos A e B há um decréscimo do índice de firmeza até o 21° dia de maturação, correspondendo à primeira fase da maturação onde a quebra da α_1 -caseína promove um amolecimento da massa o aumento subsequente ocorre provavelmente devido à evaporação de água na superfície
- No processos A os queijos modificados apresentaram valores de firmeza significativamente menores que os tradicionais desde o primeiro até o 21° dia de

maturação. No B, estes valores foram menores com 1 dia (meio), 21 dias (meio e ponta) e 40 dias (ponta).

- A região analisada (ponta e meio) influenciou a textura dos queijos. O índice de firmeza nas fatias retiradas da região mediana foi menor do que aquele obtido nas fatias da ponta do queijo.
- No processo C o aumento nos valores de firmeza se deve provavelmente devido à presença de α_{s1} -caseína intacta e de novos grupos iônicos formados durante a maturação, a evaporação de água na superfície do queijo e o gradiente sal e umidade.
- O perfil eletroforético dos queijos mostrou que a adição de enzimas levou a diferenças quantitativas nas frações protéicas dos queijos modificados quando comparados aos tradicionais. Houve uma maior degradação das frações α_{s1} e β -caseínas, com acúmulo maior de alguns produtos de degradação destas duas frações nos queijos modificados. A degradação da fração β -caseína foi maior do que a da α_{s1} -caseína em todos os queijos modificados.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACTON, G.H. The determination of lactose in cheese. Australian Journal of Dairy Technology, Victoria, v. 32, n. 3, p. 111-114, 1977.
2. ADLER-NISSEN, J. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 27, n. 6, p.1256-1265, 1979.
3. ANDREWS, A.T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. Journal of Dairy Research, London, v.50, n. 1, p. 45-55, 1983.
4. ASCHAFFENBURG, R., DREWRY, J. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 15, London, 1959. Proceedings, London, International Dairy Federation, 1959, n.3, p. 1631-1637.
5. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. Produção Brasil-Queijos comuns em estabelecimentos sob inspeção federal em toneladas. São Paulo, 1998.
6. BERGMEYER, H.V. Methods of enzymatic analyses. New York, Academic Press., 2^a ed., p. 807-814 e 1017-1020, 1965.
7. BLAKESLEY, R. W.; BOEZI, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. Analytical Biochemistry, New York, v. 82, n. 4, p. 580-582, 1977.

..

8. BONASSI, I. A. Ácidos graxos livres voláteis em alguns queijos fabricados no Brasil. I. Avaliação quantitativa. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 33, n. 197, p. 29-34, 1978.
9. BONASSI, I. A.; GOLDONI, J. S.; GOMES, M. C. G. Influência das bactérias lácticas mesófilas: *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylactis* e *Streptococcus citrovorum* nas características do queijo tipo Minas. Acidez titulável e pH. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 36, n. 214, p. 7-14, 1981.
10. CAMPOS, S.D.S. Metodologia objetiva para avaliação de parâmetros de textura. In: CAMPOS, S.D.S. Reologia e textura de alimentos. Campinas: ITAL, 1989. p. 43-59(Manual técnico).
11. CARVALHO, F.A; SILVA, P.H F. Alternativas para a aceleração da maturação de queijo. Leite e Derivados, São Paulo, v. 11, p. 36-38, 1993.
12. CLEGG, K.M.; LEE, Y.K. & MCGILLIGAN, J.F. Technical note trinitrobenzenesulphonic acid and ninhydrin reagents for the assessment of protein degradation in cheese samples. Journal of Food Technology, Oxford, v. 17, n. 4, p. 517-520, 1982.
13. CHRISTENSEN, T. M. I. E.; BECH, A. M. & WERNER, H. Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bruxelas, 1991.n. 261, p. 4 –9.
14. CREAMER, L.K. β -casein degradation in Gouda and Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 58, n. 3, p.287-292, 1975.

15. CREAMER, L.K., MILLS, O.E. The action of rennets on the caseins . I. Rennin action on β -casein-B in solution. Journal of Dairy Research, London, v. 38, n. 3, p. 269-280, 1971.
16. CREAMER, L.K., OLSON, N.F. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. Journal of Food Science, Chicago, v. 47, n.2, p. 631-636, 646, 1982.
17. CREAMER, L. K., RICHARDSON, B.C. Identification of primary degradation product of α_{s1} -casein in Cheddar cheese. New Zealand journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 9, n.1, p.9-13, 1974.
18. DELACROIX-BUCHET, A.; TROSSAT, P. Protéolyse at texture des fromages à pâte cuite pressée. I. Influence de L'activité de L'eau. Lait, Paris, v. 71, n. 3, p. 299-311, 1991.
19. DESMAZEAUD, M.J.; GRIPON, J.C.; LE BARS, D.; BERGERE, J.L. Étude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes. Le Lait, Paris, v. 56, n. 557, p. 379-396, 1976.
20. DOI, E; SHIBATA, D.; MATOBA, T. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. Analytical Biochemistry, New York, v. 118, n. 1, p. 173-184, 1981.
21. EL ABOUDI, M; PANDIAN, S.; TRÉPANIER, G.; SIMARD, R.E.; LEE, B.H. Heat-shocked *Lactobacilli* for acceleration of Cheddar cheese ripening. Journal of Food Science, Chicago, v. 55, n. 4, p. 948-949, 953, 1991.
22. EL SODA, M. Accelerated maturation of cheese International of Dairy Journal, London, v.3, p. 531-544, 1993.

23. EL SODA, M; PANDIAN, S. Recent developments in accelerated cheese ripening. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 74, n. 7, p. 2317-2335, 1991.
24. EZZAT, N. Accelerated ripening of Ras cheese with a comercial proteinase and intracelular enzymes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Propionibacterium freudenreichii* and and *Brevibacterium linens* Lait, Paris, v. 70, p.459-466, 1990.
25. FARKYE, N.Y. FOX, P.F; FITZGERALD, G.F; DALY, C. Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase-positive or proteinase-negative starters. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 73, n. 4, p. 874 -880, 1990.
26. FEDRICK, I.A.; CROMIE, S.J.; DULLEY, J.R. The effects of increased starter populations, added neutral proteinase and elevated temperature storage on Cheddar cheese manufacture and maturation. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 21, p. 191-203, 1986.
27. FERNANDEZ-GARCIA, E.; LOPEZ-FANDIÑO, R.; ALONSO, L.; RAMOS, M. The use of lipolytic and proteolytic enzymes in the manufacture of Manchego type cheese from ovine and bovine milk. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 77, n. 8, p. 2139-2149, 1994.
28. FOLKERTSMA, B.; FOX, P.F. Use of Cd-ninhidrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 59, n. 3, p. 217-224, 1992.
29. FONSECA, C. H. Processos de salga e sua interação nos queijos. Juiz de Fora, Instituto de Laticínios Cândido Tostes, EPAMIG, 1986. 22p. (Apostila).

30. FOX, P. F.; O'CONNOR, T. P.; McSWEENEY, L. H. Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects. Advances in Food and Nutrition Research, New York, v.39, p 163-328, 1996.
31. FOX, P.F.; STEPANIAK, L. Enzymes in cheese technology. International of Dairy Journal, London, v.3, p. 509-530, 1993.
32. FURTADO, M.M. Quality assurance of eye formation in Brazilian Prato cheese. Bulletin FIL/IDF, Belgium, n.177, p. 128-131, 1984.
33. FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.
34. FURTADO, M.M.; SOUZA, H.M. Estudo rápido sobre a evolução da salga do queijo Prato em salmoura. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 36, n. 213, p. 5-10, 1981.
35. FURTADO, M.M.; SOUZA, H.M. de; MUNCK, A.V. Controle de salga e umidade do queijo Prato pelo banho de água gelada. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 34, n. 204, p. 9-14, 1979.
36. FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Fabricação de queijo Prato e Minas: estudo do rendimento. Parte I: Determinação das cifras de transição. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v.34, n. 205, p. 3-19, 1979.
37. FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Perda de umidade da coalhada durante a fabricação do queijo Prato. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 38, n. 229, p. 3-6, 1983.

38. GORRETA, J. G. Coalho e coagulantes. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 35, n. 210, p. 17-21, 1980.
39. GRAPPIN, R., RANK, T.C., OLSON, N.F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. Journal of dairy Science, Champaign, v. 68, n. 3, p. 531-540, 1985.
40. GRIPON, J. C.; DESMAZEAUD, M. J.; LE BARS, D.; BERGERE, J. L. Étude du rôle dos micro-organismes et des enzymes du cours de la maturation des fromages. II Influence de la Pressure Commerciale. Le Lait, Paris, v. 55, n. 548, p. 502-516, 1975.
41. GUINEE, T. P. & FOX, P. F. Transport of sodium choride and water in Romano cheese slices during brining. Food Chemistry, Washington, v. 19, p. 49-64, 1986.
42. GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G.; MULHOLLAND, E. O. & FOX, P. F. Influence of ripening temperature, added comercial enzyme preparations and attenuated mutant (*Lac⁻*) *Lactococcus lactis* starter on the proteolysis and maturation of Cheddar cheese. Irish Journal of Food Science and Technology, Dublin, v. 15, p. 27-52, 1991.
43. HORWITZ, W. (Ed.) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. , 12 ed. Washington, 1975. p. 284 (Proc. 16223).
44. HOSKEN. F.S; GAUDERETO, L.Q. Influência da cultura láctica na qualidade do queijo Prato variedade lanche. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 28, n. 167, p. 1-8, 1973.

45. IADEROZA, M.; BALDINI, V.L.S. A importância da análise enzimica em alimentos. In: IADEROZA, M.; BALDINI, V.L.S. Ênzimos e a qualidade de vegetais processados. Campinas: ITAL, 1991, p. 37-51. (Manual técnico).
46. ILCT - Instituto de Laticínios "Cândido Tostes". Apostila de tecnologia de fabricação de queijos. Juiz de Fora, 1977, 214p.
47. ILCT - Instituto de Laticínios "Cândido Tostes". Princípios básicos da fabricação de queijo Prato e similares dinamarqueses. Juiz de Fora, 1983, 129p.
48. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3ed., São Paulo, 1985. 371p. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, p.199-244.
49. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the protein content of processed cheese products. Belgium: FIL/IDF, 1964. 3p. (FIL-IDF, 25).
50. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the total nitrogen content of milk by Kjeldahl method. Belgium: FIL/IDF, 1962. 3p. (FIL-IDF, 20).
51. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the total solids content of cheese and processed cheese. Belgium: FIL/IDF, 1982. 2p. (FIL/IDF, 4A).
52. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bulletin. International Dairy Federation, Brussels, n. 261, 1991, 36 p.
53. KIRBY, C.J. Maduración acelerada de quesos. Revista Espanola de Lecheria, v. 11, p.42-49, 1989.

54. KOSIKOWSKI, F.V. Cheese and fermented milk foods. Michigan: Edwards Brothers, 1978, 429p.
55. KRISTOFFERSEN, T.; MIKOLAJCIK, E.M; GOULD, I.A. Cheddar cheese flavour. IV. Directed and accelerated ripening process. Journal Dairy Science, Champaign, v. 50, p. 292-297, 1967.
56. KUCHROO, C. N; RAHILLY, J.; FOX, P. F. Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzene sulphonic acid. Irish Journal of Food Science Technology, Dublin, v. 7, n. 2, p. 129-133, 1983.
57. LAW, B.A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. *In*: FOX, P.F. (Ed.) **Cheese:chemistry, physics and microbiology**. General aspects. London: Elsevier Applied Science, 1987, v. 1, chap.10, p. 365-400.
58. LAW, B.A. The accelerated ripening of cheese. *In*: DAVIES, F.L.; LAW, B.A.(Ed.) Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. London: Elsevier Applied Science, 1984, chap 8, p. 209-228.
59. LAW, B.A. General introduction. *In*: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Brussels, 1991, n. 261.
60. LAW, B.A.; KING, J. The use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese. Journal of Dairy Research, London, v. 52, p.183, 1985.
61. LAW, B.A.; WIGMORE, A.S. Microbial proteinases as agents for accelerated cheese ripening. Journal Society Dairy Technology, Wembley, v, 35, n. 2, p. 75-76, 1982.

62. LAWRENCE, R.C.; GILLES, J.; CREAMER, L. K. The relation between cheese texture and flavour. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 18, p.175-190, 1983.
63. LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.K.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. A review. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 68, n. 4, p. 801-805, 1987.
64. MARTINS, J.F.P.; MORI, E.E.M.; FIGUEIREDO, I.B.; FERNANDES, A.G. Maturação do queijo Prato: Influência da adição de pediococos na aceleração do processo. Coletânea do ITAL, Campinas, v. 10, p. 145-151, 1979.
65. MERCOSUL. Regulamento técnico mercosul de identidade e qualidade do queijo Prato. In Regulamentos técnicos de identidade de produtos lácteos. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária-MAARA- Secretaria da Agropecuária-DAS. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal-DIPOA, portaria 358 de 04 de setembro de 1997, Brasília.
66. MINUSSI, R.C.; FURTADO, M.M.; MOSQUIM, M.C.A.V. Avaliação de métodos para a aceleração da maturação do queijo Prato. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 50, n. 291, p. 31-42, 1995.
67. NOVO NORDISK. Enzyme Process Division – Ficha técnica, Bagsvaerd, Denmark.
68. NUÑEZ, M. G.; GARUA-ASER, M.A; RODRIGUEZ-MARÍN, M. A.; MEDINA, M; GAYA, P. The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipolysis in Manchego cheese. Food Chemistry, London, v.21, p.191, 1986.

69. NUÑEZ, M. G.; GUILLÉN, A. M.; RODRIGUEZ-MARÍN, M. A.; MARCILLA, A. M.; GAYA, P.; MEDINA, M. Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: the effect of neutral proteinases. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 74, p. 4108, 1991.
70. OLIVEIRA, J.S. de. **Queijos**: fundamentos tecnológicos. Campinas: UNICAMP, 1986. 146p.
71. RENNER, E. Nutritional aspects of cheese *In*: FOX, P. F. **Cheese**: chemistry, physical and microbiology. New York: Elsevier Applied Science, 1987, v.1., chap. 7, p. 345-363.
72. ROGICK, F. A. Estudo sobre a tecnologia do queijo Prato. Boletim Indústria Animal, Nova Odessa, v. 12, p.131-148, 1951.
73. SCHFITAN, T..Z.; KOMATSU, I. Estudos sobre a composição de queijo Prato consumido na cidade de São Paulo. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 35, n. 207, p. 33-38, 1980.
74. SCOTT, R. Cheesemaking practice, 2ed., New York: Elsevier Applied Science, 1986. 529p.
75. SERRES, L.; AMARIGLIO, S.; PETRANSXIENE, D. Contrôle de la qualité des produits laitiers. Ministère de l'Agriculture. Direction des Services Vétérinaires. Tome I. Analyse Physique et Chimique (Chimie VII-6), 1973.
76. SINGH, S; KRISTOFFERSEN, T. Factors affecting flavour development in Cheedar cheese slurries. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 53, p.533-536, 1970.

77. SOOD, V. K; KOSIKOWSKI, F. V. Ripening changes and flavor development in microbial enzyme treated Cheddar cheese slurries. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 44, p.1690-1694, 1979.
78. SOUZA, E.A. Tecnologia da fabricação de queijos. Juiz de Fora, Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 116p, 1960.
79. STADHOUDERS, J; TOEPOEL, L; WOUTERS, J. T. M. Cheese making with Prt variants of *N-Streptococci* and their mixtures. Phage sensitivity, proteolysis and flavour development during ripening. Netherlands Milk Dairy Journal, Wageningen, v. 42, p.183, 1988.
80. STONE, H.; SIDEL, J.; OLIVER, S.; WOOLSEY, A.; SINGLETON, R. G. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. Food Technology, Chicago, v. 28, n.11, p. 24-34, 1974.
81. TRÉPANIER, G.; EL ABBOUDI, M.; LEE, B.H.; SIMARD, R. E. Accelerated maturation of Cheddar cheese: influence of added *Lactobacilli* and commercial protease on composition and texture. Journal of Food Science, Chicago, v. 57, n. 4, p. 898, 1992.
82. TYE, T. M. ; HAARD, N. F.; PATEL, T. R. Effects of bacterial protease on the quality of Cheddar cheese. Canadian Institute of Science and Technology Journal, Ottawa, v. 21, n. 4, p. 373-377, 1988.
83. VAFOPOULOU, A.; ALICHANIDIS, E. ; ZERFIRIDIS, G. Accelerated ripening of Feta cheese, with heat-shocked cultures or microbial proteinases. Journal of Dairy Research, London, v. 56, p. 285-296, 1989.

84. VAKALERIS, D.G.; PRICE, W.V. Rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 42, n.2, p. 264-276, 1959.
85. VAN DENDER, A.G. F.; VALLE, J.L.E.; ARDITO, E.F.G.; FIGUEIREDO, I.B. Estudo de métodos de aceleração no processo de fabricação do queijo tipo Prato. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 41, n.247, p. 3-13, 1986.
86. VAN DENDER, A.G. F.; SEVILHANO, L. A.; YOTSUYANAGI, K. ; JARDIM, D. C. P. Determinação da atividade de água de queijos usando crioscopia eletrônica. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 50, n. 3, p. 18-26, 1995.
87. VAN DEN BERG, G; EXTERKATE, F.A. Technological parameters involved in cheese ripening. International of Dairy Journal, London, v. 3, p. 485-507, 1993.
88. VAN VLIET, T. Inventory of Test Methods. Bulletin International Dairy Federation, Brussels, n. 268, p. 16-30, 1991.
89. VIOTTO, W.H.; YUN, J.J.; BARBANO, D.M.; KINDSTEDT, P.S. Efeito da velocidade de filagem e tempo de residência na filadora sobre o rendimento, composição, proteólise e propriedades funcionais do queijo mussarela. Anais do XIV Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora, p. 42-51, 1996.
90. 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 electrophoretical study. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 31, n. 3, p. 247-264, 1977.

91. VISSER, J. Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. Bulletin International Dairy Federation, Brussels, n. 268, p. 49-61, 1991.
92. WANDECK, F.A. Aspectos bioquímicos da maturação dos queijos. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 27, n. 164, p. 1-9, 1972.
93. WILKINSON, M. G.; GUINNE, T.P. O'CALLAGHAN, D. M.; FOX, P. F. Effects of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. Lait, Paris, v. 72, n. 5, p. 458-459, 1992.
94. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. Boletim do Leite, Rio de Janeiro, v. 51, n. 661, p. 1-8, 1983.
95. WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; LIMA, A. Extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas frescal. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v. 44, n. 261, p. 50-54, 1989.
96. YAMAUCHI, K. Biologically functional proteins of milk and peptides derive from milk proteins. Bulletin FIL-IDF, Brussels, n. 272, p.52, 1992.
97. ZOON, P. The relationship between instrumental and sensory evaluation of the rheological and fracture properties of cheese. Bulletin International Dairy Federation, Brussels, n. 268, p. 30-35, 1991.