

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

INFLUÊNCIA DO TIPO DE COAGULANTE E DO AQUECIMENTO NO  
COZIMENTO DA MASSA NA COMPOSIÇÃO, RENDIMENTO,  
PROTEÓLISE E CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DO QUEIJO  
PRATO

Marta Maria Marquezan Augusto  
Químico

Dra. Walkíria Hanada Viotto  
Orientadora

Dra. Maria Isabel Queiroz  
Co-orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia  
de Alimentos

CAMPINAS – SP  
2003

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

Au45i Augusto, Marta Maria Marquezan  
Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo prato / Marta Maria Marquezan Augusto. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Walkíria Hanada Viotto  
Co-orientador: Maria Isabel Queiroz  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Queijo. 2.Rendimento. 3.Coagulantes. 4.Avaliação sensorial. I. Viotto, Walkíria Hanada. II. Queiroz, Maria Isabel. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto  
Orientadora

---

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig

---

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

---

Profa. Dra. Vera Lúcia Signoreli Baldini

---

Prof. Dr. Ismael Antonio Bonassi

---

Profa. Dra. Maria Aparecida A. P. Silva

Campinas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2003



Aos meus filhos Tássia e Walter e ao meu  
esposo Walter pela compreensão, carinho  
e incentivo durante a realização deste trabalho.

À minha mãe e irmãos

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Walkíria, pela sua orientação, amizade e dedicação em todas as fases deste trabalho.

À Profa. Maria Isabel pela sua co-orientação, amizade e auxílio na parte sensorial.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições e sugestões apresentadas para a redação final da tese.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade .

Ao Departamento de Química da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, pela liberação, e a CAPES pela bolsa concedida.

À Cosulati e o seu responsável técnico Sr. Antonio Salazar, pelas facilidades concedidas na realização deste trabalho.

Ao Dr. João Vendrúsculo do laboratório de Tecnologia de Alimentos da Embrapa, Pelotas, pela concessão do uso do Instron para as análises de textura, e a técnica Núbia Ferri por seu auxílio durante a execução das análises.

Ao Professor Tabajara L. de Almeida pelo auxílio na análise estatística deste trabalho.

As alunas Dirlei Kieling e Raquel Franchesquini, pela ajuda nas análises químicas.

À Bete, pela amizade e auxílio na execução da eletroforese.

Ao pessoal do laboratório de Bioquímica da FURG, Maria de Graça e Mariluci pela colaboração.

À família Moura, Henrique, Pilar e Wanda pelo apoio e amizade.

## SUMÁRIO

	Pg
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xv
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xix
<b>RESUMO GERAL</b>	xxiii
<b>GENERAL ABSTRACT</b>	xxv
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>CAPÍTULO 1.QUEIJO PRATO: TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO, PROTEÓLISE E CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS- UMA REVISÃO</b>	3
<b>INTRODUÇÃO</b>	5
<b>TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO</b>	7
Coagulação do leite	8

Coalho e coagulantes	8
Coagulante microbiano	10
Quimosina obtida por fermentação	11
Tratamento da massa	13
RENDIMENTO DE FABRICAÇÃO	16
Fatores que afetam o rendimento na fabricação de queijos	18
MATURAÇÃO DE QUEIJOS	21
Glicólise	23
Lipólise	25
Proteólise	26
Agentes proteolíticos	28
Avaliação da proteólise	32
GOSTO AMARGO EM QUEIJO PRATO	33
TEXTURA EM QUEIJO PRATO	35
Fatores que influenciam a textura do queijo	36
Avaliação da textura em queijo	39
Medidas Sensoriais de textura	39
Parâmetros primários	40
Parâmetros secundários	41
Medidas Instrumentais da textura	42
Correlação entre os parâmetros de textura sensorial e instrumental	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

<b>CAPÍTULO 2. EFEITO DO TIPO DE COAGULANTE E DO COZIMENTO DA MASSA NO RENDIMENTO DE QUEIJO PRATO, FABRICADO EM ESCALA INDUSTRIAL</b>	<b>57</b>
RESUMO	59
ABSTRACT	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. METODOLOGIA	62
2.1. Fabricação do queijo	62
2.2 . Amostragem do queijo	63
2.3 . Composição físico-química do leite, soro e queijo.	63
2.4. Recuperação de gordura e nitrogênio	64
2.5. Rendimento	64
2.6. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1. Composição físico- química do leite, soro e queijo	65
3.1.1. Composição do leite	65
3.1.2. Composição do soro	66
3.1.3. Composição do queijo	67
3.2. Recuperação de Gordura e Proteína e Rendimento do queijo	71
3.2.1. Recuperação de gordura	71
3.2.2. Recuperação de proteína	72
3.2.3. Rendimento	73
4. CONCLUSÃO	75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

<b>CAPÍTULO 3. PROCEDIMENTO PARA SELEÇÃO E TREINAMENTO DE JULGADORES PARA AVALIAÇÃO DO GOSTO AMARGO EM QUEIJO PRATO.</b>	79
RESUMO	81
SUMMARY	82
1. INTRODUÇÃO	82
2. MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1. Matéria-prima	83
2.2. Preparação da amostra	83
2.3. Seleção de julgadores	83
2.4. Treinamento dos julgadores	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4. CONCLUSÃO	90
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
<b>CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO SENSORIAL DO GOSTO AMARGO DURANTE A MATURAÇÃO DO QUEIJO PRATO FABRICADO COM DIFERENTES COAGULANTES, COM E SEM LAVAGEM DA MASSA</b>	93
RESUMO	95
ABSTRACT	95
1. INTRODUÇÃO	96
2. MATERIAL E MÉTODOS	98
2.1. Fabricação do queijo	98
2.2. Preparação das amostras	99
2.3. Composição físico- química do queijo	99

2.4. Glicólise	100
2.5. Proteólise	100
2.6. Análise Sensorial do Gosto Amargo	100
2.7 Planejamento experimental e análise estatística dos resultados	101
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
4. CONCLUSÕES	113
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
<b>CAPÍTULO 5. INFLUÊNCIA DO TIPO DE COAGULANTE E COZIMENTO DA MASSA NAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DO QUEIJO PRATO</b>	117
RESUMO	119
ABSTRACT	120
1. INTRODUÇÃO	121
2. MATERIAL E MÉTODOS	123
2.1. Fabricação do queijo	123
2.2. Preparação das amostras	124
2.3. Composição físico-química	125
2.4. Análise sensorial	125
2.5. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados	126
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO	128
3.1. Composição do queijo Prato	128
3.2. Análise sensorial	130
3.2.1. Atributos de aparência e textura	130
3.2.2. Atributos de sabor	142
4. CONCLUSÕES	162
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
<b>CAPÍTULO 6. CONTRIBUIÇÃO DO TIPO DE COAGULANTE E DO</b>	167

## **AQUECIMENTO NO COZIMENTO DA MASSA NA TEXTURA DO QUEIJO PRATO DURANTE A MATURAÇÃO**

RESUMO	169
ABSTRACT	170
1. INTRODUÇÃO	170
2. MATERIAL E MÉTODOS	173
2.1. Fabricação do queijo	173
2.2. Preparo de amostras	174
2.3. Composição físico- química do queijo	175
2.4. Proteólise	175
2.5. Eletroforese	175
2.6. Análise instrumental de textura	176
2.7. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados	176
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	177
4. CONCLUSÕES	188
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	188

<b>LISTA DE TABELAS</b>		
<b>CAP 2</b>		pág
TABELA 1	Análise de variância da composição dos soros obtidos da fabricação dos queijos com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.	66
TABELA 2	Composição média (n=2) dos soros obtidos a partir da fabricação dos queijos com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.	67

TABELA 3	Análise de variância da composição dos queijos elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto	68
TABELA 4	Composição média (n=6) obtida para os queijos Prato elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto (após cinco dias de fabricação).	69
TABELA 5	Análise de variância para a recuperação de gordura no soro e queijo.	71
TABELA 6	Valores médios (n=2) da recuperação de gordura no soro e queijo elaborado com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.	72
TABELA 7	Análise de variância para a recuperação de proteínas no soro e queijo.	72
TABELA 8	Valores médios (n=2) da recuperação de proteínas no soro e queijo com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.	73
TABELA 9	Análise de variância para o rendimento real e ajustado (RAJ).	74
TABELA 10	Valores médios (n=2) do rendimento real (R) e rendimento ajustado (RAJ) da fabricação dos queijos com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.	74
<b>CAP 3</b>		
TABELA 1	Diferenças entre os totais de ordenação obtidos através da avaliação das amostras de queijos imersas em soluções de	88

	caféina pela equipe sensorial.	
TABELA 2	Análise de variância dos resultados obtidos a partir do uso de uma escala de 9cm para as amostras imersas em soluções de caféina.	89
TABELA 3	Intensidade média do gosto amargo para as amostras de queijos imersas em soluções contendo caféina.	89
TABELA 4	Análise de variância para os resultados obtidos para 4 amostras de queijo comercial.	90
TABELA 5	Intensidade média do gosto amargo em amostras de queijos comerciais.	90
<b>CAP 4</b>		
TABELA 1	Média (n=6) da composição dos queijos obtidos utilizando protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e coagulante quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto (após cinco dias de fabricação).	103
TABELA 2	Quadrado médio e probabilidades para a acidez titulável, pH e índices de nitrogênio solúvel (pH4,6 e 12% TCA) em queijo Prato com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e coagulante quimosina e cozimento da massa por aquecimento direto e indireto durante os 60 dias de maturação.	104
TABELA 3	Quadrado médio e probabilidade para a intensidade do gosto amargo em queijo Prato com <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina e cozimento da massa por aquecimento direto e indireto durante os 60 dias de maturação.	110
TABELA 4	Médias (n=180) da intensidade do gosto amargo obtidas para os queijos Prato feitos com <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.	111

## CAP 5

TABELA 1	Composição média (n=6) obtida para os queijos Prato elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto (após cinco dias de fabricação).	129
TABELA 2	Quadrado médio e probabilidades dos atributos de aparência e textura dos queijos Prato elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, por cozimento da massa com aquecimento direto e indireto.	132
TABELA 3	Valores médios (n=36) atribuídos pelos provadores para a aparência e textura dos queijos Prato elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto com cinco dias de fabricação.	133
TABELA 4	Valores médios (n=36) atribuídos pelos provadores para a aparência e textura dos queijos Prato elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa, por aquecimento direto e indireto com 30 dias de maturação.	136
TABELA 5	ANOVA para os atributos de sabor dos queijos elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com aquecimento direto e indireto.	144
TABELA 6	Valores médios (n=36) atribuídos pelos provadores para os atributos de odor e sabor dos queijos Prato elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto com cinco dias de maturação.	148
TABELA 7	Valores médios (n= 36) da intensidade dos atributos de odor e sabor atribuídos pelos provadores para os queijos Prato	152

elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto com 30 dias de maturação.

## **CAP 6**

TABELA 1	Composição média (n=6) obtida para os queijos elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto (após cinco dias de fabricação).	179
TABELA 2	Análise de variância das propriedades de textura TPA dos queijos Prato fabricados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e coagulante quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto durante os 60 dias de maturação.	180
TABELA 3	Médias (n=50) obtidas para as propriedades de textura dos queijos Prato elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e coagulante quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.	181

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>CAP 3</b>		Pág
FIGURA 1	Fluxograma operacional do processo para a seleção e treinamento dos julgadores.	85
FIGURA 2	Resultado do desempenho dos candidatos selecionados para compor a equipe de avaliação do gosto amargo em queijo.	86
FIGURA 3	Total de ordenação obtida para amostras de queijos imersas	87

em solução de cafeína pelos julgadores (cinco repetições).

#### **CAP 4**

- FIGURA 1 Evolução da acidez titulável (A) e do pH (B) durante a maturação. 105
- FIGURA 2 Influência do coagulante e tipo de aquecimento da massa com o tempo de maturação nos níveis de nitrogênio solúvel em pH 4,6/NT (A) e nitrogênio solúvel em 12 % TCA/NT (B). 108
- FIGURA 3 Desenvolvimento da intensidade do gosto amargo com o tempo de maturação dos queijos Prato. 112

#### **CAP 5**

- FIGURA 1 Termos descritivos utilizados no treinamento da equipe da avaliação sensorial. 126
- FIGURA 2 Ficha utilizada na avaliação sensorial das amostras de queijos Prato. 127
- FIGURA 3 Características de aparência e textura dos queijos Prato elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com aquecimento direto e indireto aos cinco dias de fabricação. 131
- FIGURA 4 Características de aparência e textura dos queijos Prato elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto aos 30 dias de maturação. 135
- FIGURA 5 Evolução das intensidades de cor (a) e mesclado (b) dos queijos Prato fabricados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação (MD = microbiano direto; MI = microbiano indireto; BD = bovino direto; BI = bovino indireto; QD = quimosina direto; QI = quimosina indireto). 138
- FIGURA 6 Evolução da dureza (a) e elasticidade (b) para os queijos fabricados com protease do *R.miehei*, coalho bovino e 140

	quimosina, por aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. ( MD = microbiano direto; MI = microbiano indireto; BD = bovino direto; BI = bovino indireto; QD = quimosina direto; QI = quimosina indireto).	
FIGURA 7	Evolução da fraturabilidade (a) e adesividade (b) para os queijos Prato fabricados com protease do <i>R. miehei</i> , coalho bovino e quimosina e aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. (MD = microbiano direto; MI = microbiano indireto; BD = bovino direto; BI = bovino indireto; QD = quimosina direto; QI = quimosina indireto).	143
FIGURA 8	Características de odor e sabor dos queijos Prato fabricados com protease do <i>R. miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com aquecimento direto e indireto aos 5 dias de fabricação.	147
FIGURA 9	Características de odor e sabor dos queijos Prato fabricados com protease do <i>R. miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com aquecimento direto e indireto aos 30 dias de fabricação	151
FIGURA 10	Evolução do odor de leite (a), e de doce de leite (b) dos queijos Prato elaborados com protease do <i>R. miehei</i> , coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, durante o tempo de maturação. (MD = microbiano direto; MI= microbiano indireto; BD = bovino direto; BI = bovino indireto; QD = quimosina direto; QI = quimosina indireto).	154
FIGURA 11	Evolução do odor azedo (a), e de manteiga (b) dos queijos Prato elaborados com protease do <i>R. miehei</i> , coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, durante o tempo de maturação. (MD = microbiano direto; MI= microbiano indireto; BD = bovino direto; BI = bovino indireto; QD = quimosina direto; QI = quimosina indireto).	156
FIGURA 12	Evolução do gosto salgado (a), doce (b) e amargo (c) dos queijos Prato elaborados com protease do <i>R. miehei</i> , coalho	157

- bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, durante o tempo de maturação. (MD = microbiano direto; MI= microbiano indireto; BD = bovino direto; BI = bovino indireto; QD = quimosina direto; QI = quimosina indireto).
- FIGURA 13 Evolução do sabor de leite (a), manteiga (b) e ranço (c) dos queijos Prato elaborados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, durante o tempo de maturação. (MD = microbiano direto; MI= microbiano indireto; BD = bovino direto; BI = bovino indireto; QD = quimosina direto; QI = quimosina indireto). 159
- FIGURA 14 Evolução do residual salgado (a), gorduroso (b) e amargo (c) dos queijos Prato elaborados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, durante o tempo de maturação. (MD = microbiano direto; MI= microbiano indireto; BD = bovino direto; BI = bovino indireto; QD = quimosina direto; QI = quimosina indireto). 161
- CAP 6**
- FIGURA 1 Curva típica da força de deformação obtida pelo Instron para o queijo Prato. (dureza =  $H_1$ ; elasticidade = largura na curva  $A_2$ ; adesividade = área de força negativa no primeiro ciclo de compressão; coesividade =  $(A_2/A_1)$ ; gomosidade =  $(A_2/A_1)H_1$ ). 177
- FIGURA 2 Evolução da dureza TPA (a), elasticidade TPA (b), adesividade TPA (c), coesividade TPA (d) e gomosidade TPA (e) dos queijos Prato fabricados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. (MD = microbiano direto; MI= microbiano indireto; BD = bovino direto; BI = bovino indireto; QD = quimosina direto; QI = quimosina 183

indireto).

FIGURA 3 Eletroforetograma do queijo Prato fabricado com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto. Banda 1= caseinato de sódio (padrão). Bandas 2,3,4,5,6 = amostras com 5,15,30,45 e 60 dias de maturação. 187

### RESUMO GERAL

Este trabalho teve por objetivo determinar a influência do tipo de coagulante na composição e rendimento do queijo Prato fabricado com e sem lavagem da massa (aquecimento direto e indireto) e avaliar as mudanças ocorridas nas características sensoriais durante o período de maturação. Os coagulantes estudados foram protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino (20% quimosina e 80% pepsina) e quimosina obtida por fermentação. O cozimento da massa foi realizado por aquecimento direto no tanque, através da remoção de 1/3 do soro e

substituição deste por água quente. O aquecimento indireto foi realizado em tanque encamisado. Os queijos foram fabricados em escala industrial e para cada processamento foram utilizados 5000 L de leite. Cada tratamento foi realizado em duplicata, perfazendo 12 processamentos, que foram previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução. A composição do leite, soro e queijo foram determinadas. Os queijos foram analisados após 5, 15, 30, 45 e 60 dias de estocagem quanto ao pH, acidez titulável, nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 e a 12 % de ácido tricloroacético (TCA), perfil de sabor e textura sensorial e perfil de textura instrumental. O tipo de coagulante e a forma de aquecimento da massa influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a composição dos queijos, mas diferenças estatisticamente significativas não foram observadas nas recuperações de gordura e proteínas e no rendimento de fabricação dos queijos. Todos os queijos apresentaram pequeno aumento da acidez titulável e diminuição do pH durante os 60 dias de cura. A extensão e profundidade da proteólise foram dependentes do tipo de coagulante e do tempo de maturação. Os queijos fabricados com a protease do *Rhizomucor miehei*, independente do tipo de aquecimento, apresentaram os maiores índices de extensão e profundidade da proteólise, evidenciando a maior atividade proteolítica desse coagulante. O tipo de coagulante e o tempo de maturação influenciaram no desenvolvimento do gosto amargo ( $p < 0,05$ ). As maiores intensidades de amargor foram percebidas nos queijos fabricados com a protease do *Rhizomucor miehei*, com ou sem lavagem da massa. As características de aparência e as propriedades de textura sensorial como a dureza, elasticidade e adesividade foram significativamente ( $p < 0,05$ ) influenciadas pelo coagulante, aquecimento da massa e o tempo de maturação. Os queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto revelaram maior intensidade de cor e mesclado, maior dureza e elasticidade em relação aos queijos dos demais tratamentos. O tipo de coagulante, o aquecimento da massa e o tempo de maturação influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) os atributos de odor a leite e manteiga, o gosto salgado, o sabor de leite, o sabor de manteiga e ranço e, o residual salgado e gorduroso. Maior intensidade de sabor foi percebida nos queijos feitos com quimosina e aquecimento direto. O amargor e o gosto

residual amargo foram mais intensos nos queijos fabricados com a protease do *Rhizomucor miehei* e aquecimento indireto. As propriedades de textura instrumental foram significativamente afetadas pelo coagulante, aquecimento da massa e o tempo de maturação. Portanto, o tipo de coagulante e a forma de aquecimento no cozimento da massa, juntamente com o tempo de maturação são variáveis que podem ser usadas no controle das características sensoriais do queijo Prato.

#### **GENERAL ABSTRACT**

The objective of this work was to determine the influence of the coagulant type in the composition and yield of Prato cheese manufactured with and without the curd wash (direct and indirect heating) and to evaluate the differences occurred in the sensorial characteristics during the aging period. The studied coagulants were *Rhizomucor miehei* protease, calf rennet (20% chymosin and 80% pepsin) and chymosin obtained by fermentation. The curd cooking was realized by direct heating in the vat, through the removal of 1/3 of the whey and substitution of this by

hot water. The indirect heating was carried out in vat jacket. The cheeses were manufactured in industrial scale and were used 5000 L of milk for each trial. Each treatment was carried out in duplicate, resulting in twelve trials, which were previously randomised to determine the order of execution. The composition of the milk, whey and cheese were determined. The cheeses were analyzed after 5, 15, 30, 45 and 60 days of storage for the pH, titratable acidity, soluble nitrogen (NS) in pH 4,6 and in 12% of trichloroacetic acid (TCA), flavour profile and sensorial texture and instrumental profile texture. The coagulant type and the form of curd heating influenced significantly ( $p < 0,05$ ) the cheeses composition, but statistically significant difference were not observed in the fat and protein recoveries and in the cheeses manufacture yield. All the cheeses presented small titratable acidity increase and pH decrease during the 60 days of aging. The extent and depth of proteolysis were dependents of the coagulant type and time of aging. The cheeses manufactured with the protease of the *Rhizomucor miehei*, independent of the heating type, presented the greatest extent and depth proteolysis indexes, evidencing the greatest proteolytic activity of this coagulant. The coagulant type and time of aging influenced in the development of the bitter taste ( $p < 0,05$ ). The greatest intensities of bitterness were perceived in the cheeses manufactured with the protease of the *Rhizomucor miehei*, with or without curd washing. The appearance characteristics and the properties of sensorial texture as hardness, springiness and adhesiveness were significantly ( $p < 0,05$ ) influenced by the coagulant, type of curd heating and time of aging. The cheeses manufactured with chymosin and direct heating showed higher color intensity and marbled, higher hardness and springiness in relation to the cheeses of the other treatments. The coagulant type, the type of curd heating and time of aging influenced significantly ( $p < 0,05$ ) the odor attributes to milk and butter, the salty taste, the flavour to milk, the butter flavour and rancidity and, the residual salty and greasy. Greater flavour intensity was perceived in the cheeses made with chymosin and direct heating. The bitterness and the bitter residual taste were more intense in the cheeses manufactured with the *Rhizomucor miehei* protease and indirect heating. The properties of instrumental texture were affected significantly by the coagulant, type

of curd heating and time of aging. Therefore, the coagulant type and the heating form for cooking curd, together with the time of aging are variables that can be used in the control of the sensorial characteristics of Prato cheese.

## INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que a produção nacional de queijos em 2003 supere as 400 mil toneladas/ano, das quais aproximadamente 88 mil toneladas/ano correspondem ao queijo Prato equivalendo a 22% da produção nacional. Esse percentual o privilegia como o segundo queijo mais consumido no Brasil, superado somente pelo queijo Mussarela. Atualmente, vem sendo consumido de forma indireta, principalmente em sanduíches, que requerem características sensoriais e propriedades funcionais. Por queijo Prato, se denomina o queijo maturado obtido por coagulação enzimática do leite. É classificado como um queijo gordo e de média umidade. Dentre as características sensoriais do queijo Prato destacam-se seu sabor suave e consistência macia, por se tratar de um queijo de massa semicozida e lavada. A fatiabilidade é uma de suas características relevantes.

Nos últimos anos, algumas mudanças na tecnologia de fabricação do queijo Prato têm sido efetuadas pelas indústrias laticinistas visando à melhoria de sua qualidade. Dentre esses, podem ser destacados a substituição do coalho bovino por substitutos de renina e o tipo aquecimento na etapa de cozimento da massa.

No Brasil, a grande maioria das indústrias laticinistas tem utilizado o coalho bovino para a coagulação do leite na produção do queijo Prato. Porém, a tendência no crescimento na produção de queijos e a escassez na oferta de estômago de bezerros, outras fontes de enzimas coagulantes têm sido pesquisadas para encontrar substitutos mais adequados, econômicos e disponíveis comercialmente. Dentre os substitutos de renina estão os coagulantes microbianos e a quimosina obtida por fermentação. Os coagulantes microbianos quando comparados ao coalho bovino e a quimosina apresentam intensa atividade proteolítica que podem ocasionar problemas de rendimento e sabor nos queijos. A quimosina obtida por fermentação apresenta vantagem quanto à qualidade, pureza, rendimento e constância no fornecimento.

A etapa de cozimento da massa é uma característica do processo de elaboração do queijo Prato. Pode ser realizada por tratamento térmico direto ou

indireto. Tradicionalmente, o cozimento é realizado de maneira direta que consiste na remoção de parte do soro e sua substituição por água quente adicionada à mistura massa e soro. O aquecimento indireto é realizado com vapor fluente em tanque encamisado. A adição direta de água promove a lavagem da massa, permitindo a remoção da lactose dos grãos, a diluição da acidez e o controle da acidificação. Já, o procedimento indireto pode levar a maior retenção de coagulante na massa, ocasionando a proteólise mais extensiva, provocando defeitos de sabor nos queijos, como o gosto amargo.

A substituição do coalho bovino por coagulante microbiano ou quimosina obtida por fermentação, e o tipo de aquecimento no cozimento da massa, podem resultar em mudanças na qualidade sensorial no queijo Prato durante a maturação. Portanto, um conhecimento mais aprofundado das conseqüências sensoriais da substituição do coalho bovino se torna necessário para melhoria da qualidade e ajuste no processo de elaboração do queijo Prato. Assim, este trabalho teve por objetivo determinar a influência do tipo de coagulante na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo Prato fabricado com e sem lavagem da massa, e estocagem entre 8 e 10°C aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação.

## **CAPÍTULO 1**

### **QUEIJO PRATO: TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO, PROTEÓLISE E CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS - UMA REVISÃO**



## INTRODUÇÃO

O queijo prato é um dos produtos lácteos mais populares do país introduzido por imigrantes dinamarqueses na década de 20 na região sul de Minas Gerais (Furtado & Lourenço Neto, 1994). Este produto, bem como sua variedade é derivada dos queijos holandeses clássicos de massa lavada como o Gouda e o Edam e dos queijos dinamarqueses como o Dambo e o Tybo (Van Dender et al., 1986). A tecnologia de fabricação do queijo Prato no Brasil foi adaptada às condições locais, explicando-se assim as diferenças de sabor e textura com relação aos queijos originais, com o Prato apresentando textura fechada ou com olhaduras regulares ou irregulares (Furtado & Lourenço Neto, 1994). Do total de queijos produzidos no Brasil em 1995, 26% foram do queijo Prato e suas variedades (Minussi et al., 1995), para 2003 a estimativa calculada é de aproximadamente 22% do total da produção de queijos (Datamark, 2001). Sob a denominação de queijo Prato estão incluídas as variedades: Lanche, Cobocó, Gouda, Estepe, dentre outros, diferindo quanto ao formato e peso (Minussi et al., 1995; Furtado & Lourenço Neto, 1994; Oliveira, 1986; Schiffan & Komatsu, 1980; Pereira, 1975). A legislação brasileira define o queijo Prato como o produto maturado obtido por coagulação do leite por meio de coalho e/ ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não pela ação de cultura láctica específica (Brasil, 1997).

O queijo Prato é obtido por coagulação enzimática do leite, acrescido de pequena quantidade de corante para dar o tom amarelado característico. É um queijo de massa semicozida, o que lhe confere uma característica mais elástica e, com o decorrer da cura apresenta um sabor menos ácido e mais cremoso (Oliveira, 1986). O fermento láctico mesofílico empregado na obtenção de queijo Prato pode ser acidificante ou acidificante e aromatizante (Furtado, 1984), o que resultará, respectivamente, em um queijo de massa fechada e pouco aroma ou massa aberta e aroma acentuado. O emprego do fermento na elaboração do queijo tem por finalidade acidificar o meio, impedindo o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, e contribuir para dessoragem da massa, além de

contribuir nas qualidades sensoriais e textura do queijo (Dutra, 1997; Oliveira, 1986).

A composição média esperada é de 42 a 44% de umidade, 26 a 29% de gordura, 5,2 a 5,4 de pH e de 1,6 a 1,9% de sal (Furtado & Lourenço Neto, 1994). Para Schiffan & Komatsu (1980), o queijo Prato é classificado como gordo e semiduro, de massa semicozida, prensado e maturado no mínimo por 20 dias. Sua textura deverá ter olhaduras distribuídas regularmente, pouco numerosas e bem formadas; sua consistência é macia e compacta. Para verificar a variação na composição química dos queijos, estes autores analisaram 50 amostras comerciais de queijo Prato e encontraram valores médios de 40,0% de umidade, 47,5 % de gordura em base seca, 1,7% de sal e 3,5 % de cinzas. Estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (Brasil, 1997) que, o queijo Prato é um queijo gordo e de média umidade. Dos queijos nacionais, o Prato é considerado um queijo mais padronizado.

Tradicionalmente, o queijo Prato deve ser curado pelo menos 60 dias para atingir suas melhores características sensoriais (Minussi et al., 1995). O processo de cura é um aspecto importante a ser considerado no queijo prato. A maturação compreende um conjunto de modificações químicas, bioquímicas e microbiológicas, que resultam na transformação dos principais componentes do queijo, como proteínas, lipídios e lactose, em produtos primários e secundários (Fox, 1993). Esta etapa ocorre em condições de temperatura e umidade controladas, possibilitando o desenvolvimento das características sensoriais dos queijos que lhe são peculiares. Uma das principais características do queijo Prato é a fatiabilidade, e sua tendência de consumo de forma indireta em sanduíches. O seu rendimento de fabricação é cerca de 9,0 a 9,5 L/kg (Furtado & Lourenço Neto, 1994).

## TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO

O queijo Prato é um queijo nacional, classificado como gordo, de massa semicozida, lavada, macia e maturado. Sua tecnologia de fabricação assemelha-se a variedades de queijos holandeses.

O procedimento de lavagem da massa consiste na retirada de parte do soro e substituição deste por adição direta de água quente ou de soro aquecido à mistura massa e soro, sendo a adição de água quente a prática mais usual. O volume de soro a ser retirado e a quantidade de água adicionada depende das características de cada tipo de queijo. Esse procedimento promove a delactosagem do grão, regulação do pH e controle da acidificação. Conseqüentemente, os queijos apresentam sabor e textura suave.

Essas variedades de queijos são obtidas a partir de leite de vaca parcialmente desnatado, coagulado com renina, uso de cultura láctica mesofílica composta de *Lactococcus lactis*, e usualmente de *Leuconostoc* para produzir CO<sub>2</sub>, prensados, salgados geralmente em salmoura e maturados (Walstra, Noomen & Geurts, 1999). Os queijos apresentam consistência semidura a dura, textura lisa ou com pequenas olhaduras e grande variação na intensidade de sabor. Os diversos tipos de queijos dessas variedades possuem diferenças em peso, tamanho e forma. Sua composição apresenta uma faixa de 40-50% de gordura na matéria seca, 53 - 63 % de umidade, 2 - 7% de sal, pH de 5,0 – 5,6 e o tempo de maturação pode variar de duas semanas a dois anos. Para o queijo Prato, a legislação brasileira estabelece que o queijo deve maturar pelo tempo necessário (pelo menos 25 dias) para atingir suas características específicas (Brasil, 1997). No queijo Prato, os principais defeitos que ocorrem são o estufamento, deficiências de cura e defeitos de crosta, os quais podem estar relacionados à falhas durante a elaboração e manuseio do produto, desuso ou mau emprego da cultura láctica e contaminação excessiva (Souza, 1960). Dentre os queijos nacionais, o queijo Prato é considerado um tipo de queijo de melhor padrão tecnológico e comercial.

## **Coagulação do leite.**

A coagulação é obtida mediante utilização de extrato enzimático proteolítico em quantidade e condições adequadas, destinadas a promover a coagulação do leite para a produção de queijos.

O processo de coagulação inclui duas fases: primária e secundária. Na fase primária ocorre a clivagem específica do macropeptídeo hidrofílico a partir das moléculas da  $\kappa$ -caseína situadas na periferia das micelas de caseína (Visser, 1993). A clivagem preferencial ocorre na ligação Phe<sub>105</sub> - Met<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína, a qual é altamente susceptível à hidrólise por proteinases ácidas, resultando no surgimento da para- $\kappa$ -caseína e macropeptídeos (Fox, 1988). A fase secundária envolve a precipitação da para- $\kappa$ -caseína por íons Ca<sup>2+</sup> em temperaturas acima de 20°C. Na forma intacta, as micelas de caseínas são mantidas coloidalmente dispersas no leite por forças de repulsão de natureza eletrostática e estéricas, envolvendo o macropeptídeo negativamente carregado das moléculas de  $\kappa$ -caseína. Quando esta barreira é retirada pela remoção do macropeptídeo por ação enzimática, as micelas de caseína tornam-se instáveis e, em temperaturas ao redor de 30°C a para- $\kappa$ -caseína inicia a agregação sob a influência dos íons Ca<sup>2+</sup> do meio (Visser, 1993).

A quimosina (E.C.3.4.23.4) é a principal enzima do coalho bovino, com grande poder coagulante e altamente específica para a ligação Phe<sub>105</sub> - Met<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína (Sousa, Argö & McSweeney, 2001). Comercialmente, outras enzimas são empregadas para a coagulação do leite como a pepsina (E.C. 3.4.23.1.) e as enzimas microbianas, porém com menor especificidade pelo substrato (Visser, 1993).

### **Coalho e Coagulantes**

Coalho é um extrato rico em enzimas proteolíticas, obtido do abomaso de bovinos lactantes ou adultos, que apresenta atividade coagulante sobre o leite (Gorreta, 1980). Proteinases de várias origens, que não gástricas com capacidade de coagular o leite, em condições adequadas, são definidas como coagulantes

(Andrén, 1998). Além da quimosina (E.C.3.4.23.4), outras enzimas são utilizadas na coagulação do leite como a pepsina (E.C.3.4.23.1) e as enzimas microbianas. Estas também clivam na posição Phe<sub>105</sub> - Met<sub>106</sub> da k-caseína, tendo porém, menor especificidade pelo substrato podendo ocasionar efeitos indesejáveis durante a maturação dos queijos (Visser, 1993). Existe uma variedade de proteinases animais que têm sido utilizadas como coagulantes do leite, como as proteinases gástricas de bezerras, cabritos e cordeiros (Fox, 1988), assim como proteinases de origem fúngica (Andrén, 1998).

A função primária do coalho é hidrolisar o componente estável da caseína (k-caseína); entretanto, o uso de coagulantes com baixa especificidade de hidrólise promovem uma proteólise extrema causando a redução no rendimento de fabricação do queijo (Fox, 1988). Os extratos enzimáticos de origem vegetal são capazes de coagular o leite, porém, são excessivamente proteolíticos e inespecíficos, ocasionando problemas de rendimento no queijo, perda de gordura no soro e defeitos indesejáveis de sabor no produto final (Green, 1977).

O coalho bovino é composto de uma mistura de quimosina e pepsina bovina. A proporção de quimosina e pepsina no coalho bovino é dependente da idade e do regime alimentar do animal no abate (Andrén, 1998). Nos coalhos de animais jovens, há maior proporção de quimosina, enquanto nos animais adultos há o predomínio da pepsina. No Brasil, o coalho bovino contém uma proporção de 80% de pepsina e 20% de quimosina (Retzl, Sguedoni & Juliano, 1992). Outras enzimas têm sido utilizadas na substituição ou em conjunto com a renina (coalho de vitelo), como a pepsina bovina, suína e enzimas microbianas (Grappin, Rauk & Olson, 1985).

As enzimas microbianas são originárias de espécies fúngicas incluindo *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei* e *Cryphonectria parasitica*. Recentemente, através do uso da tecnologia do DNA recombinante, nova fonte de quimosina tem sido desenvolvida como alternativa para a escassez de coalho bovino (Barbano & Rasmussen, 1992).

## Coagulante microbiano

Com a escassez de coagulantes de origem animal, e o crescimento da produção leiteira, houve um aumento na procura de substitutos de renina, como as enzimas microbianas de espécies fúngicas a partir de *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei* e *Cryphonectria parasitica*. A principal característica destas enzimas é a sua elevada atividade proteolítica e baixa especificidade (Fox, 1988).

O extrato de *Rhizomucor pusillus* var. Lindt, é mais proteolítico se comparado ao coalho de bezerro ou ao extrato de *Rhizomucor miehei*, sendo 3 vezes superior ao do coalho de vitelo. Essa atividade proteolítica origina coalhada dura e de baixo rendimento, tendendo a produzir sabor amargo no queijo maturado, sendo recomendado para variedades de queijos de curta maturação (Fox, 1989).

O extrato de *Cryphonectria parasitica*, é mais caseolítico do que os obtidos a partir do *Rhizomucor*, favorecendo o desenvolvimento de gosto amargo nos queijos úmidos (Scott, 1991). Proteases fúngicas apresentam diferentes especificidades quando comparadas ao coalho de vitelo, sendo utilizadas em algumas variedades de queijos. Nos E.U.A, os coagulantes microbianos são amplamente usados, mas em muitos países europeus e Nova Zelândia, o coalho de vitelo é dominante (Fox, 1988). No Brasil, o coagulante microbiano mais empregado é o *Rhizomucor miehei*, comercialmente oferecido em forma líquida e em pó (Rettl, Sguedoni & Juliano, 1992). Este coagulante apresenta maior estabilidade térmica do que o coalho de vitelo, conseqüentemente a sua retenção na coalhada pode produzir mudanças na velocidade da proteólise durante a maturação, ocasionando desenvolvimento de gosto amargo e alterações de textura nos queijos (Guinee & Wilkinson, 1992).

Apesar do número de coagulantes testados, somente 6 têm sido mais ou menos aceitos como substitutos do coalho de vitelo: a pepsina bovina, a suína e a de frango; as proteases do *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* e *Cryphonectria parasitica* respectivamente. A quimosina obtida por fermentação

tem sido usada como substituto de renina, e nos E.U.A sua utilização tem sido crescente e, em alguns países europeus que permitem seu uso (Guinee & Wilkinson, 1992). No Brasil, o coagulante misto, ou seja uma mistura constituída de 50% de pepsina suína e 50% de coalho de vitelo ou bovina, é comercializada sob a forma de pó, e sua vantagem é o baixo custo comparativamente ao coagulante microbiano e coalho de origem bovina (Rettl, Sguedoni & Juliano, 1992). Atualmente, à parte da utilização da quimosina obtida por fermentação, muitos coalhos usados na indústria queijeira consistem de misturas de duas ou mais proteinases ácidas. Misturas comerciais incluem proporções de coalho de vitelo e pepsina suína (50% respectivamente), coalho de vitelo e pepsina bovina (50 – 70% : 50 – 30%, respectivamente), coalho de vitelo : pepsina bovina : pepsina suína (20 – 25% : 30 – 25% : 50%, respectivamente) ou coalho de vitelo : pepsina suína : pepsina bovina : *R. miehei / pusillus* (20% : 20% : 20% : 40%, respectivamente) (Guinee & Wilkinson, 1992). Coalhos comerciais contendo aproximadamente 50% de pepsina bovina, com atividade proteolítica, apresentam geralmente resultados satisfatórios em relação a quimosina do bezerro, em termos de rendimento e qualidade do queijo.

### **Quimosina obtida por fermentação**

Para satisfazer a demanda por substitutos adequados para o coalho de vitelo, uma nova fonte de quimosina foi desenvolvida através da tecnologia do DNA recombinante, sendo o produto denominado quimosina produzida por fermentação (Andrén, 1998). O código genético para a síntese da quimosina foi inserido em vários microrganismos hospedeiros e a quimosina pode ser produzida na forma pura, através destes organismos transgênicos, por tecnologia de fermentação ou processos biotecnológicos (Barbano & Rasmussen, 1992). Para sua obtenção, o RNA mensageiro (mRNA), contendo a seqüência de bases codificadas para a produção da proquimosina, foi isolado das células do abomaso do bezerro e transcrito, com auxílio da enzima transcriptase reversa, em DNA complementar (c-DNA). O c-DNA contém a seqüência de nucleotídeos responsável pela correta seqüência de aminoácidos da proquimosina, sem

apresentar as seqüências de introns presentes no DNA natural da quimosina. A seqüência de bases do gene da proquimosina é determinada e o c-DNA pode ser obtido, por síntese bioquímica (Teuber, 1990). A clonagem e expressão do DNA podem ser possíveis através de vetores de expressão, denominados plasmídeos, que podem ser inseridos em microrganismos hospedeiros, como bactérias e fungos. Os microrganismos que vêm sendo estudados como hospedeiros na produção industrial de quimosina genética são: *Kluyveromyces lactis* (Gist-Brocades), *Escherichia coli* (Pfizer) e *Aspergillus niger* variedade awamori (Chr. Hansen), embora outras espécies de bactérias e fungos possam ser utilizados (Fox, 1993; Teuber, 1990).

O coalho obtido por fermentação, através da *E. coli* K-12 (Pfizer), é conhecido comercialmente como Chy-Max (Chr. Hansen). O gene da proquimosina B é isolado a partir do estômago do bezerro e transcrito no c-DNA da proquimosina. Este então é inserido no vetor de expressão após a região que codifica a glicoamilase. A *E. coli* transformada com o vetor expressão, passa a integrar o genoma, e desta forma, são secretadas as proteínas glicoamilase-proquimosina. Acredita-se que a formação da quimosina ocorra por um mecanismo de ativação autocatalítico e todo o complexo glucoamilase-proquimosina é transformado a quimosina ativa, em decorrência do pH relativamente baixo do meio fermentativo. Em nível industrial a *E. coli* é submetida a fermentação convencional. Ao final da fermentação, as células são inativadas e a quimosina recuperada do meio por métodos de purificação protéica convencional, que incluem tratamento ácido, coluna cromatográfica e filtração estéril (Harboe, 1992). A quimosina obtida por fermentação é composta por quimosina do tipo B, enquanto que o coalho de vitelo é constituído das quimosinas A, B e C, sendo a C um produto de degradação da quimosina A (Harboe, 1992). Comercialmente, três tipos de quimosina obtida por fermentação estão disponíveis no mercado, Maxiren, secretada por *K. marxianus* var. *lactis* e produzida pela Gist Brocades; Chymogen, obtida a partir do *A. niger* e produzida pela Ch.Hansen; e Chymax secretado pela *E. coli* e desenvolvida pela Pfizer (Fox et al., 2000).

Estudos comparativos de rendimento do coalho obtido por fermentação com outros tipos de coagulantes na fabricação das diversas variedades de queijos têm sido realizados por vários pesquisadores. Green (1985) comparando a quimosina, obtida por DNA recombinante da *E. coli*, com o coalho de vitelo, verificou que, as características de fabricação e a recuperação de sólidos do leite, no coágulo e na composição, foram similares, enquanto que a proteólise e a textura desenvolvidas durante a maturação entre os queijos elaborados com os dois agentes coagulantes não apresentaram diferenças significativas.

Queijos Cheddar elaborados com quimosina recombinante obtido do *K. lactis* e com o coalho de vitelo foram analisadas por Bines, Young & Law (1989). Os autores concluíram que as características de fabricação, balanço de massa e composição dos queijos foram similares, e um painel degustativo não foi capaz de diferenciar as características sensoriais dos queijos de 3, 6 ou 12 meses.

Barbano & Rasmussen (1992) não verificaram nenhuma diferença significativa no rendimento do queijo Cheddar elaborados com quimosina obtida por fermentação e coalho de vitelo, entretanto nos queijos elaborados com quimosina obtida por fermentação obtiveram maior rendimento comparativamente aos queijos elaborados com coagulantes microbianos a partir das proteases do *R. miehei* e *R. pusillus*.

Estudo comparativo de rendimento em queijo Prato foi realizado por Folegatti (1994), com coalho de vitelo, quimosina obtida por fermentação e coalho bovino. Não foram observadas diferenças significativas entre os coalhos, mas o melhor rendimento de produção foi para o coalho de vitelo, quimosina obtida por fermentação e coalho bovino respectivamente.

### **Tratamento da Massa**

O processo de fabricação de queijos é composto de várias etapas, a coagulação do leite por adição de renina, e o tratamento da massa que consiste do corte, agitação e cozimento. O tempo de coagulação é ao redor de 35 minutos na temperatura de 30°C (Walstra, Noomen & Geurts, 1999). O corte é realizado

após a massa atingir o ponto final de coagulação, a seguir é iniciada a agitação, que para o queijo Prato deve ser contínua, procurando-se manter a massa dispersa no soro. Inicialmente, a agitação é lenta e se torna mais rápida a medida que os grãos da massa se tornam mais firmes em razão de sua dessoragem (Oliveira, 1986). A finalidade da agitação é garantir a uniformidade da temperatura no tanque, aumentar a sinérese do coágulo, evitar aglomeração de grãos e ao mesmo tempo prepará-los para uma agitação mais vigorosa e o aquecimento. O tempo de duração desta etapa não deve exceder 30 minutos; caso contrário, poderá resultar na presença de queijos mais ácidos e desmineralizados (Walstra, Noomen & Geurts, 1999; Dutra, 1997).

A operação de aquecimento da massa pode ser realizada de forma direta pela adição de água quente, injeção de vapor à massa do queijo, vapor fluente na camisa do tanque ou adição de soro aquecido (Walstra, Noomen & Geurts, 1999, Oliveira, 1986). A finalidade desta etapa é favorecer o controle do pH, aumentar a sinérese, controlar o desenvolvimento microbiano, dificultar a ação de microrganismos indesejáveis e controlar o extrato seco total do queijo (Walstra, Noomen & Geurts, 1999, Dutra, 1997). A adição direta de água quente sobre a mistura massa e soro é a forma tradicional de aquecimento. Normalmente é retirado cerca de 1/3 do soro e substituído por água de aquecimento. Este tipo de procedimento é executado em queijos de massa semicozida e lavada, como o Prato (Oliveira, 1986). O volume retirado de soro varia em função das características de cada queijo. A água quente (60 - 80°C) adicionada é utilizada para aquecimento e lavagem da massa, sua adição deve ser lenta e gradual e distribuída uniformemente no tanque para evitar aquecimento localizado (Walstra, Noomen & Geurts, 1999; Souza, 1960).

O aquecimento direto com água quente provoca uma pequena diluição que influencia na acidificação do queijo (Oliveira, 1986). Este procedimento tem por objetivo a lavagem e delactosagem dos grãos, diluição da acidez e controle da acidificação, e resulta num queijo de sabor mais suave. O aquecimento deve ser gradual para que haja uma elevação uniforme de temperatura em todo o grão e

não apenas na superfície. Dessa forma, dificulta-se a formação de película ao redor do grão o que pode impedir a saída de soro do seu interior. Quando o aquecimento é muito rápido, ocorre uma sinérese intensiva e superficial dos grãos, fechando-se os poros da película que os reveste, impedindo a saída de soro do seu interior. O soro retido no interior do grão contém lactose, a qual é transformada em ácido láctico pelo fermento, resultando um queijo de acidez elevada. Como consequência há uma dessoragem heterogênea e a liga da massa fica prejudicada, o que resulta em queijos com defeitos de sabor e textura (Dutra, 1997).

O coalho adicionado ao leite de fabricação é perdido no soro ou desnaturado em razão do aquecimento da mistura massa e soro a temperaturas elevadas de cozimento (Fox et al., 2000). O coalho remanescente na massa varia de 0-15%, e sua atividade residual é dependente do tipo de coagulante, proporção das enzimas na mistura do coalho, temperatura de cozimento, variedade e teor de umidade do queijo (Guinee & Wilkinson, 1992).

O pH influencia a retenção do coalho na massa. Em baixo pH mais coalho é retido por associação com a paracaseína (Walstra, Noomen & Geurts, 1999). A atividade residual da quimosina, pepsina bovina e suína na massa são dependentes do pH, e a sua retenção aumenta com a redução do pH. Entretanto, coagulantes microbianos têm menor atividade residual do que a quimosina e são independentes do pH (Fox, 1998). A quantidade de água adicionada à massa pode regular o pH. Nos queijos com alto teor de umidade, há um aumento na proporção de lactose para as substâncias tamponantes na fase aquosa, ocorrendo a diminuição do pH em razão da conversão da lactose em ácido láctico pelo fermento. A velocidade de acidificação depende da quantidade de fermento láctico, e pode ter influência no pH inicial do leite e sua composição (Walstra, Noomen & Geurts, 1999).

A atividade residual do coalho é afetada pela temperatura de cozimento da massa. Em queijos com temperaturas elevadas de cozimento há menor retenção de coalho devido à desnaturação da quimosina. Já em queijo como o Gouda pode

ocorrer considerável atividade de coalho residual em razão da baixa temperatura de cozimento de aproximadamente 37°C. Outros coagulantes apresentam diferenças na estabilidade térmica, o que resulta em diferenças na atividade residual do coagulante. As pepsinas suínas são mais sensíveis ao calor seguidas da *Cryphonectria parasitica*, pepsina bovina, quimosina, protease do *Rhizomucor pusillus* e *Rhizomucor miehei*. Em geral, a utilização de um coalho mais termoestável do que a quimosina deve ser evitado, pois a maior atividade residual na massa pode levar a uma proteólise mais excessiva ocasionando defeitos de qualidade no queijo (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001). Assim, o tipo de aquecimento é importante para regular a quantidade de coalho residual ativo na massa e também remove parcialmente a lactose. O excesso de coalho no queijo pode causar problemas de sabor no produto final, como o gosto amargo.

## **RENDIMENTO DE FABRICAÇÃO**

A quantidade de queijo produzido a partir de uma quantidade conhecida de leite é de grande importância para a indústria queijeira.

A expressão do rendimento em queijo é importante em razão dos aspectos econômicos, do controle de processamento e na avaliação dos resultados dos experimentos de fabricação. A expressão usual para o rendimento é “Kg de queijo por 100 Kg de leite”, entretanto, como a composição do leite é variável uma melhor definição seria: “Kg de queijo por 100 Kg de leite” contendo X% de gordura e Y % de proteínas ou caseína. É recomendável que o rendimento real seja comparado ao teórico para estimar a sua eficiência (Emmons, 1993).

A quantidade de queijo obtida a partir do leite é uma indicação da eficiência das operações de fabricação. A qualidade do leite, a natureza das operações, as técnicas de fabricação e procedimentos de cura são condições que afetam o rendimento. Estas condições dependem de fatores como: composição do leite, quantidade de seus componentes perdidos no soro, teor de sal adicionado ao

processo de fabricação e quantidade de água retida no queijo (Van Slyke & Price, 1979).

A fórmula mais usada para calcular o rendimento teórico (RT) de queijos foi proposta por Van Slyke & Price (1979), baseada em queijo Cheddar, conforme equação 1. Na fórmula o fator 0,93 assume que 93% da gordura no leite será retida no queijo e, assume que 10% da caseína não será recuperada no queijo. O valor 1,09 leva em conta os outros constituintes do leite e o sal adicionado ao queijo contribuindo com cerca de 9% do peso da gordura e caseína retida no queijo.

$$RT = \frac{[0,93\% \text{ da gordura do leite} + (\% \text{ de caseína no leite} - 0,1)] \times (1,09)}{1 - \left( \frac{\% \text{ umidade desejada no queijo}}{100} \right)} \dots\dots \text{Equação (1)}$$

Diferenças na eficiência do rendimento em queijos foram observadas em razão dos diferentes tipos de equipamentos e operações de fabricação. Elaborar queijos de igual composição em recipientes de mesma capacidade é difícil, tanto em condições experimentais como comerciais. Assim, há necessidade de um ajuste ou correção do rendimento para uma composição padrão de queijo. Desta forma, o rendimento real ou observado deve ser ajustado em razão das variações de composição do queijo, sendo mais comum o ajuste dos teores de umidade e sal do queijo. Por esse motivo, é desejável calcular-se o rendimento dos queijos ajustado para o mesmo teor de umidade e sal (RAJ), como mostra a equação 2 (Lau, Barbano & Rasmussem, 1990).

$$RAJ = (\text{Rendimento}) \left[ \frac{100 - (\% \text{ umidade real} + \% \text{ de sal real})}{100 - (\% \text{ umidade desejada} + \% \text{ sal desejada})} \right] \dots\dots \text{Equação(2)}$$

Lau, Barbano & Rasmussem (1990), ao compararem o rendimento na fabricação de queijo Cheddar com leites pasteurizado e cru, verificaram um aumento na faixa de 1 a 4 % de rendimento para o queijo produzido de leite pasteurizado. Este aumento foi atribuído à retenção de um ou mais componentes como umidade, gordura, proteínas do soro, extrato seco ou sais.

Alves (1999) comparando o rendimento do queijo Prato fabricado com leite adicionado de 0, 10 e 30% de leite reconstituído, verificou que os queijos com teores até 10% de leite reconstituído apresentaram melhor rendimento em L/Kg.

Ustunol & Hicks (1990) verificaram que a adição de  $\text{CaCl}_2$  ao leite coagulado com *Cryphonectria parasitica* aumentou o rendimento em queijo.

Diversas fórmulas têm sido sugeridas para estimar o rendimento em queijo, sendo que a eficiência da operação pode ser medida comparando-se os resultados de produção com os rendimentos teóricos. A recuperação de gordura e caseína pode ser otimizada para o sistema, e o conteúdo de umidade pode ser manipulado por alteração na tecnologia de processamento (Phelan, 1981).

### **Fatores que afetam o rendimento na fabricação de queijos.**

Diversos fatores afetam o rendimento de fabricação de queijos. Segundo Emmons (1993), o rendimento em queijo varia em razão do tipo de queijo, composição do leite, composição do queijo (umidade, sal) e perdas de gordura e proteínas no soro. A composição do leite é influenciada pela raça do animal, variação entre animais de mesma raça, estágio de lactação, mudanças de estação, tipo de ração, idade do animal, doenças (especialmente mastite) e procedimentos de ordenha (Lawrence, 1993).

As condições de processamento afetam o rendimento, bem como a perda dos componentes do queijo. Os fatores envolvidos têm um efeito pequeno no rendimento quando individualmente, porém, extrapolado para uma grande produção, o efeito custo/benefício é bastante significativo. Dentre estes podem ser citados: a estocagem, padronização e concentração do leite, meio de crescimento usado na preparação da cultura láctica, tipo de cultura, termização e pasteurização, homogeneização, adição de cálcio, tipo de coagulante, firmeza do coágulo, tipo de tanque, sistema de manuseio da coalhada, lavagem da coalhada, proporção de sal adicionada, e perda de umidade durante a maturação (Lawrence, 1993).

De acordo com Furtado (1999), os fatores que influenciam no rendimento de fabricação podem ser divididos em dois grupos. Os fatores diretos compreendem a composição do leite, composição do queijo e perdas de gordura e proteína do leite para o soro durante o corte e agitação da coalhada. Os teores de proteínas e gordura no leite são fundamentais para o rendimento. O teor de umidade afeta de forma marcante o rendimento de fabricação do queijo, quanto maior a umidade, maior o rendimento. Entretanto, o valor elevado de umidade provoca reações como a aceleração da maturação, alteração na consistência do produto e diminuição de sua vida útil.

Dentre os fatores indiretos, estão à estocagem prolongada do leite cru em baixas temperaturas que pode acarretar mudanças físico-químicas na caseína micelar; o aumento da contagem de psicotróficos, microrganismos capazes de produzir lipases e proteases termorresistentes que podem degradar a gordura e as proteínas do leite. Outro fator que pode influenciar no rendimento é a mamite, uma doença infecciosa, em que ocorre um aumento das células somáticas no leite. O tipo de coalho, as condições de pasteurização do leite e perda de sais de cálcio durante o tratamento térmico do leite também podem interferir no rendimento em queijos (Furtado, 1999).

No processo de salga, o tempo de imersão e a concentração do sal podem variar com o tipo, forma e o peso do queijo. Furtado & Souza (1981) verificaram um aumento do teor de sal nas primeiras 12 horas de exposição do queijo, ocorrendo a maior perda total de peso do queijo. Após 48 horas de salga os teores de sal permaneceram estáveis.

Furtado, Souza & Munck (1979) verificaram perdas no rendimento do queijo Prato ao redor de 2% quando foi utilizada a salga por salmoura a 20%. Para minimizar a perda de peso, foi recomendada a adoção de banho de água gelada 24 h antes da salga por salmoura para obter um ganho de 1,72% no rendimento do queijo.

Barbano & Sherbon (1984) monitoraram quatro plantas de queijo Cheddar quanto ao seu rendimento e eficiência. Os autores verificaram que o baixo rendimento obtido teve por motivo a excessiva perda de gordura durante o processo de fabricação, baixo conteúdo de caseína no leite, baixa relação caseína:gordura e excessiva quebra mecânica da coalhada no tanque. Diferenças na eficiência foram observadas em razão dos diferentes estilos dos equipamentos e operações de fabricação do queijo. A média de recuperação de gordura encontrada nos queijos foi inferior a 93%, sendo este valor estimado para a gordura pela fórmula de Van Slyke.

O rendimento é afetado por muitos fatores em queijos de massa lavada como o Gouda. O teor de umidade do queijo é importante, bem como a perda de soro nas etapas de dessoragem e prensagem, e outros fatores adicionais que afetam o rendimento. Para Walstra, Noomen & Geurts (1999), esses fatores são:

- Variações sazonais: o rendimento é afetado pela composição do leite durante as estações do ano. Geralmente as variações podem se refletir nos teores de gordura e caseína do leite.
- Mastite: a presença de mastite leva a produção de leite com um conteúdo de caseína reduzido e conseqüentemente uma redução na razão caseína/nitrogênio total.
- Variações genéticas das proteínas do leite: estas afetam o rendimento porque a composição do leite está correlacionada com alguma variante genética, especialmente com a da  $\beta$ -lactoglobulina .
- Estocagem a frio do leite: redução no rendimento devido à diminuição da recuperação de gordura e proteína no queijo. Entretanto, há desacordo entre os estudos relatados sobre a extensão desse fator. O armazenamento do leite em baixas temperaturas leva a solubilização da caseína micelar e do fosfato de cálcio coloidal, aumentando o teor de caseína no soro. Também pode ocorrer hidrólise das caseínas solúveis pelas proteinases das bactérias psicrotóxicas ou das células somáticas e ou da plasmina, com aumento do nitrogênio não

protéico. As lipases podem atuar na gordura do leite, diminuindo a sua recuperação no queijo.

- Pasteurização do leite: o uso de alta temperatura durante o tratamento pode acarretar um aumento no rendimento em razão da desnaturação das proteínas do soro, mas comprometendo a qualidade do queijo.
- Tipo de coalho: diferenças na atividade proteolítica do coagulante influenciam no rendimento de fabricação dos queijos. Coalhos com elevada atividade proteolítica como os microbianos, resultam em redução de rendimento.
- Cultura láctica: A mudança na quantidade da cultura láctica induz a outras alterações. Na fabricação de queijos tipo Gouda, o uso de maior quantidade de fermento requer mais água durante a lavagem da massa, o que dilui o soro e reduz o rendimento. A maior acidificação promove um decréscimo do pH do leite e da massa, o que induz a maior desmineralização da massa, afetando a dessoragem e o rendimento do queijo.
- Cloreto de cálcio: a adição de  $\text{CaCl}_2$  ao leite provoca um acúmulo de fosfato de cálcio coloidal na micela, e tende a melhorar a sua coagulação.
- Lavagem da massa: o rendimento em queijo é influenciado pela quantidade de água adicionada a mistura da massa e soro durante o cozimento da massa. A substituição de 30-40% de soro pela água reduz o rendimento em torno de 0,5 a 1,0%.
- Salga: a absorção de sal provoca um ganho em peso no queijo, mas resulta em diminuição da umidade, com perda líquida de peso. A quantidade de sal absorvida varia de 1-3% e a perda de peso de 0,02 a 0,06 Kg/Kg de queijo produzido. Outras perdas estão na faixa de 1 a 3 g /Kg que incluem danos mecânicos durante a salga.

## **MATURAÇÃO DE QUEIJOS**

O processo de maturação do queijo compreende um conjunto de complexas modificações bioquímicas que incluem a proteólise, lipólise e o

metabolismo lactose/lactato (Farkye, 1995). Como resultado deste processo os principais componentes do queijo, como proteínas, lipídeos e lactose, são transformados em produtos primários e as modificações ocorridas nesses com maior ou menor intensidade levam aos produtos secundários. As reações primárias são responsáveis pela modificação de textura e de sabor durante o processo de maturação (Fox, 1998; Fox & McSweeney, 1996; Fox & Law, 1991). Dependendo da variedade do queijo maturado, os principais compostos que resultam dessas reações são os peptídeos, aminoácidos, aminas, ácidos, tióis, tioésteres de proteínas; ácidos graxos, metilcetonas, lactonas e ésteres de lipídios; ácidos orgânicos como, o láctico, acético e propiônico; dióxido de carbono, ésteres e álcoois da lactose. Estes compostos, em combinação e concentrações adequadas são responsáveis pelo sabor característico dos queijos (Fox, 1993). A maturação ocorre em condições de temperatura e umidade controladas, e nesta etapa, o produto adquire as características sensoriais que lhe são peculiares. As reações bioquímicas ocorridas durante a cura provocam alterações de sabor, odor, textura e consistência nos queijos novos, inicialmente insípidos e sem elasticidade, possibilitando obter um produto macio, com odor e sabor característicos (Van Dender et al., 1986). A extensão e o tipo de maturação dependem da temperatura e tempo de estocagem, da composição química do queijo (especialmente em termos de umidade e teor de sal), tipo e atividade de enzimas e microrganismos presentes (Farkye & Fox, 1990).

O teor de sal afeta a taxa de maturação dos queijos, retardando ou promovendo transformações bioquímicas (Pereira, 1975). O sal pode ter influência na etapa de maturação dos queijos exercendo as seguintes funções: promover a modificação direta do sabor dos queijos; auxiliar na sinérese do coágulo; influenciar na atividade da renina, nas enzimas endógenas do leite, na cultura láctica, nas bactérias e proteinases que não do fermento; controlar o crescimento de microrganismos desejáveis como os indesejáveis, selecionando a flora típica de cada variedade de queijo (Fox, 1987). Desta forma, a maturação de queijos é

um processo meticulosamente balanceado de degradação enzimática controlada, e um desbalanço pode levar a defeitos no sabor e textura do queijo (Visser, 1998).

A glicólise é catalisada por microrganismos do fermento láctico e/ou não do fermento, enquanto a lipólise e proteólise são catalisadas principalmente por enzimas do coagulante (quimosina e seus substitutos), da plasmina, enzimas das bactérias do fermento láctico, enzimas de bactérias do fermento secundário e enzimas das culturas secundárias (Fox, 1998).

### **Glicólise**

A fermentação da lactose em ácido láctico pelas bactérias lácticas do fermento é uma reação importante na fabricação de todas as variedades de queijos (Fox et al., 1996).

A concentração da lactose residual na coalhada depende do método de fabricação, do tipo e atividade do fermento e da concentração do sal na fase aquosa (Fox, Lucey & Cogan, 1990). A maior proporção de lactose presente no leite (cerca de 98%) é removida com o soro como lactose ou lactato ao final da fabricação, mas nos queijos frescos o teor de lactose residual pode variar de 1 a 2% (Fox, 1998).

A lactose presente na massa é metabolizada rapidamente a L- lactato por ação da cultura láctica nas primeiras 12 horas da etapa inicial da maturação (Fox, 1998). A atividade da cultura láctica e a sua capacidade em fermentar a lactose residual são influenciadas pela relação sal/umidade na massa. As bactérias que não pertencem ao fermento láctico (NSLAB) são mais resistentes ao sal do que as bactérias lácticas do *Lactococcus lactis ssp lactis* e *Lactococcus Lactis ssp cremoris* (Fox & McSweeney, 1996). A lactose residual da massa é convertida em L-Lactato pelo fermento quando a relação sal/umidade e a população das bactérias NSLAB é baixa. Quando a temperatura de estocagem for superior a normal e houver população elevada de bactérias NSLAB, ocorrerá a formação de D-lactato, parte ocasionada pela fermentação da lactose residual e parte por isomerização do L-lactato. Se a relação sal/umidade é elevada, a concentração

de lactose decresce lentamente e as mudanças do lactato são pouco relevantes (Fox et al., 2000; Fox & McSweeney, 1996).

Em queijos de massa lavada, como o Gouda, o teor de lactose na massa é cerca de 3%, mas decresce a níveis não detectáveis ao final do processo glicolítico nas primeiras 12 horas da etapa inicial da maturação (Fox et al., 2000). Nesses queijos, o L(+) - Lactato é isomerizado a D- lactato por ação das bactérias NSLAB, resultando em uma mistura racêmica, após três a quatro meses de cura. A velocidade da racemização é dependente da população de bactérias NSLAB, e não influencia o sabor do queijo. Quando a concentração de D-lactato for elevada, haverá formação de cristais de lactato devido a sua baixa solubilidade, e pontos brancos aparecerão sobre a superfície do queijo. Em queijo Gouda em que o tempo de maturação é curto, a quantidade de D-Lactato é relativamente baixa (Farkye & Fox, 1990).

A oxidação do lactato para acetato pode ocorrer no queijo e depende diretamente da concentração de O<sub>2</sub> e da população das bactérias NSLAB. A presença de O<sub>2</sub> é fortemente influenciada pela permeabilidade do material de embalagem aos gases (Fox, 1998).

A qualidade dos queijos é grandemente influenciada pela fermentação da lactose residual. Em queijos de massa lavada, a fermentação da lactose produz ácido láctico e pouco ácido acético com a redução do pH do queijo a 5,1 – 5,2. Ao final da fermentação (cerca de 10 horas) a concentração do ácido láctico no queijo fresco é de 3%, e parte deste ácido encontra-se não dissociado, com efeito bacteriostático maior com a diminuição do pH. As alterações de pH, juntamente com o teor de sal, inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis e auxiliam na formação de uma crosta protetora no queijo (Walstra, Noomen & Geurts, 1999).

O pH dos queijos de massa lavada pode aumentar durante a maturação, dependendo do conteúdo de lactose residual na massa do queijo. Nos queijos de massa lavada, em que parte do soro é substituída por água, ocorre remoção

parcial da lactose com a lavagem da massa e a lactose residual é metabolizada rápida e totalmente, ocorrendo depois um aumento do pH, em função de compostos resultantes da proteólise do queijo (Fox et al., 2000).

A presença de citrato no leite é de 1,80mg/L e, aproximadamente 90% deste é solúvel e perdido no soro. A concentração remanescente de citrato no queijo é aproximadamente três vezes mais que a do soro, mas esta proporção reflete a sua forma coloidal (Fox et al., 2000). O metabolismo do citrato é importante nos queijos elaborados com cultura mesofílica, como o Prato, sendo responsável pela formação de pequenas olhaduras no queijo. Culturas constituídas de *Lactococcus lactis subsp lactis* e *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactobacillus ssp* e *St. thermophilus* não metabolizam o citrato. Todavia, o citrato é metabolizado pelo *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* e *Leuconostoc spp* com produção de diacetil e CO<sub>2</sub>. A formação de CO<sub>2</sub> é responsável pelas olhaduras características em queijo tipo Suíço (Walstra, Noomen & Geurts, 1999; Fox & McSweeney, 1996).

### **Lipólise**

A lipólise é um evento limitado a poucas variedades de queijos, provavelmente por utilização de leite cru na fabricação e período prolongado de estocagem refrigerada (Fox, 1998). Em queijo como o Gouda, Cheddar e Suíço a lipólise é geralmente baixa, mas é extensiva em queijos maturados por fungos e em algumas variedades italianas de queijo duro. Nos queijos de massa lavada, a lipólise é limitada e ocorre caso seja desejada. A ausência desse evento está relacionada a qualidade bacteriológica do leite que é submetido a termização ou a pasteurização e a ausência de crescimento microbiano na superfície do queijo durante a maturação. Contudo, em condições controladas de fabricação a lipólise pode ocorrer e é resultante da ação das lipases das bactérias lácticas do fermento e, possivelmente, lipases termorresistentes de organismos psicrotóxicos (Walstra, Noomen & Geurts, 1999). As enzimas atuam sobre os triglicerídeos, produzindo ácidos graxos a partir de mono e diglicerídeos formados por ação das lipases do leite e/ou outras lipases microbianas. A lipólise nos queijos é

influenciada pelo aumento de temperatura, população elevada de bactérias psicrotóricas e homogeneização do leite (Walstra, Noomen & Geurts, 1999).

### **Proteólise**

Dos processos bioquímicos envolvidos durante a maturação de queijos, a proteólise é a mais complexa e, possivelmente a mais importante para o desenvolvimento das características sensoriais dos queijos (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Fox, 1998; Fernández & Fox, 1998; Farkye, 1995; Visser, 1993; Fox, 1989; Lawrence, Creamer, & Gilles 1987). A proteólise é a responsável direta pelas modificações de textura no queijo e contribui significativamente no desenvolvimento do sabor (Fox, 1998). Durante a maturação, as caseínas são hidrolisadas através da ação de várias enzimas proteolíticas, cuja atuação depende do ambiente físico-químico que é específico para cada tipo de queijo (Boutrou & Gagnaire, 2001). Neste processo, a caseína é hidrolisada a peptídeos de elevado, médio e baixo peso molecular, e por último, em aminoácidos, amidas e amônia (Farkye, 1995). O catabolismo de aminoácidos conduz a compostos sápidos e aromáticos que são os maiores responsáveis pelo sabor dos queijos (Fox, 1998).

A proteólise contribui para as modificações ocorridas na textura dos queijos através da quebra da rede protéica, com diminuição da atividade de água e formação de novas ligações da água com grupos carboxila e amino liberados, e com o aumento do pH (principalmente para variedades de queijos maturados com fungos), facilitando a liberação de compostos sápidos durante a mastigação. Sua contribuição direta para o sabor ocorre mediante a formação de peptídeos e aminoácidos livres, assim como a liberação de substratos (aminoácidos) para reações de transaminação, deaminação, descarboxilação, dessulfuração, catabolismo de aminoácidos aromáticos e reações de aminoácidos com outros compostos (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001).

A hidrólise inicial da caseína é catalisada pela atividade residual do coagulante na massa, com menor atuação da plasmina, e talvez da catépsina D e

de proteinases das células somáticas, ocorrendo a formação de peptídeos de alto e médio peso molecular. Os produtos formados continuam a ser degradados pelo coagulante e sofrem a ação das proteinases do fermento láctico e da microflora presente no queijo. A produção de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres é resultante da ação das proteinases e peptidases das bactérias lácticas sobre os peptídeos de alto e médio peso moleculares produzidos a partir da hidrólise da  $\alpha_{S1}$ -caseína pela quimosina ou da  $\beta$ -caseína pela plasmina (Fox & McSweeney, 1996).

A velocidade e a extensão da proteólise durante a maturação são determinadas pelo tipo e atividade das enzimas proteolíticas presentes, como atividade residual do coalho, plasmina, sistema proteases/peptidases a partir do fermento e de bactérias não fermentativas. A composição química do queijo em termos de pH, conteúdo de sal e umidade influencia a proteólise. Adicionalmente, a estrutura e o acesso a vários sítios de clivagem da caseína na matriz do queijo determinam a velocidade e a extensão da proteólise (Farkye, 1995).

Nos queijos maturados, o processo proteolítico pode variar em função do tipo de queijo devido às diferenças na tecnologia de fabricação. Nas variedades de queijos de massa lavada, a proteólise ocorre principalmente por ação do coagulante e das enzimas do fermento láctico, com menor atuação da plasmina, proteinase nativa do leite. A atividade proteolítica do coagulante é função da quantidade de coagulante ativo remanescente na massa. O nível de coagulante residual é dependente da quantidade do coagulante utilizado na fabricação, do pH do queijo e da temperatura de cozimento da massa durante o processamento. Em pH baixo, mais quimosina se encontra associada com a paracaseína. Entretanto, quando o cozimento da massa ocorrer em temperaturas elevadas menor será o teor de coalho residual. A proteólise em queijo de massa lavada também sofre influência da composição e quantidade do fermento láctico, da velocidade de acidificação e do pH inicial do queijo (Walstra, Noomen & Geurts, 1999).

## Agentes proteolíticos

A proteólise, como modificação bioquímica mais complexa da maturação é causada por agentes proteolíticos originários de várias fontes. A função dos agentes proteolíticos é hidrolisar a paracaseína em peptídeos e aminoácidos (Guinee & Wilkinson, 1992). Esta atividade nos queijos durante a maturação é influenciada pelo sistema de proteinases e peptidases do coagulante residual, das enzimas endógenas do leite, do fermento láctico, bactérias lácticas que não do fermento (NSLAB), e culturas lácticas secundárias, como por exemplo bactérias propiônicas, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Penicillium* ssp. (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Fox, 1998). Lawrence, Creamer & Gilles (1987) atribuem a atividade proteolítica nos queijos ao teor de coalho residual, presença das enzimas nativas do leite, razão sal/umidade, temperatura de maturação, tipo de coagulante e modificações de pH durante a cura. Na maioria dos queijos, a caseína é hidrolisada inicialmente pelo coagulante com menor participação da plasmina, resultando na formação de peptídeos de elevado e médio peso molecular, que posteriormente são degradados pelo coagulante residual e enzimas a partir da cultura láctica e microflora não do fermento (NSLAB) no queijo. Os peptídeos de baixo peso molecular são formados com a contribuição das proteinases do fermento láctico, mediante hidrólise dos peptídeos de alto peso molecular produzidos a partir da  $\alpha_{S1}$ -caseína pela quimosina ou da  $\beta$ -caseína pela plasmina (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001).

A presença do coagulante residual tem contribuição relevante na proteólise e sua retenção na massa é responsável pela proteólise primária do queijo. Na fabricação de queijo cerca de 6% do coagulante adicionado ao leite é retido no queijo (Fox, 1998). Muito da atividade do coagulante adicionado ao leite é perdida no soro, e menos de 10% de sua atividade é retida no queijo (Farkye, 1995). A atividade residual é dependente do tipo de enzima coagulante, das condições de fabricação, como por exemplo o pH do leite e temperatura de cozimento da massa, e do conteúdo final de umidade e variedade dos queijos (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Farkye, 1995). Com relação ao pH, a quimosina, pepsina

bovina e suína são ativas em pH reduzido (Fox, 1998; Farkye, 1995). Embora as pepsinas sejam mais sensíveis a desnaturação pelo pH do que a quimosina, a sua retenção na massa é dependente do pH do leite antes e após a coagulação (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Fox, & McSweeney, 1996). A retenção das proteases do *Rhizomucor miehei* e *R. pusillus* no queijo é independente do pH (Fox, 1998; Lawrence et al., 1987).

A estabilidade ao calor da renina é dependente da temperatura de cozimento da massa com efeito sobre sua atividade residual. Em queijos, de massa cozida com temperaturas ao redor de 52°C, a quimosina é desnaturada com perda da atividade residual, entretanto, em queijos com baixa temperatura de cozimento, como o Gouda, a quimosina apresenta considerável atividade residual (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Farkye, 1995). Já, as proteinases do *Rhizomucor miehei* e *Rhizomucor pusillus* são mais termoestáveis do que a quimosina (Guinee & Wilkinson, 1992). Durante o processo proteolítico da maturação dos queijos ocorre a hidrólise da  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  e  $\beta$ -caseína. A ação primária da quimosina sobre a  $\alpha_{S1}$ -caseína é na ligação Phe<sub>23</sub> - Phe<sub>24</sub>, e sua especificidade sobre a  $\alpha_{S1}$ -caseína no queijo tem um comportamento similar ao da  $\alpha_{S1}$ -caseína em solução a pH 5,2 e a 5% de NaCl, exceção à ligação Trp<sub>164</sub> - Tyr<sub>165</sub>, que é a segunda ligação da  $\alpha_{S1}$ -caseína mais susceptível quando em solução, mas não é hidrolisada no queijo (FOX, 1998). Em queijos de massa lavada, a  $\alpha_{S1}$ -caseína é degradada nas frações fl-23 e fl24-199, sendo que o último peptídeo é denominado de  $\alpha_{S1}$  - I, que é parcialmente hidrolisado a Leu<sub>101</sub> - Lys<sub>102</sub> e provavelmente Trp<sub>164</sub> - Tyr<sub>165</sub>. A fração da  $\alpha_{S1}$ -caseína fl -23 não é acumulada no queijo, sendo degradada por ação da proteinase associada à parede celular do fermento, liberando as frações fl-9 e fl-23 e outros peptídeos. A quimosina não é muito ativa sobre a  $\alpha_{S2}$ -caseína em solução, e a sua atuação sobre esta proteína no queijo não está clara (FOX, 1998). Segundo Fox & McSweeney (1996), a  $\alpha_{S2}$ -caseína apresenta resistência à hidrólise pela quimosina, e os sítios de clivagem estão restritos a regiões hidrofóbicas da molécula, nas ligações Phe<sub>88</sub>-Tyr<sub>89</sub>, Tyr<sub>95</sub>-Leu<sub>96</sub>, Gln<sub>97</sub>-Tyr<sub>98</sub>, Tyr<sub>98</sub>-Leu<sub>99</sub>, Phe<sub>163</sub>-Leu<sub>164</sub>, Phe<sub>174</sub>-Ala<sub>175</sub>, Tyr<sub>179</sub>-Leu<sub>180</sub>. O sítio

da ligação Leu<sub>192</sub>-Tyr<sub>193</sub> da  $\beta$ - caseína em solução é muito susceptível a clivagem, mas no queijo requer condições de baixa concentração iônica para sua hidrólise (Ardö, 2001).

A especificidade das proteinases de origem microbiana sobre a  $\alpha_{S1}$  - caseína e a  $\beta$ - caseína é diferente da quimosina. As ligações Phe<sub>23</sub>- Phe<sub>24</sub>, Met<sub>123</sub>-Lys<sub>124</sub>, e Try<sub>165</sub>-Try<sub>166</sub> são os sítios de clivagem das proteases do *R.miehei* sobre a  $\alpha_{S1}$  - caseína em solução. Enquanto para a  $\beta$ - caseína, os centros ativos são as ligações Glu<sub>31</sub>-Lys<sub>32</sub>, Val<sub>58</sub>-Val<sub>59</sub>, Met<sub>93</sub>-Gly<sub>94</sub>, Phe<sub>190</sub>- Leu<sub>191</sub>. A quimosina obtida por fermentação tem especificidade similar a quimosina do coalho de vitelo, não tendo sido observado diferenças marcantes no perfil proteolítico dos queijos elaborados com coalho de vitelo e quimosina obtida por fermentação (Fox, 1998).

A plasmina (E.C. 3.4.21.7) é a proteinase nativa mais importante do leite, enquanto catepsina D e outras enzimas endógenas são pouco significativas (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Fox, 1998; Visser, 1998; Lawrence et al., 1987). Esta enzima é uma serina protease com pH ótimo de aproximadamente 7,5; no leite fresco, encontra-se associada com a micela de caseína, mas dissocia-se com a diminuição do pH (Fox, 1998; Lawrence et al., 1987). Esta protease tem especificidade por ligações contendo lisina e arginina, e age sobre a  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  e  $\beta$ - caseína, sendo a última a mais susceptível. A plasmina ataca a  $\beta$ - caseína nas ligações Lys<sub>28</sub>- Lys<sub>29</sub>; Lys<sub>105</sub>- His<sub>106</sub> ; Lys<sub>107</sub> – Glu<sub>108</sub> . A  $\alpha_{S2}$ - caseína, em solução, apresenta 8 sítios susceptíveis à hidrólise pela plasmina. A  $\kappa$ - caseína, apesar de possuir resíduos de lisina e arginina, é resistente à ação da plasmina (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001). A catepsina D, outra enzima endógena do leite, ocorre em menor concentração do que a plasmina e é termoinstável. Sua especificidade é similar à quimosina, porém não tem função proteolítica em produtos lácteos preparados a partir do leite pasteurizado (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Fox, 1998). Outras enzimas do leite, como a elastase e a catepsina B não estão bem caracterizadas e apresentam baixa concentração no leite (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001).

As culturas lácticas utilizadas na fabricação de queijos incluem espécies mesofílicas de *Lactococcus* e *Leuconostoc*, e espécies termofílicas de *Lactobacillus* e *Streptococcus* cuja função consiste na produção de ácido láctico e conseqüente diminuição do pH. As bactérias ácido lácticas (LAB) são fracamente proteolíticas, porém apresentam um sistema proteolítico (proteínase/ peptidase) capaz de hidrolisar oligopeptídeos em peptídeos menores e aminoácidos. O sistema proteolítico das LAB encontra-se bem caracterizado em níveis fisiológicos, bioquímicos e genéticos (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Fox, 1998; Fox & McSweeney, 1996). O sistema proteolítico das bactérias lácticas do *Lactococcus* tem ação hidrolítica sobre a caseína liberando oligopeptídeos e aminoácidos livres (Fox & McSweeney, 1996).

Em muitas variedades de queijos, a população da cultura láctica diminui durante a maturação e a população de bactérias lácticas que não são do fermento láctico, inicialmente pequena, pode aumentar. Este crescimento depende da diminuição da população do fermento láctico, podendo ocorrer o domínio das bactérias lácticas que não são do fermento (NSLAB) no período de cura. Cepas peptidolíticas de NSLAB são consideradas como adjuntas na fabricação de queijos, podendo melhorar o perfil e acelerar a velocidade de formação do sabor (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001).

Em queijos de massa lavada, a proteólise ocorre por ação da atividade residual da renina, especialmente a quimosina, formando a maior parte das substâncias nitrogenadas solúveis, com a liberação de peptídeos de alto e médio peso molecular e baixa quantidade de aminoácidos. A  $\alpha_{S1}$ -caseína é degradada rapidamente durante a maturação. A  $\beta$ -caseína é hidrolisada mais lentamente e tem um teor remanescente de 50% após seis meses. A hidrólise rápida da  $\alpha_{S1}$ -caseína é favorecida pelo pH do queijo e pela proximidade do pH ótimo de atuação da renina, bem como o conteúdo de sal, ao redor de 4% na fase aquosa do queijo. Já a degradação lenta da  $\beta$ -caseína é favorecida pela baixa concentração de sal (Walstra, Noomen & Geurts, 1999).

A atividade proteolítica do fermento láctico somente se manifesta depois de várias semanas de maturação, após liberação de peptídeos de médio e baixo peso molecular e aminoácidos. Walstra, Noomen & Geurts (1999) relatam que as enzimas podem atuar de forma recíproca através da estimulação ou inibição dos sistemas enzimáticos nos queijos.

### **Avaliação da proteólise**

A proteólise, como índice de maturação envolve a caracterização, separação e quantificação dos compostos nitrogenados do queijo durante a maturação. A fração nitrogenada pode ser caracterizada pelo teor de componentes solúveis e insolúveis, pelo fracionamento dos componentes solúveis e insolúveis e quantificação pelo método Kjeldahl ou por métodos espectrofotométricos. Os métodos cromatográficos e de eletroforese são freqüentemente utilizados para caracterizar os peptídeos formados durante a maturação.

A proteólise pode ser medida através dos índices denominados índice de extensão e índice de profundidade. O índice de extensão é caracterizado pelo teor de substâncias nitrogenadas solúveis acumuladas durante o processo e expresso como porcentagem do nitrogênio total. A determinação analítica baseia-se na precipitação isoelétrica da caseína a pH menor que 4,6 em uma amostra de queijo e a quantificação das substâncias solúveis pode ser efetuada pelo método de Kjeldahl. A solubilidade em água, a pH 4,6, é freqüentemente utilizada para o fracionamento inicial do nitrogênio como índice da extensão de proteólise devido à ação do coagulante e da plasmina. O extrato nitrogenado pode ser quantificado pelo método de Kjeldahl ou por métodos espectrofotométricos, reação com a ninhidrina ou com ácido trinitrobenzenosulfônico – TNBS (Farkye & Fox, 1990).

O índice de profundidade da proteólise, relaciona as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular acumuladas durante o processo, tendo como componentes os aminoácidos, oligopeptídeos, aminas, entre outros, e pode ser quantificado pelo teor de nitrogênio não protéico (NPN), medido pelo nitrogênio solúvel em TCA 12% e também por determinação direta de aminoácidos.

Dados experimentais demonstram que o queijo tipo Minas, padronizado, curado, após 3 semanas, apresentou índices de proteólises similares ao queijo Prato de 35 dias de maturação; enquanto que o queijo Gouda, com 1 a 2 meses de maturação apresentou índices superiores ao queijo tipo Prato brasileiro (Wolfschoon - Pombo, 1983).

## **GOSTO AMARGO EM QUEIJO PRATO**

O desenvolvimento do gosto amargo em queijos é relatado como um defeito em diferentes variedades de queijos (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Frister et al., 2000; Habibi-Najafi & Lee, 1996). Este defeito sensorial é uma possível consequência da proteólise, e dependente de um conjunto de parâmetros durante a proteólise primária e secundária da caseína no processo de fabricação de queijos (Frister et al., 2000), sendo um dos problemas mais complexos que podem surgir durante a maturação ou estocagem de queijos.

Durante o processo de cura é que ocorrem as reações de transformações que convertem um queijo insípido em um queijo com as características de sabor desejáveis para cada variedade. Nesta etapa, a proteólise ocorre pela degradação da caseína em peptídeos menores e aminoácidos, além de compostos que contribuem para o gosto e odor do queijo (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001). O gosto amargo é resultado da formação e, sobretudo, do acúmulo de peptídeos hidrofóbicos de baixo peso molecular, durante o processo de maturação do queijo. Estes peptídeos apresentam entre dois e 27 resíduos de aminoácidos com elevado nível de hidrofobicidade. O desenvolvimento do gosto amargo é determinado pela razão de produção e hidrólise destes peptídeos (Steele, 1995).

Os peptídeos amargos são formados por ação do coagulante e proteinases da cultura láctica sobre certas regiões hidrofóbicas da caseína que, acumulados em concentração excessiva ou originária de degradação inadequada de enzimas microbianas, produzem o amargor (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Fox, 1998; Furtado, 1996; Visser, 1993; Schmidt, 1990). Determinadas seqüências nas

caseínas são hidrofóbicas e, quando clivadas por proteinases, podem levar ao amargor. Os resíduos 14 – 34, 91 - 101 e 143 - 151 da  $\alpha_{S1}$ - caseína originam peptídeos amargos, enquanto a região do carbono terminal da  $\beta$ -caseína é especialmente hidrofóbica (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001; Fox, 1998). A especificidade das proteinases pelo substrato e também a cepa de fermento utilizado, determinam o teor de peptídeos amargos formados (Visser, 1993).

Diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento do sabor amargo. Dentre estes, o tipo e atividade residual do coagulante na massa, que são influenciados pelo teor de sal e pH. A cultura láctica pode causar amargor, e certas cepas de *Lactococcus* são conhecidas por essa tendência (Fox, 1998). Os peptídeos amargos também são produzidos mediante ação das proteinases e acumulados no queijo em razão da ausência de peptidases.

O sistema de proteinases *Lactococcal*, conhecido como CEP (cell envelope proteinase), é responsável pela hidrólise dos oligopeptídeos produzidos a partir da  $\alpha_{S1}$  e da  $\beta$ -caseína pela quimosina e plasmina em peptídeos menores (Fox, 1998). O teor de sal tende a diminuir o amargor inibindo o sistema CEP, promovendo uma agregação de peptídeos maiores e não amargos das regiões hidrofóbicas da caseína, como a região do C-terminal da  $\beta$ -caseína, que poderiam ser degradados em peptídeos amargos (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001).

A adição de proteinases para acelerar a maturação pode levar ao aparecimento do gosto amargo, enquanto a adição de peptidases pode resultar na redução da intensidade do amargo. Queijos com baixo teor de gordura são susceptíveis ao desenvolvimento do amargo em relação aos integrais, talvez porque os peptídeos hidrofóbicos e amargos são menos perceptíveis devido a sua partição na fase lipídica. Além dos peptídeos, numerosos compostos podem contribuir para o amargor nos queijos, incluindo aminoácidos, aminas, amidas, amidas substituídas, cetonas de elevado peso molecular e alguns monoglicerídeos (Sousa, Ardö, & McSweeney, 2001).

Em queijo Gouda, o gosto amargo desenvolvido se deve ao lento acúmulo de peptídeos amargos, os quais são formados pela ação residual da enzima coagulante e endopeptidases sobre a  $\beta$ -caseína (Visser, 1993). Queijos como Prato, Gouda e similares são mais susceptíveis de apresentar gosto amargo já que não são submetidos à maturação por períodos prolongados (Furtado, 1993). Desta forma, o gosto amargo em queijos, é um efeito complexo e, para minimizar a presença deste defeito, algumas soluções podem ser utilizadas como controle da matéria-prima, ingredientes, processos e parâmetros de fabricação (Furtado, 1996).

## **TEXTURA EM QUEIJO PRATO**

A textura é um importante atributo de qualidade influenciando a aceitação do alimento pelo consumidor (Szczeniak, 1998). A textura ou corpo é uma característica relevante na determinação da identidade e qualidade de queijos, interferindo na preferência do consumidor pela variedade específica (Antonίου et al., 2000; Creamer & Olson, 1982). Essa propriedade é claramente diferente para cada tipo de queijo. Primeiramente, o consumidor identifica e julga uma variedade de queijo pela aparência, a presença ou ausência de olhaduras e a sensação bucal, características que são percebidas antes da determinação do sabor (Lawrence, Creamer & Gilles, 1987). Em queijos de massa lavada, as olhaduras estão entre as características de textura.

Os três maiores constituintes dos queijos: caseína, gordura e água contribuem para a estrutura e textura. As caseínas formam uma malha aberta em que os glóbulos de gordura estão incorporados, e enquanto parte da água encontra-se ligada à proteína, outra parte contém solutos preenchendo os interstícios. A natureza sólida do queijo é determinada pela matriz da para-caseína, que consiste de cadeias de estrutura tridimensional agregadas e parcialmente fundidas. A rede resultante é uma matriz de natureza viscoelástica (Konstance & Holsinger, 1992; Visser, 1991), que sofre variações na textura e

sensação bucal, fatores perceptíveis considerados de importância pelo consumidor. A composição do leite utilizado é também um fator determinante nas características do produto final (Jack & Paterson, 1992). Assim, a textura é definida como a manifestação sensorial e funcional das propriedades mecânicas e estruturais dos alimentos percebidas através dos sentidos da visão, audição, tato e propriedades cinestésicas (Szczeniak, 2002). As propriedades mecânicas são manifestadas pela reação do alimento quando submetido a uma pressão, como por exemplo, na mastigação e a resistência ao corte. Essas propriedades envolvem as características de dureza, coesividade, viscosidade, elasticidade, mastigabilidade, fraturabilidade e gomosidade.

As propriedades geométricas estão associadas com a forma, distribuição e orientação das partículas no interior do alimento, e percebidas no queijo através de características como, por exemplo, a granulosidade e fibrosidade (Szczeniak, 1991). Outras propriedades como a untuosidade, oleosidade, suculência são características que podem contribuir para a textura do queijo (Fox et al., 2000).

### **Fatores que influenciam a textura do queijo**

A rede protéica do queijo é inicialmente formada a partir da  $\alpha_{S1}$ -caseína, em que as cadeias helicoidais formam células que incorporam os glóbulos de gordura. O resultado é uma matriz flexível, cuja dimensão é dependente do tamanho dos glóbulos de gordura do leite. A razão de gordura e proteína no leite é importante, pois o aumento do teor de gordura e água tende a enfraquecer a estrutura protéica, enquanto sua diminuição resulta no endurecimento do queijo. Assim, produtos com alto teor de gordura apresentam menor firmeza e corpo elástico, só que a firmeza é proporcional ao conteúdo de caseína (Jack & Paterson, 1992; Adda, Gripon, & Vassal, 1982). A quantidade de gordura no interior da rede e sua interação com a matriz protéica influenciam o comportamento reológico do queijo e esse efeito é dependente da temperatura (Visser, 1991).

O conteúdo de água constitui um fator importante para a textura (Adda, Gripon, & Vassal, 1982). No queijo, a água serve para lubrificar o movimento da

caseína em relação a gordura. Assim, o aumento do teor de umidade reduz a resistência, e aumenta a recuperação desta deformação. O conteúdo de água é conhecido por ser um fator que influencia o mecanismo de fratura, tanto na mordida como na mastigação (Jack & Paterson, 1992). A umidade está relacionada aos termos de classificação dos queijos pela dureza, e vinculados diretamente a sua firmeza (Visser, 1991). As condições de fabricação afetam o teor de umidade, mas a perda por evaporação durante a maturação pode afetar a consistência dos queijos. (Adda, Gripon, & Vassal, 1982).

O teor de sal pode interferir na textura ao cristalizar-se na matriz do queijo (Jack & Paterson, 1992), contribuindo indiretamente nas propriedades reológicas do queijo através de sua influencia no conteúdo de umidade. No processo de salga durante a fabricação de queijos duros e semiduros, ocorre a difusão do sal para o interior do queijo de forma lenta, e ao mesmo tempo o teor de umidade se reduz. Entretanto, a parte central do queijo apresenta maior umidade e menor concentração de sal, sendo mais susceptível à proteólise do que a região próxima à borda (Visser, 1991).

As condições de fabricação contribuem para modificações de textura. O leite acidificado é coagulado utilizando uma enzima, a massa resultante é dividida e tratada a uma temperatura determinada. O soro é drenado, a massa sofre o corte, enformagem, salga e então é embalada originando o queijo. A produção do ácido pela cultura continua através do processo, sendo sua atividade inibida pelo sal. A divisão e o tamanho do grão, tempo e temperatura de agitação da massa e temperatura de cozimento, influem no conteúdo de água e na textura dos queijos (Jack & Paterson, 1992). A reação básica na fabricação de queijo é a produção de ácido láctico pelo fermento, causando diminuição do pH a um valor que irá determinar a futura formação da textura do queijo (Adda, Gripon, & Vassal, 1982). A diminuição do pH leva a perda de fosfato de cálcio coloidal a partir das submicelas de caseína, e em pH inferior a 5,5 pode ocorrer uma dissociação progressiva das submicelas em pequenos agregados de caseína (Lawrence,

Creamer & Gilles, 1987). Há um enfraquecimento das ligações de cálcio e uma diminuição da repulsão eletrostática com a diminuição do pH.

Em queijos de massa lavada, os principais fatores que afetam a textura são o conteúdo de umidade, a extensão da proteólise, valor de pH, conteúdo de sal e gordura (Walstra, Noomen & Geurts, 1999).

A estrutura protéica dos queijos novos é constituída por uma rede moléculas de  $\alpha_{S1}$ -caseína que é alterada na maturação (Creamer & Olson, 1982). Este processo é influenciado pelo tamanho e forma do queijo, condições temperatura e umidade na cura, natureza e quantidade de renina adicionada, e as bactérias e enzimas presentes no leite (Jack & Paterson, 1992). As mudanças de textura no queijo ocorrem nas primeiras semanas de cura. Inicialmente, o coagulante hidrolisa a ligação Phe<sub>23</sub>- Phe<sub>24</sub> da  $\alpha_{S1}$ -caseína formando  $\alpha_{S1} - I$  - caseína e outras caseínas resultando no enfraquecimento da rede protéica (Lane et al., 1997). Na segunda fase, as mudanças são mais lentas e dependem da velocidade da proteólise. Os fatores interferentes são os níveis de renina residual, a plasmina, o conteúdo de sal e umidade (Lawrence, Creamer & Gilles, 1987). Esses parâmetros contribuem para o rompimento da rede estrutural da caseína, diminuindo assim a firmeza e a força requerida para fratura (Visser, 1991).

A firmeza está diretamente relacionada à quantidade de  $\alpha_{S1}$ -caseína não hidrolisada e à menor dissolução dos produtos de degradação protéica. Visto que, a cada ligação peptídica clivada, dois novos grupos iônicos são gerados, há uma redução da quantidade de água livre na matriz pelo aumento da solvatação das cadeias protéicas (Lawrence, Creamer & Gilles, 1987). Em queijos de baixa umidade, a dureza tende a aumentar com o tempo, sendo mais resistente à deformação. A matriz protéica torna-se menos coesiva e o queijo derrete-se prontamente. Desta forma, a heterogeneidade apresentada na textura é resultante dos processos decorrentes e procedimentos empregados na secagem e viragem dos queijos durante a maturação (Jack & Paterson, 1992).

## **Avaliação da textura em queijo**

A textura pode ser avaliada de muitas formas para determinar as diversas propriedades. Assim, técnicas objetivas e subjetivas de análise de textura têm sido aplicadas para avaliar a estrutura do alimento, como parte do controle de qualidade de produtos acabados e no desenvolvimento de novos produtos (Smewing, 2000).

Tradicionalmente, a textura tem sido determinada subjetivamente através de um painel sensorial treinado. A desvantagem desses procedimentos é que são dispendiosos, não muito reprodutíveis, e apresentam dificuldades para descrever e definir os termos característicos das propriedades. Em razão dessas limitações, métodos objetivos de análise instrumental de textura para o queijo foram desenvolvidos.

A avaliação da qualidade sensorial através dos métodos instrumentais é difícil, uma vez que requer-se procedimento capaz de imitar a mastigação do alimento. Contudo, as propriedades reológicas dos alimentos podem ser determinadas facilmente por métodos instrumentais (Fox & McSweeney, 1996). Diferentes métodos instrumentais têm sido utilizados para avaliar as características de textura de alimento (Meullenet et al., 1998), desde sistemas automatizados de testes, análises de perfil de textura, e uma variedade de técnicas e instrumentos têm sido desenvolvidas para determinação dos parâmetros de textura (Lee, Imoto & Rha, 1978). Correlações entre as medidas instrumentais e a percepção sensorial são utilizadas para determinar relações entre os métodos de avaliação (Meullenet et al., 1998; Fox et al., 1996).

## **Medidas Sensoriais da Textura**

A textura do queijo é um atributo sensorial, e como tal pode ser determinada através de métodos sensoriais. Esse atributo sensorial juntamente com o aroma e o gosto é relevante na aceitação de um alimento pelo consumidor. Em queijos, esta característica determina sua identidade (Antoniou et al., 2000). O objetivo da avaliação da textura através das medidas sensoriais é traduzir todas

as manifestações percebidas através dos sentidos da visão, audição, tato e da sensação bucal e transformá-las em dados mensuráveis (Fox et al., 2000).

A percepção da textura é um processo descritivo durante a ação dinâmica da mastigação, onde há uma troca contínua nas propriedades físicas do alimento devido à desintegração da estrutura ocasionada por forças da mastigação, umidade e diluição com saliva (Szczesniak, 1991). Segundo Jack, Paterson & Piggott (1995), os métodos sensoriais de textura são classificados em: métodos de atributos de textura, de diferença e de preferência. Dentre os métodos dos atributos estão o perfil de textura, a análise descritiva e o perfil de livre escolha (FCP).

O método do perfil de textura compreende a descrição e classificação das sensações perceptíveis das características de textura. A análise do perfil de textura (TPA) pode ser aplicada para medidas sensorial (Brandt, Skinner & Coleman, 1963) como instrumental (Bourne, 1978; Szczesniack, Brandt & Friedman, 1963). A análise da textura está baseada nas características mecânicas, geométricas e as percepções relacionadas ao conteúdo de gordura e umidade do alimento (Fox, et al., 2000). Os termos de classificação e as definições das características mecânicas de textura foram proposta por Szczesniak (1963) e compreendem:

**Parâmetros primários:**

- Dureza: é a força requerida para comprimir o queijo entre o dente molar.
- Coesividade: é a proporção pela qual um queijo pode ser deformado antes da ruptura;
- Elasticidade: é o grau de recuperação de uma parte deformada do queijo após a remoção da força de deformação.
- Adesividade: é a força requerida para remoção do queijo que adere ao palato durante o processo de mastigação.

### **Parâmetros secundários;**

- Fraturabilidade: é a força pela qual um queijo desintegra, despedaça, racha ou quebra quando deformado.
- Mastigabilidade: é o número de mastigadas requeridas para mastigar um queijo pronto para ser engolido.
- Gomosidade: é a energia requerida para desintegrar um pedaço de queijo pronto para ser engolido.

A avaliação do perfil de textura sensorial compreende várias etapas na análise do alimento, desde a visualização, sensação a primeira mordida, a mastigação, deglutição e a sensação residual. Szczesniack, Brandt & Friedman (1963), elaboraram escalas padrão de pontuação para os parâmetros mecânicos de textura, que são utilizadas para seleção e treinamento de uma equipe sensorial. Cada ponto da escala foi definido usando-se uma amostra padrão de referência (Szczesniak, 2002). Posteriormente, modificações e escalas adicionais foram desenvolvidas por Muñoz (1986). Desta forma, uma descrição adequada dos atributos do queijo pode ser obtida através de uma equipe sensorial treinada mediante a utilização de uma escala de nove pontos (Jack & Paterson, 1992).

Na análise de textura em queijos, as amostras devem ser padronizadas quanto ao tamanho e a sua temperatura, tendo em vista que a temperatura afeta as propriedades físicas do queijo, enquanto nas determinações de dureza e mastigabilidade é relevante a uniformidade na porção da amostra (Jack & Paterson, 1992).

A análise descritiva foi desenvolvida para aumentar a caracterização e a percepção de atributos sensoriais de um alimento de forma quantitativa (Stone & Sidel, 1998; Stone et al., 1974). Na análise descritiva de textura, inicialmente os atributos são identificados e discutidos entre os painelistas após exposição de uma série de queijos. Os julgadores são treinados a usar um vocabulário de consenso para o perfil dos queijos, e a percepção da intensidade do atributo assinalada com um traço em uma escala não estruturada (Jack & Paterson, 1992).

Em queijos, a análise descritiva quantitativa tende a ser um método para determinar a qualidade desses produtos (Stone & Sidel, 1998).

O perfil de livre escolha é similar a análise descritiva quantitativa, porém os conceitos sensoriais são propostos pelo avaliador, que quantifica a intensidade de um atributo designando um ponto numa escala linear (Fox et al., 2000).

### **Medidas Instrumentais da Textura**

A textura é um fator crítico na avaliação da qualidade de queijos. Numerosos estudos têm confirmado que este atributo bem como o sabor afetam a percepção do consumidor quanto à aceitação e qualidade. Enquanto, a avaliação sensorial da textura requer extensivo treinamento dos julgadores, as medidas instrumentais têm sido a escolha de rotina para as determinações de textura (Drake et al., 1999).

A análise descritiva quantitativa, apesar de resultados claros é um método laborioso, com grande tempo dispensado na seleção e treinamento dos provadores e análise dos dados. Assim, métodos instrumentais de avaliação de textura têm sido sugeridos, pois são facilmente calibrados, menos trabalhosos, e mostram menor propensão para impulso e fadiga do que os métodos sensoriais. Entretanto, os instrumentos são incapazes de prever a aceitação para os consumidores ou fazer determinações das propriedades sensoriais mais complexas como são avaliadas pelos indivíduos. Apesar desses impedimentos, os instrumentos podem fazer uma quantificação empírica dos parâmetros de textura, oferecendo maior ou menor relação com a qualidade sensorial e a preferência do consumidor (Jack & Paterson, 1992). Diversos instrumentos têm sido avaliados para medidas objetivas das características de textura visando substituir as avaliações subjetivas.

O queijo apresenta natureza heterogênea (Jack & Paterson, 1992) e diferentes testes têm sido usados para avaliar as propriedades de textura, como por exemplo, os empíricos, de imitação e os fundamentais. Testes empíricos envolvem o manuseio da massa ou do queijo. Instrumentos de medidas dos

atributos reológicos dos queijos como o compressor de bola, penetrômetros e medidores de tensão do coágulo foram utilizados em plantas processadoras por muitos anos, porém as medidas foram consideradas imprecisas devido às condições arbitrárias dos testes e resultados difíceis de comparar com experimentos mais rigorosos (Tunick, 2000). Enquanto, os métodos de imitação envolvem instrumentos de simulação das condições sob as quais as propriedades sensoriais das amostras são determinadas pelo ser humano (Meullenet et al., 1997), gerando um número maior de parâmetros (Tunick, 2000; Meullenet et al., 1997; Zoon, 1991). Os testes fundamentais demonstram a natureza do alimento através de expressões matemáticas do comportamento reológico (Tunick, 2000; Konstance & Holsinger, 1992).

Os primeiros instrumentos desenvolvidos para examinar a textura foram uma tentativa de simular o movimento da mandíbula humana durante a mastigação (Konstance & Holsinger, 1992). Desde então sistemas automatizados de testes, análises de perfil de textura, e uma variedade de métodos e instrumentos têm sido desenvolvidos (Lee, Imoto & Rha, 1978).

A avaliação de textura através de métodos instrumentais está baseada nos testes de força de compressão, e a quantificação através dos parâmetros mecânicos a partir do registro das curvas da força de deformação (Szczesniak, 2002; Jack & Paterson, 1992), simulando a compressão do queijo entre os molares durante a mastigação (Fox et al., 2000). O primeiro instrumento baseado neste princípio foi desenvolvido para a General Foods Texturometer (Friedman, Whitney & Szczesniak, 1963; Szczesniak, 1963), introduzindo mudanças na análise do perfil de textura. Nesse sistema, a força de deformação comprime duas vezes o alimento sendo registrada em gráficos. A partir da obtenção e análise da curva força-tempo chegou-se a determinação de sete parâmetros de textura, sendo cinco deles medido diretamente das curvas e dois calculados a partir dos demais parâmetros. Szczesniak (1975), definiu os parâmetros de textura em:

- Fraturabilidade: é a força encontrada na primeira quebra no primeiro pico.

- Dureza: é definida como o pico de força no primeiro ciclo de compressão.
- Coesividade: é a razão entre a área da segunda compressão e a área da primeira compressão.
- Adesividade: é a área de força negativa na primeira compressão, representada pelo trabalho necessário para deslocar o dispositivo de compressão da amostra.
- Elasticidade: é definida como a altura que o alimento retoma a sua condição inicial entre o final da primeira compressão e o início da segunda compressão.
- Gomosidade: é definida como o produto da dureza e a coesividade.
- Mastigabilidade: é definida como o produto da gomosidade e a elasticidade.

Esses parâmetros de textura instrumentais foram correlacionados com os parâmetros sensoriais de textura, obtendo-se bons resultados (Szczesniak, Brandt & Friedman, 1963).

Bourne (1968) adaptou o Instron para a análise do perfil de textura, seguindo as interpretações de Friedman, Whitney & Szczesniak (1963), ao invés de medir a área total abaixo das curvas para o cálculo da coesividade, ele mediu as áreas de compressão, excluindo as áreas de descompressão. Para uma simulação efetiva de avaliação sensorial de textura por testes instrumentais de compressão são necessárias condições para o teste, como por exemplo, a velocidade de compressão, condições padronizadas de temperatura e tamanho das amostras, e tamanho e forma dos dispositivos de compressão (Fox et al., 2000).

Apesar do consumo de tempo para cálculo e interpretações das medidas, essa análise se mostrou útil em pesquisas e desenvolvimento de novos produtos, mas não na rotina do controle de qualidade de alimentos. Posteriormente, o instron foi aprimorado com um programa de computador que processava os dados obtidos pela curva força-distância, e calculava os parâmetros do perfil de textura (Bourne, 1978). O significado dos parâmetros da análise do perfil de textura (TPA) é:

- Dureza TPA: é a força necessária para atingir uma dada deformação.
- Coesividade TPA: é a quantidade de força simulada das ligações internas para descolar o produto do dispositivo de compressão.
- Elasticidade TPA: é a velocidade com que o material volta a sua condição original depois de retirada a força de deformação.
- Adesividade TPA: é a quantidade de força para simular o trabalho necessário para sobrepor as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície de outros materiais em contato com este.
- Fraturabilidade TPA: é a força com que o material fratura.
- Mastigabilidade TPA: é a energia requerida para mastigar um alimento sólido até o ponto de ser engolido.
- Gomosidade TPA: é a energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido até a ponto de ser engolido.

Os termos da análise do perfil de textura (TPA) apresentam significados diferentes dos mencionados na reologia, assim a dureza TPA não tem o mesmo sentido que dureza (Van Vliet, 1991).

O perfil de textura fornecida pelo instron gera muita informação, popularizando este instrumento nos últimos anos (Drake et al., 1999; Meullenet et al., 1998). No entanto, atualmente o texturômetro tem sido usado com mais frequência do que o instron na análise do perfil de textura, por utilizar cargas menores, curvas flexíveis e fornecer resultados mais exatos e precisos (Bourne, 1978). Recentemente, um procedimento instrumental denominado de bicíclico foi desenvolvido para a avaliação de textura (Meullenet et al., 1997).

À medida que os instrumento de análise tornam-se mais avançados, evoluindo dos simples testes dos parâmetros de textura para instrumentos multifuncionais com sistemas totalmente informatizados, a técnica de análise objetiva pode ser a forma para garantir a padronização na qualidade da textura dos alimentos produzidos. Embora, as técnicas sensoriais subjetivas

desempenhem um papel importante, a tendência é a aplicação de métodos instrumentalizados que forneçam dados reprodutíveis, assegurando rapidez e economia na decisão das variáveis que interferem na qualidade da matéria-prima e dos ingredientes no processamento, mantendo a regularidade e aceitação do produto acabado (Smewing, 2000).

### **Correlação entre os parâmetros de textura sensorial e instrumental.**

Técnicas de medidas sensoriais e instrumentais têm sido utilizadas na pesquisa dos parâmetros de textura do alimento. As correlações entre as medidas instrumentais e a percepção sensorial são utilizadas para determinar relações como forma de prever a preferência do consumidor ou como ferramenta no controle de qualidade (Meullenet et al., 1998). O texturômetro tem sido o instrumento freqüentemente utilizado para a análise do perfil de textura (Zoon, 1991), e a quantificação destas propriedades, que podem ser correlacionadas com testes sensoriais (Tunick, 2000; Jack & Paterson, 1992; Chen et al., 1979). Entretanto, as correlações entre as medidas objetivas e subjetivas podem ser muitas vezes inviabilizadas devido às condições diferenciadas dos testes, como por exemplo, temperatura da amostra, taxa de força, nível de compressão e tamanho de amostra (Tunick, 2000; Fox et al., 2000). Correlações sensoriais e instrumentais foram realizados por diversos autores (Drake et al., 1999; Meullenet et al., 1998; Lane et al., 1997; Chen et al. 1979; Imoto, Lee & Rha, 1979; Lee, Imoto & Rha, 1978; Szczesniak, Brandt & Friedman, 1963) e os resultados indicam que as qualidades das correlações variam significativamente de acordo com o parâmetro em estudo. Meullenet et al. (1998) demonstrou que a dureza e a elasticidade apresentaram boa correlação, porém nenhuma correlação significativa foi verificada para coesividade e mastigabilidade. Lane et al. (1997) verificaram que a fraturabilidade e a coesividade foram úteis para distinguir as diferenças no queijo Cheddar durante a maturação.

A dureza tem sido o parâmetro de melhor correlação, enquanto elasticidade e coesividade apresentam baixo grau de correspondência. Essa baixa correlação pode estar associada às dificuldades de quantificação desses parâmetros no perfil

sensorial, ou a necessidade de aperfeiçoar os métodos de quantificação instrumental. Assim, as correlações entre os parâmetros de medidas sensoriais e instrumentais podem vir a ser mais bem interpretadas com a introdução e uso de sistemas instrumentais computadorizados na análise do perfil de textura (Szczesniak, 1998).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDA, J.; GRIPON, J. C. & VASSAL, L. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. **Food chemistry**, v. 9, p. 115 – 129, 1982.

ALVES, N. A . **Uso de leite reconstituído na fabricação de queijo Prato**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999. 90p.

ANTONIOU, K. D; PETRIDIS, D; RAPHAELIS, S.; BEN OMAR, Z. & KESTELOOT, R. Texture assessment of french cheeses. **J. Food Science**, v.65 (1), p.168 - 172, 2000.

ANDRÉN, A. Milk-clotting activity of various rennets and coagulants: background and information regarding IDF Standards. **Bulletin of the International Dairy Federation n° 332/IDF**. Brussels, Belgium p. 9 - 14, 1998.

ARDÖ, Y. Cheese ripening. General mechanisms and specific cheese varieties. **Bulletin of the International Dairy Federation n° 369/IDF**. Brussels, Belgium p. 7 - 12, 2001.

BANKS, J..M.; BANKS, W.; MUIR, M. M. & WILSON, A .G. Cheese yield composition does matter. **Dairy Industries International**. v. 46 n.5, p.15 - 22. 1981.

BARBANO, D. M. & RASMUSSEN, R. R. Cheese yield performance of fermentation produced chymosin and other milk coagulant. **J. Dairy Science**. v 75 n. 1, p. 1 - 12. 1992.

BARBANO, D. M. & SHERBON, J. W. Cheddar cheese yields in New York. **J. Dairy Science** v. 67, n. 8, p. 1873 - 1883. 1984.

BINES, V.E.; YOUNG, P. & LAW, B.A. Comparison of Cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. **Journal of Dairy Research**, v. 56: p.657 – 664. 1989.

BOURNE, M. Texture profile analysis. **Food Technology**, v 32, n. 7, p. 62 - 66, 72. 1978.

BOURNE, M.C. Texture profile of ripening pears. **J. Food Science** v. 33, p. 223 – 226, 1968.

BOUTROU, R. & GAGNAIRE, V. Casein in relation to cheese. **Bulletin of the International Dairy Federation n °369/IDF**. Brussels, Belgium. p. 13 –15, 2001.

BRANDT, M.A.; SKINNER, E.Z. & COLEMAN, J.A. Texture profile method. **J. Food Sci.** v.28, p. 404 – 409, 1963.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n° 358 de 4 de Setembro de 1997. **Diário Oficial** , Brasília, 8 de Setembro de 1997.

CHEN, A. H.; LARKIN, J. W.; CLARK, C. J. & IRWIN, W. E. Textural analysis of cheese. **J. Dairy Science.** v.62 (6): 901 - 907. 1979.

CREAMER, L. K. & OLSON, N. F. Rheological evaluation of maturing cheddar cheese. **J. of Food Science**, v.47 n. 2, p. 631 - 646. 1982.

DATAMARK. Queijo Prato. <http://www.datamark.com.br>. Acesso em 20.12.2001

DRAKE, M. A.; GERARD, P. D.; TRUONG, V. D. & DAUBERT, C. R. Relationship between instrumental and sensory measurement of cheese texture. **Journal Texture Studies**, v.30 n. 4, p. 451 – 476, 1999.

DUTRA, E. P. R. **Fundamentos de Fabricação de Queijos**. Centro de Pesquisa e Ensino/ ILCT/EPAMIG. Juiz de Fora. MG. 1997.

EMMONS, D. B. Definition and expression of cheese yield. In: Factors affecting the yield of cheese. **Bulletin of the International Dairy Special Issue n°9301/IDF**. Brussels, Belgium. Cap.2. p 12 - 25. 1993.

FARKYE, N. Contribution of milk – clotting enzymes and plasmin to cheese ripening. In: **Chemistry of Structure – Function Relationships in Cheese**. Ed. Edyth L. Malin and M.H. Tunick, Plenum Press. N.Y, N.Y. p.195 - 207. 1995.

FARKIE, N.Y. & FOX, P.F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Sci. & Technology**, August, p. 37 - 40. 1990.

FERNÁNDEZ, M. & FOX, P. F. Fractionation of low molecular mass peptides in cheese. **Milchwissenschaft**, v. 55, n.1, p. 25 – 28, 1998.

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

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M. & McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg Maryland: Aspen Publishers, Inc. 2000. 587pp.

FOX, P. F. Developments in the biochemistry of cheese ripening. **Proceedings of 25<sup>th</sup> International Dairy Federation**. p.11 - 38. 1998.

FOX, P. F. & McSWEENEY, P. L. H. Proteolysis in cheese during ripening. **Food Rev. Int.**, v.12, n.4, p. 457 - 509. 1996.

FOX, P. F.; O'CONNOR, T. P. ; McSWEENEY, P. L. H.; GUINEE, T. P.; O'BRIEN, N.M. **Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects**. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.39, p.163 - 328, 1996.

FOX, P.F. Exogenous enzymes in dairy technology: A review. **J. Food Biochemistry**, v.17, p. 173 - 199, 1993.

FOX, P.F. & LAW, J. Enzymology of cheese ripening. **Food Biochemistry**, v. 5, n. 3, p. 239 – 262, 1991.

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

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

FOX, P. F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. **Biotechnology and Applied Biochemistr**, v. 10, n. 6, p. 522 - 535, 1988.

FOX, P F. Significance of salt in cheese ripening. **Dairy industries International**, v. 52, n. 9, p.19 - 22. 1987.

FRIEDMAN, H. H.; WHITNEY, J. E. & SZCZESNIAK, A. S. The texturometer - A new for objective texture measurement. **J. of Food Science**, v. 28, n. 1, p. 390 – 396, 1963.

FRISTEN, H.; MICHAELIS, M.; SCHWERDTFEGER, T.; FOLKENBERG, D. M. & SORENSEN, N. K. Evaluation of bitterness in cheddar cheese. **Milchwissenschaft**, v.55, n. 12, p. 691 - 695, 2000.

FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS/ CETEC. **Manual para fabricação de laticínios**. Série de publicações técnicas/SPT-014. Belo Horizonte, M.G. 1985. 73pp.

FURTADO, M. M. **Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção**. Fonte Comunicações e Editora. São Paulo,S.P.1 71pp. 1999.

FURTADO, M. M. A Practical Approach to some cheese technology parameters and their affect on fermentation, cheese texture and flavor. **Congresso Internacional de Tecnologia em producion de quesos**. Buenos Aires, 26/28/06/1996.

FURTADO, M. M. & LOURENÇO NETO, J. P. M. Tecnologia de queijos: **Manual Técnico para a Produção Industrial de Queijos**. Ed. Dipemar. São Paulo, S.P. p: 90 – 92, 1994.

FURTADO, M. M. Coalho: Considerações sobre a coagulação do leite, rendimento da fabricação e maturação do queijo. **Revista do ILCT**, n. 288. p. 33 – 41, 1993.

FURTADO, M. M. Formação do sabor amargo em queijos (conclusão). **Revista do ILTC**, v. 39, n. 235, p. 35 – 41, 1984.

FURTADO, M. M. & SOUZA, H. M. Estudo rápido sobre a evolução da salga do queijo Prato em salmoura. **Revista do ILCT**, (Jan/Fev), p. 5 – 11, 1981.

FURTADO, M. M.; SOUZA, H. M. & MUNCK, A .V. Controle de salga e umidade do queijo Prato pelo banho de água gelada. **Revista do ILCT**, (Jul/Ago), p. 9 – 15, 1979.

FURTADO, M. M. & POMBO, A. F. W. Fabricação do queijo Prato e Minas: Estudo do Rendimento Parte I - determinação das cifras de transição. **Revista do ILCT**, v.34, (205), p. 3 – 19, 1979.

GORRETA, L. J. Coalho e coagulantes. **Revista do ILCT**, v.35. n.210. p. 17 - 25, 1980.

GRAPPIN, R.; RAUK, T. C. & OLSON, N. F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening: A review. **J. Dairy Science**, v.68. n.3. p. 531 - 540, 1985.

GREEN, M. L. Review of the progress of dairy science: Milk coagulants. **J. Dairy Res.**, v. 44, n. 1, p. 159 - 188, 1977.

GUINEE, T. P. & WILKINSON, M. G. Rennets coagulation and coagulants in cheese manufacture. **J. Society of Dairy Technology**, v.45, n. 4, p. 94 – 104, 1992.

HABIBI-NAJAFI, M. B. & LEE, B.H . Bitterness in cheese: A review. **Critical reviews in food Sci. and Nutrition**, v. 36, n. 5, p. 397 – 411, 1996.

HARBOE, M. K. Chymogem, a chimosin rennet manufactured by fermentation of *Aspergillus niger*. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n°. 269/IDF. Brussels, Belgium, p. 3 - 7, 1992.

IMOTO, E.M.; LEE, C. & RHA, C. Effect of compression ratio on the mechanical properties of cheeses. **J. Food Science**, v. 44, n. 2, p. 343 – 345, 1979

JACK, F. R., PATERSON, A., PIGGOTT, J. R. Perceived texture: direct and indirect methods for use in product development. **International J. Food Science and Technology**, v.30, p. 1 - 12, 1995.

JACK, F. R. & PATERSON, A. Texture of hard cheeses. **Trends in Food Science & Technology**, v.3, n. 7, p. 160 - 164. 1992.

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

KONSTANCE, R. P. & HOLSINGER, V. H. Development of rheological test methods for cheese. **Food Technology**, v.46, n. 1, p. 105 – 109, 1992.

LANE, C.N.; FOX, P. F.; JOHNSTON, D. E. & McSWEENEY, P. L. H. Contribution of ripening coagulant to proteolysis and textural changes in Cheddar cheese during. **Int.Dairy Journal**, v.7, p. 453 – 464, 1997.

LAU, K. Y.; BARBANO, D. M & RASMUNSEN, R. R. Influence of pasteurization on fat and nitrogen recoveries and cheddar cheese yield. **J. Dairy Science**, v.73, n. 3, p. 561 - 570, 1990.

LAWRENCE, R. C. Cheese yield potential of milk. In: Factors affecting the yield of cheese. **Bulletin of the International Dairy Federation Special Issue n°9301/IDF**. International Dairy Federation. Brussels, Belgium. Cap.7. Cap 10. 1993.

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

LEE, C.; IMOTO, E. M. & RHA, C. Evaluation of Cheese Texture. **J. of Food Science**, v. 46, n.5, p. 1600 - 1605. 1978.

MADKOR, S. A.; TONG, P. S. & EL SODA, M. Ripening of Cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of lactobacilli. **J. Dairy Science**, v. **83**, n. 8, p. 1684 – 1691, 2000.

MEULLENET, J. F.; LYON, B. G.; CARPENTER, J. A. & LYON, C. E. Relationship between sensory and instrumental texture profile attributes. **J. Sensories Studies**, v.**13**, p.77 – 93, 1998.

MEULLENET, J. F.; CARPENTER, J. A.; LYON, B. G. & LYON, C. E. Bi-Cyclical instrument for assessing texture profile parameters and its relationship to sensory evaluation of texture. **J. Sensories Studies**, v.**28**, p. 101 – 118, 1997.

MINUSSI, R. C.; FURTADO, M. M. & MASQUIM, M. A. C. A. V. Avaliação de métodos para a aceleração da maturação do queijo prato. **Revista do ILCT**, nº **291**. p. 31 - 42, 1995.

MUÑOZ, A. M .Development and application of texture reference scales. **J. Sensory Studies**, v.**29**, n. 1, p. 55 – 83, 1986.

OLIVEIRA, J. S. **Queijo: Fundamentos tecnológicos**. 2ª. ed. São Paulo, Icone, 1987. p. 27 – 63.

PELEG, M. Texture profile analysis parameters obtained by an Instron universal testing machine. **J. Food Science**, v.**41**, p. 721 – 722, 1976.

PEREIRA, A. J. G . Salga na massa para o queijo tipo Prato. Campinas, 1975, 48p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

PHELAN, Y. A. Standarization of milk for cheesemaking at factory level. **J. Soc.Dairy Tech.**, v.**34**, n. 4, p. 152 - 156, 1981.

RAMKUMAR, C.; CAMPELLA, O. H.; WATKINSON, P. J.; BENNETT, R. J. & CREAMER, L. K. The effects of time on rheological changes during early cheese maturation. **Journal of Texture Studies**. v.**29** (6): 633 - 644. 1998.

RETTL, C.; SGUEDONI, A. & JULIANO, A. M. M. Coalhos e coagulantes. **Leite e Derivados**, v.2, n.7, p. 27 – 30, 1992.

SCHIFTAN, T. Z. & KOMATSU, I. Estudos sobre a composição do queijo Prato consumido na cidade de São Paulo. **Revista do ILCT**, v.35, n. 207, p. 33 – 41, 1980.

SCHMIDT, R.H. Bitter components in dairy products. In: Rouseff, R.L. . **Bitterness In foods and Beverages**. N. York: Ed. Elsevier Science Publishers. Cap. 11. p. 183 - 204. 1990.

SCOTT, R. **Fabricación de queso**. Traducido por Francisco Sala Trepal, 2ª ed., Ed. Acribia, España. 1991.

SMEWING, J. Análise de texturas aplicada na melhoria da qualidade. **Engenharia de Alimentos** nº31, p. 30 – 34, 2000.

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

SOUZA, E. A. Tecnologia de fabricação de queijos. **Revista do ILCT**, p.116, 1960.

STEELE, J. L. Contribution of lactic acid bacteria to cheese ripening. In: **Chemistry of structure – function relationships in cheese**. Ed. E.L. Malin and M.H. Tunick. Plenum Press. N.Y. p.209 - 220. 1995.

STONE, H. & SIDEL, J. L. Quantative descriptive analysis: developments, Applications and The Future. **Food Technology**, v. 52, n. 8, p. 48 – 52, 1998.

STONE, H.; SIDEL, J.; OLIVER, S.; WOOLSEY, A. & SYNGLETON, R. C. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology**, v. 28, n.1, p. 24 – 34, 1974.

SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v.13, p.215 – 225, 2002.

SZCZESNIAK, A. S. Sensory texture profiling-historical and scientific perspectives. **Food Technology**, v.58, n.8, p. 54 – 57, 1998.

SZCZESNIAK, A. S. Textural perceptions and food quality. **J. of Food Quality**, v.14, n. 1, p. 75 – 85, 1991.

SZCZESNIAK, A. S. General foods texture profile revisited-ten years perspective. **J. of TextureStudies**, v.6, n. 1, p. 5 – 17, 1975.

SZCZESNIAK, A. S.; BRANDT, M. A. & FRIEDMAN, H. H. Development of starting rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and the sensory methods of texture evaluation. **J. Food Science**, v. 28, p. 397 – 403, 1963.

SZCZESNIAK, A. S. Classification of textural characteristics. **J. Food Science**, v. 28, p. 385 – 387, 1963.

TEUBER, M. Production of chymosin (E.C. 3.4.23.4) by microorganisms and its use for cheesemaking. **Bull. Inter. Dairy Federation** n° 251/IDF. p. 3 -14, 1990.

TRUONG, V. D. & DAUBERT, C. R. Textural characterization of cheeses using Vane Rheometry and torsion analysis. **J. Food Science**, v.66, n. 5, p. 716 – 721, 2001.

TUNICK, M. H. Rheology of dairy foods that gel stretch and fracture. **J. Dairy Science**, v. 83, n. 8, p. 1892 – 1898, 2000.

USTUNOL, Z. & HICKS, C. L. Effects of milk-clotting enzymes on cheeses yield. **J. Dairy Science**, v.73, n. 1, p. 8 – 16, 1990.

VAN DENDER, A. G. F.; VALE, J. E. do.; ARDITO, E. F. & FIGUEIREDO, L. B. Estudo de métodos de aceleração no processo de fabricação do queijo tipo Prato. **Revista do ILTC**, v. 41, n. 247, p. 3 – 13, 1986.

VAN SLYKE, L. L. & PRICE, W. V. **Cheese**. Ed. Riggeview Publish Company. Independence, Ohio.USA. Cap 4 e 5. pp. 41-67. 1979.

VAN VLIET, T. Terminology to be use in cheese rheology. **Bulletin of The International Dairy Federation n°268**. Brussels, Belgium. p.5 – 15, 1991.

VEISSEYRE, R. **Lactologia Técnica**. Traduzido por Jesus Ventanas Barroso. Ed. Acribia, Zaragoza, España. Cap. 12. p. 377 - 423, 1988.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: An overview. **J. Dairy Science**, v. **76** (1): 329 - 350, 1993.

VISSER, J. Factors Affecting the rheological and fracture properties of Hard and semi-hard cheese. **Bulletin of The International Dairy Federation n°268/IDF**. Brussels,Belgium. p. 49 – 61, 1991.

VISSER, S. Enzymatic breakdown of milk proteins during cheese ripening. **Bulletin of The International Dairy Federation, n°332/IDF**. Brussel, Belgium. p. 20 – 24, 1998.

WALSTRA, P., NOOMEN, A., & GEURTS, T. J. Dutch – Types Varieties. In: **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 2nd. Ed. Aspen Publishers Inc. Maryland. p.39 - 82. 1999.

WOLFSCHOON -POMBO, A . F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Boletim do leite. Ano LV** (660/661), p. 1 – 8, 1983.

ZOON, P.The Relation between instrumental and sensory evaluation of the rheological and fracture properties of cheese. **Bulletin of The International Dairy Federation n°268**. Brussels, Belgium. p.30 – 35, 1991.

## **CAPÍTULO 2**

**EFEITO DO TIPO DE COAGULANTE E DO COZIMENTO DA MASSA NO  
RENDIMENTO DE QUEIJO PRATO, FABRICADO EM ESCALA INDUSTRIAL.**

TRABALHO A SER ENVIADO AO PERÍODICO BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD  
TECHNOLOGY



## **EFEITO DO TIPO DE COAGULANTE E DO COZIMENTO DA MASSA NO RENDIMENTO DE QUEIJO PRATO, FABRICADO EM ESCALA INDUSTRIAL.**

---

### **RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo comparar o rendimento e a recuperação de gordura e proteína no queijo Prato fabricado com os coagulantes: microbiano (protease do *Rhizomucor miehei*), quimosina produzida por fermentação (tipo A) e coalho bovino (20% quimosina e 80% pepsina) mediante cozimento da massa por aquecimento direto (remoção de 1/3 do soro e substituição deste por água quente) e indireto (através de vapor em tanque encamisado). Os experimentos foram realizados em duplicata, em escala industrial, totalizando 12 ensaios. A composição físico - química do leite, soro e queijo foi determinada. O tipo de coagulante e de cozimento da massa afetaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a composição dos queijos, mas não foram observadas diferenças significativas na recuperação de gordura e proteína e no rendimento de fabricação dos queijos.

**PALAVRAS – CHAVE:** queijo Prato; coagulante; coalho; rendimento, quimosina

---

### **ABSTRACT**

---

#### **EFFECT OF THE COAGULANT TYPE AND THE CURD COOKING ON THE YIELD OF BRAZILIAN PRATO CHEESE MANUFACTURED AT INDUSTRIAL SCALE.**

The objective of this work was to compare the yield and the fat and protein recovery of the Brazilian Prato cheese manufactured with the microbial coagulant (protease of the *Rhizomucor miehei*), chymosin produced by fermentation (type A) and calf rennet (20% quimosina and 80% pepsin) using direct curd cooking (removal of 1/3 of the whey and its substitution for hot water) and indirect curd cooking (through vat jacket) heating. The experiments were performed in duplicate, at industrial scale and totalized 12 trials. The physico-chemical composition of the milk, whey and cheese was determined. The effect of the coagulant type and the curd cooking were significant ( $p < 0,05$ ) for cheese composition, but no significant differences were observed on the fat and protein recovery, and on cheese yield.

**KEY WORDS:** Prato cheese; coagulant type; yield; curd cooking.

---

## 1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de queijos em 1999 foi de 368.620 toneladas, com o queijo Prato perfazendo cerca de 80.877 toneladas, o que representa 22% da produção total (DATAMARK, 2001). O Prato é o segundo queijo mais consumido no Brasil, suplantado somente pelo Mussarela. Atualmente, o queijo Prato vem sendo consumido cada vez mais na forma indireta, principalmente em sanduíches, sendo desejável, portanto, que apresente propriedades de fatiabilidade e derretimento (FURTADO, LOURENÇO NETO, 1994, COSTA JÚNIOR, PINHEIRO, 1998).

O queijo Prato é obtido pela coagulação enzimática do leite, com adição de corante, o que confere o tom amarelado característico desse queijo (OLIVEIRA, 1986). Trata-se de um queijo de sabor suave e consistência macia, com um rendimento de fabricação de 9.0 – 9.5 L de leite / Kg queijo (FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994).

O controle do rendimento de fabricação é de grande relevância econômica visto que, a viabilidade da produção de queijos é determinada pelo rendimento de fabricação. Diversos fatores afetam o rendimento final do produto, dentre estes, a composição do leite, principalmente o teor de proteína e gordura (LUCEY, KELLY, 1994), teor de umidade, e perdas de gordura e proteína no soro (EMMONS, 1993).

A escolha do tipo de coagulante é um fator importante no rendimento, uma vez que a enzima deve aliar a ação coagulante com elevada especificidade. No Brasil, o coalho bovino tem sido utilizado para a coagulação do leite na produção de queijo Prato. Este coalho é extraído do abomasso de ruminantes, principalmente de bovinos jovens ou adultos e composto de quimosina e pepsina. Sua composição pode variar em função da idade do animal. O coalho extraído de animais jovens contém em média 80% de quimosina e 20% de pepsina bovina, enquanto o de animais adultos a proporção se inverte com teor de pepsina bovina superior a 80% e de quimosina inferior a 20%. A quase totalidade dos coalhos utilizados no Brasil contém em geral 85% de pepsina bovina (RETTL, SGUEDONI, JULIANO, 1992).

Em razão do crescimento da produção mundial de queijos, outras fontes de enzimas coagulantes do leite têm sido pesquisadas para encontrar substitutos de renina adequados e econômicos (EL-TANBOLY, EL-HOFI, AZZA, 2000). Dentre os substitutos de renina, usados comercialmente estão a quimosina obtida por fermentação e os coagulantes microbianos (FOX, GUINEE, COGAN, McSWENEY, 2000). De acordo com USTUNOL, HICKS (1990), EMMONS (1990), EMMONS, BINNS (1990), FEDRICK, FULLER (1988), os coagulantes microbianos apresentam maior atividade proteolítica quando comparada ao coalho bovino e a quimosina. Trabalhos experimentais de rendimento de fabricação com coalho bovino, coalho de vitelo, coagulantes microbianos e quimosina obtida por fermentação em diferentes variedades de queijos têm sido realizados por diferentes autores (FOLEGATTI, 1994, BARBANO, RASMUSSEM, 1992, BANKS, 1992, BROOME, HICKEY, 1990, USTUNOL, HICKS, 1990, BINES, YOUNG, LAW, 1989).

Outro fator que pode influenciar no rendimento é o sistema de cozimento no tratamento da massa. O tipo de aquecimento no cozimento da massa pode ser indireto, através do aquecimento com vapor em tanque encamisado, ou de forma direta mediante adição de soro aquecido ou por adição de água quente à massa. O aquecimento direto com adição de água quente ou lavagem da massa, tem sido um procedimento tradicional usado na elaboração de queijos como o Prato e Gouda (WALSTRA, NOOMEN, GEURTS, 1999).

A substituição do coalho bovino no queijo Prato pode resultar em diferenças no rendimento, já que diferentes tipos de coagulantes apresentam diferenças na atividade coagulante e na atividade proteolítica. Por sua crescente importância no mercado consumidor, o queijo Prato, necessita de ajustes tecnológicos para manutenção de sua qualidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do tipo de coagulante (protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina obtida por fermentação) e do cozimento da massa (direto e indireto) no rendimento e recuperação de gordura e proteína do queijo Prato fabricado em escala industrial.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Fabricação do queijo

O processamento dos queijos foi realizado em uma indústria de laticínios situada na cidade de Pelotas, RS. O leite destinado à fabricação dos queijos foi padronizado a 2,9% de gordura, pasteurizado a 72°C por 15 segundos e transferido para o tanque de fabricação. Para cada tanque foram utilizados 5000L de leite, 40 ppm de corante, 250 ppm de CaCl<sub>2</sub>, e a fabricação do queijo foi efetuada de acordo com a técnica descrita por FURTADO, LOURENÇO NETO (1994).

Para verificar a influência do tipo de coagulante e tipo de aquecimento na composição e rendimento foram realizados ensaios em duplicata, resultando em 12 ensaios, previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução.

A cultura láctica utilizada foi a Lyofast CMS 0,19<sup>®</sup> da marca Sacco, composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, na proporção de 40: 40:20 respectivamente.

Os coagulantes usados foram a quimosina obtida por fermentação (Chymax<sup>®</sup>, da Chr.Hansen), coalho bovino (Naturen 2154<sup>®</sup>), fornecido pela Chr. Hansen e coagulante microbiano (protease do *Rhizomucor miehei*, Marschall – M<sup>®</sup>) fornecido pela Rhône- Poullenc. Os coagulantes foram utilizados em quantidades suficientes para coagular 5000L de leite, em 20 minutos, à temperatura de 33°C. No tratamento da massa, o cozimento foi realizado à temperatura de 43°C por 20 minutos. O aquecimento direto ocorreu no tanque, através da remoção de 1/3 do soro e substituição deste por água quente à temperatura de 80°C (lavagem da massa) ; o aquecimento indireto através de vapor em tanque encamisado (sem lavagem da massa). A seguir, foram executadas as etapas de dessoragem, pré-prensagem no tanque, corte, enformagem e prensagem.

A salga foi realizada em salmoura a 20%, por 24 horas e, a secagem dos queijos em câmara fria à temperatura de 8°C, por 48 horas. Os queijos de formato retangular, com aproximadamente 2 Kg, foram embalados em material termoencolhível e conduzidos novamente à câmara para maturação na temperatura entre 8 – 10 °C, por 60 dias. A composição dos queijos foi determinada aos cinco dias de fabricação.

## **2.2. Amostragem do queijo**

As amostras para as análises de composição dos queijos foram preparadas da seguinte forma. As peças de queijos foram tomadas aleatoriamente, e divididas em três partes, sendo duas laterais e uma central. A parte central foi cortada em cubos menores, triturada em multiprocessador e homogeneizada manualmente. O material assim obtido foi acondicionado em frascos plásticos, sem espaço livre. As amostras foram mantidas sob refrigeração entre 4 e 8°C até sua utilização para as análises de composição do queijo.

## **2.3 Composição físico - química do leite, soro e queijo.**

O pH foi determinado por método potenciométrico, e a acidez titulável dos leites, soros e dos queijos pelos métodos 947.05 e 920.124 da AOAC (1995) respectivamente, e acompanhadas durante o processo de fabricação. O conteúdo de gordura no leite, soro e queijo foram determinados pelo método de extração etérea de Mojonnier (método 989.05 AOAC, 1995). Para as análises de nitrogênio total (método 991.20, AOAC, 1995), nitrogênio não caséico (BARBANO, LYNCH, FLEEMING, 1991) e nitrogênio não protéico (método 991.21, AOAC, 1995) foi utilizado o método de Kjeldahl. Os valores de nitrogênio foram multiplicados pelo fator de conversão 6,38 para obtenção dos valores equivalentes de proteína. O teor de umidade do queijo foi determinado gravimetricamente em estufa, a 100°C por 24 horas, segundo método 925.23 da AOAC (1995). A porcentagem de cinzas no queijo foi determinada por incineração em mufla a 550°C, conforme o método 935.42 da AOAC (1995). O teor de sal do queijo foi determinado pelo método de

Volhard (RICHARDSON, 1985). As análises de pH foram realizadas em duplicata e as demais análises químicas em triplicatas.

#### 2.4. Recuperação de gordura e nitrogênio

A porcentagem de recuperação (%R) de gordura e nitrogênio foi calculada para o soro e queijo, conforme a equação abaixo:

$$\%R = \frac{\text{peso da amostra} \times \% \text{ componente da amostra}}{\text{peso do leite} \times \% \text{ componente do leite}} \times 100 \quad \text{..... Equação (1)}$$

onde: amostra foi o soro ou o queijo e, o componente, a gordura ou as proteínas.

A recuperação total (RT) de gordura e proteína foi calculada de acordo com a equação 2:

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

#### 2.5 Rendimento

O rendimento (R) dos queijos foi calculado de acordo a equação 3 expresso como kg de queijo/100 kg de leite.

$$R = \frac{\text{peso dos queijos após embalagem}}{\text{peso do leite}} \quad \text{..... Equação (3)}$$

Devido a variações nos teores de umidade e sal dos queijos, foi calculado o rendimento ajustado (RAJ) para efeito de comparação. Para o cálculo do RAJ foram considerados um conteúdo desejado de sal de 1,6% e umidade de 43%.

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

#### 2.6. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados

O delineamento experimental foi o fatorial completo. Os fatores estudados foram: coagulante, em três níveis (protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e coagulante quimosina obtida por fermentação) e aquecimento da massa em dois níveis (aquecimento direto, com a retirada de 1/3 do soro e substituição deste por

água e indireto, com aquecimento por vapor em tanque encamisado). Estes tratamentos resultaram em 6 experimentos, que foram realizados em duplicata, totalizando 12 experimentos.

Os resultados obtidos foram analisados através da Análise de Variância para verificar diferenças significativas e interação entre os fatores. O teste de Tukey foi usado para comparar e verificar diferenças entre médias. O nível de probabilidade foi de 0,05. Na análise dos resultados foi utilizado o programa STATISTICA for Windows® (STATSOFT, 1999).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Composição físico - química do leite, soro e queijo**

##### **3.1.1 Composição do leite**

O leite utilizado na fabricação dos queijos apresentou a seguinte composição média (n=12) de 3,25%  $\pm$  0,17% de proteína total; 2,98%  $\pm$  0,20% de gordura; 0,19%  $\pm$  0,07% de nitrogênio não protéico (NNP); 0,17%  $\pm$  0,01% de acidez titulável (% Ácido láctico) e um pH de 6,68  $\pm$  0,10.

Diferenças significativas foram observadas para os teores de proteína total ( $p = 0,0148$ ) e nitrogênio não protéico ( $p = 0,0177$ ), enquanto os teores de gordura, pH e acidez titulável não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) na composição físico – química dos leites usados na fabricação do queijo Prato com os diferentes coagulantes por cozimento com aquecimento direto e indireto da massa.

A composição do leite é um dos fatores importantes no rendimento em queijos, sendo que a percentagem de matéria seca do leite concentra principalmente proteínas e gordura. As variações de raça, estágio de lactação e estado de saúde do animal influenciam na composição do leite repercutindo na composição final do queijo, comprometendo principalmente os teores de proteínas e gordura que são fundamentais para o rendimento (PHELAN, 1981). A variação

no teor de proteína total, NNP e acidez titulável estão relacionadas à variabilidade normalmente encontrada na composição do leite.

### 3.1.2 Composição do soro

O efeito do tipo de coagulante e aquecimento da massa na composição do soro pode ser observado nas Tabela 1 e 2.

Estatisticamente, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os teores de proteína total, gordura, nitrogênio não protéico (NNP) e pH dos soros resultantes da fabricação dos queijos com coagulante microbiano (protease do *Rhizomucor miehei*), coalho bovino e coagulante quimosina com aquecimento direto e indireto.

TABELA 1. Análise de variância da composição dos soros obtidos da fabricação dos queijos com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.

Componente	GL	Fatores			Erro
		Coagulante (1)	Aq.Massa (2)	Interação 1*2	
Proteína total	2	1	2	6	
	QM	0,0008	0,0001	0,003	0,0023
	p	0,7318	0,812	0,3459	
Gordura	QM	0,0066	0,0074	0,0059	0,0118
	p	0,6008	0,4597	0,6282	
NNP <sup>1</sup>	QM	0,0001	0,0000	0,0000	0,0001
	p	0,5983	0,9426	0,7438	
pH	QM	0,0064	0,0003	0,002	0,0141
	p	0,657	0,8888	0,8691	

<sup>1</sup>NNP= Conteúdo de nitrogênio não protéico; GL= Graus de liberdade; QM= Quadrado médio; p= probabilidade ( $\alpha=0,05$ )

As perdas de gordura e proteínas no soro foram as normalmente encontradas na fabricação industrial de queijos. Entretanto, pode ser observado na Tabela 2, que o teor de gordura do soro resultante do tratamento com coalho bovino e aquecimento indireto foi inferior, enquanto o conteúdo de gordura no soro

do tratamento com coagulante quimosina indireto foi superior em relação aos demais tratamentos, apesar de não existir diferença significativa entre os tratamentos.

**TABELA 2.** Composição média (n=2) dos soros obtidos a partir da fabricação dos queijos com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.

Componente	Aquecimento	Protease do <i>R. miehei</i>	Coalho bovino	Quimosina
PT(%) <sup>1</sup>	Direto	0,90	0,86	0,84
	Indireto	0,85	0,84	0,90
Gordura(%)	Direto	0,55	0,56	0,57
	Indireto	0,51	0,43	0,59
NNP(%) <sup>2</sup>	Direto	0,07	0,06	0,06
	Indireto	0,06	0,06	0,07
pH	Direto	6,39	6,34	6,37
	Indireto	6,42	6,33	6,31

<sup>1</sup> Proteína Total ( Nitrogênio Total x 6,38); <sup>2</sup> Conteúdo de Nitrogênio Não Protéico

### 3.1.3. Composição do queijo

A Tabela 3 mostra a análise de variância da composição dos queijos. Os teores de umidade, gordura, proteína total, cinzas, gordura em base seca (GBS), sal, nitrogênio não protéico (NNP), relação sal/umidade, pH e acidez, relativos aos queijos dos diferentes tratamentos são apresentados na Tabela 4.

Observou-se que o tipo de coagulante utilizado nos diferentes tratamentos resultou em diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na composição dos queijos, com exceção da acidez titulável. O tipo de aquecimento no cozimento da massa afetou significativamente a umidade ( $p = 0,0002$ ), proteína total ( $p = 0,0017$ ), gordura ( $p = 0,0145$ ), acidez titulável ( $p = 0,0009$ ) e pH ( $p = 0,0000$ ) dos queijos, e não afetou

significativamente ( $p > 0,05$ ) os teores de cinzas, sal, relação sal/umidade, NNP e gordura em base seca.

TABELA 3. Análise de variância da composição dos queijos elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.

Componente		Fatores			Erro
		Coagulante(1)	Aq. Massa (2)	Interação 1*2	
	GL	2	1	2	30
Umidade	QM	10,2915	22,0866	0,0631	1,2595
	p	0,0015*	0,0002*	0,9512	
Proteína total	QM	4,6115	7,2009	2,1357	0,6058
	p	0,0021*	0,0017*	0,0422*	
Gordura	QM	8,4813	15,0059	7,1673	2,2269
	p	0,0336*	0,0145*	0,0542	
Cinzas	QM	1,0027	0,0019	0,0315	0,0114
	p	0,0010*	0,6894	0,0795	
Sal	QM	0,2371	0,0110	0,0549	0,0062
	p	0,0000*	0,1941	0,0010*	
S/U <sup>1</sup>	QM	1,4292	0,0044	0,3275	0,0389
	p	0,0000*	0,7376	0,0012*	
NNP <sup>2</sup>	QM	0,0014	0,0000	0,0002	0,0001
	p	0,0001*	0,5988	0,1717	
GBS <sup>3</sup>	QM	47,4489	9,4954	21,0894	6,2234
	p	0,0021*	0,2263	0,0471*	
Acidez	QM	0,0049	0,0608	0,0239	0,0045
	p	0,3475	0,0009*	0,0105*	
pH	GL	2	1	2	18
	QM	0,0225	0,0925	0,0366	0,0020
	p	0,0007*	0,0000*	0,0000*	

<sup>1</sup>S/U= Relação sal/ umidade ; <sup>2</sup> NNP= Conteúdo de nitrogênio não protéico; <sup>3</sup>GBS= Gordura em base seca; GL= Graus de liberdade; QM= Quadrado médio; p= probabilidade;

\*Estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).

Diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos (Tabela 4), porém todos os queijos apresentaram uma composição físico-química típica de queijo Prato, com valores dentro da faixa de variação permitida pela legislação brasileira (LERAYER et al., 1998, MAARA, 1996).

TABELA 4. Composição média (n=6) obtida para os queijos Prato elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto (após cinco dias de fabricação).

Componente	Aquecimento	Protease do <i>R. miehei</i>	Coalho bovino	Quimosina
Umidade(%)	Direto	42,85 <sup>a,b</sup>	41,33 <sup>b</sup>	41,24 <sup>b</sup>
	Indireto	44,45 <sup>a</sup>	43,02 <sup>a,b</sup>	42,65 <sup>a,b</sup>
Gordura(%)	Direto	26,37 <sup>a</sup>	26,19 <sup>a</sup>	26,19 <sup>a</sup>
	Indireto	26,17 <sup>a</sup>	23,13 <sup>b</sup>	25,57 <sup>a,b</sup>
PT(%) <sup>1</sup>	Direto	25,70 <sup>a,b</sup>	24,81 <sup>a,b,c</sup>	26,05 <sup>a</sup>
	Indireto	23,84 <sup>c</sup>	24,52 <sup>b,c</sup>	25,52 <sup>a,b</sup>
Cinzas(%)	Direto	3,74 <sup>a,b</sup>	3,72 <sup>a,b</sup>	3,64 <sup>b</sup>
	Indireto	3,72 <sup>a,b</sup>	3,85 <sup>a</sup>	3,58 <sup>b</sup>
GBS(%) <sup>2</sup>	Direto	46,11 <sup>a</sup>	44,63 <sup>a,b</sup>	44,62 <sup>a,b</sup>
	Indireto	47,07 <sup>a</sup>	40,60 <sup>b</sup>	44,62 <sup>a,b</sup>
Sal (%)	Direto	1,06 <sup>b</sup>	1,38 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>
	Indireto	1,24 <sup>a</sup>	1,30 <sup>a</sup>	1,06 <sup>b</sup>
NNP(%) <sup>3</sup>	Direto	0,07 <sup>a,b</sup>	0,06 <sup>a,b,c</sup>	0,05 <sup>c</sup>
	Indireto	0,08 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b,c</sup>	0,05 <sup>b,c</sup>
S/U <sup>4</sup>	Direto	2,46 <sup>c</sup>	3,33 <sup>a</sup>	2,60 <sup>c</sup>
	Indireto	2,81 <sup>b,c</sup>	3,03 <sup>a,b</sup>	2,49 <sup>c</sup>
PH	Direto	5,39 <sup>b</sup>	5,44 <sup>b</sup>	5,62 <sup>a</sup>
	Indireto	5,38 <sup>b</sup>	5,35 <sup>b</sup>	5,34 <sup>b</sup>
Acidez(%Ác.láctico)	Direto	0,35 <sup>c</sup>	0,40 <sup>b,c</sup>	0,40 <sup>b,c</sup>
	Indireto	0,52 <sup>a</sup>	0,46 <sup>a,b</sup>	0,40 <sup>b,c</sup>

<sup>1</sup>PT= Proteína Total (%NTx6,38); <sup>2</sup>GBS= Gordura em base seca ; <sup>3</sup>NNP= Conteúdo de nitrogênio não protéico; <sup>4</sup>S/U= Relação sal/ umidade; <sup>a, b, c</sup> : Para um mesmo parâmetro, médias com letra(s) em comum não diferem entre si a  $p \leq 0,05$ .

O conteúdo de umidade é um parâmetro importante na composição do queijo. Os maiores teores de umidade foram obtidos para os queijos do tratamento

com protease do *Rhizomucor miehei* e aquecimento indireto. Verifica-se que os queijos fabricados pelo cozimento com aquecimento direto da massa apresentaram menor umidade, provavelmente porque a transferência de calor foi mais efetiva, com a massa alcançando temperatura mais elevada, resultando maior desidratação dos queijos.

A análise estatística revelou que houve interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tipo de coagulante e o aquecimento da massa para os teores de: proteína total ( $p = 0,0422$ ), gordura ( $p = 0,0542$ ), sal ( $p = 0,0010$ ), relação sal/umidade ( $p = 0,0012$ ), GBS ( $p = 0,0471$ ), acidez titulável ( $p = 0,0105$ ) e pH ( $p = 0,0000$ ). Isso significa que essas variáveis são dependentes e, portanto devem ser avaliadas em conjunto. Queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei* e aquecimento indireto apresentaram menor teor de proteína, maior percentagem de nitrogênio não protéico (NNP) e maior acidez titulável. Os valores de NNP mostram que o *Rhizomucor miehei* hidrolisou mais extensivamente a proteína do que o coalho bovino e a quimosina. A maior acidez titulável do queijo fabricado com o coagulante microbiano e aquecimento indireto é possivelmente consequência da maior umidade e maior crescimento dos microrganismos do fermento láctico.

O pH é um dos parâmetros de controle na composição dos queijos, sendo diretamente influenciado pela conversão da lactose em ácido láctico. O controle do pH dos queijos geralmente resulta da proporção entre a lactose incorporada e as substâncias tamponantes do coágulo protéico. Pode ser observado na tabela 4, que os queijos elaborados com coagulante quimosina e aquecimento direto obtiveram maior valor de pH. Este teor está relacionado ao processo de lavagem da massa, que reduz o teor de lactose no grão, elevando o pH. WALSTRA, NOOMEN, GEURTS, (1999) observaram que a adição de água na massa promove a migração da lactose incorporada no coágulo protéico para o soro, e se o tempo de contacto com a água adicionada for de 25 minutos, a remoção de lactose na massa é de aproximadamente 90%. Pode ser observado que o pH dos queijos fabricados com aquecimento indireto foram ligeiramente menores em relação aos fabricados com aquecimento direto evidenciando a retenção de lactose na massa, e aumento na produção de ácido láctico. Entretanto, o aumento

do pH para os tratamentos com coalho bovino e microbiano direto não foi tão evidente. Observa-se que os queijos processados com coagulante microbiano, protease do *Rhizomucor miehei*, e aquecimento indireto apresentaram maior acidez, em função da menor dessoragem, maior teor de lactose e conseqüente aumento no teor de ácido láctico.

### 3.2 Recuperação de Gordura e Proteína e Rendimento do queijo

#### 3.2.1 Recuperação de Gordura

Conforme mostra a Tabela 5, não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na recuperação de gordura no soro e no queijo devido ao tipo de coagulante, e ao tipo de cozimento da massa.

TABELA 5. Análise de variância para a recuperação de gordura no soro e queijo.

Fatores	GL	Soro		Queijo	
		QM	p	QM	p
Coagulante (1)	2	14,2598	0,4559	61,5109	0,6266
Aq. Massa (2)	1	5,6444	0,5728	5,2934	0,8416
Interação 1*2	2	5,8944	0,7047	26,6600	0,8093
Erro	6	15,8787	--	121,6184	--
Total	11				

GL = Graus de liberdade; QM = Quadrado médio; p = probabilidade ( $\alpha=0,05$ )

Na Tabela 6 são apresentados os valores obtidos para a recuperação de gordura no soro e no queijo dos diferentes tratamentos. Apesar de não haver diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), é interessante ressaltar que houve maior tendência de recuperação nos soros provenientes da fabricação dos queijos com coagulante quimosina com e sem lavagem da massa, e menor recuperação para o tratamento com coagulante microbiano e coalho bovino sem lavagem da massa.

Estatisticamente, a recuperação de gordura nos queijos para os diferentes tratamentos não foi significativa, mas pode ser observado na Tabela 6 que a maior tendência de recuperação de gordura nos queijos foi obtida com coalho bovino

(80% pepsina e 20% quimosina) e coagulante microbiano, protease do *Rhizomucor miehei*, sem lavagem da massa para estes tratamentos.

TABELA 6. Valores médios (n=2) da recuperação de gordura no soro e no queijo elaborado com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.

Recuperação de gordura (%)	Aquecimento	Protease do <i>R. miehei</i>	Coalho bovino	Quimosina
Soro	Direto	17,21	17,20	18,09
	Indireto	15,79	15,04	18,18
Queijo	Direto	82,78	82,80	81,92
	Indireto	84,22	84,96	81,82

### 3.2.2 Recuperação de proteína

A Tabela 7 mostra que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos na recuperação de proteínas no soro e no queijo. Entretanto, pode ser observado que uma pequena diferença na recuperação das proteínas foi obtida no queijo em relação ao fator coagulante, pois a diferença ( $p = 0,0688$ ) é bem próxima do valor de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ).

TABELA 7. Análise de variância para a recuperação de proteínas no soro e no queijo.

Fatores	GL	Soro		Queijo	
		QM	p	QM	p
Coagulante (1)	2	1,1215	0,6560	37,7333	0,0688
Aq. Massa (2)	1	0,6348	0,6308	8,1345	0,3717
Interação 1*2	2	1,8879	0,5071	6,9566	0,4933
Erro	6	2,4776	--	8,7304	--
Total	11				

GL = Graus de liberdade; QM = Quadrado médio; p = probabilidade ( $\alpha = 0,05$ )

Pode ser observada na Tabela 8, que a recuperação de proteínas não apresentou grande diferença entre os tratamentos, mas há uma tendência de maior recuperação de proteínas nos queijos manufaturados com coalho bovino com e sem lavagem da massa, e com coagulante quimosina com lavagem da massa. Queijos elaborados com coalho bovino e sem lavagem da massa apresentaram maior tendência de recuperação de proteínas, enquanto os queijos com protease do *R. miehei* e lavagem da massa a menor recuperação. Para WALSTRA, NOOMEN, GEURTS (1999), perdas de gordura e finos de caseína ocorrem no soro durante o processamento, principalmente nas etapas de corte e agitação da massa, que contribuem para o deslocamento destes componentes para o soro afetando sua recuperação e conseqüentemente o rendimento em queijo.

TABELA 8. Valores médios (n=2) da recuperação de proteínas no soro e no queijo elaborado com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.

Recuperação de proteína (%)	Aquecimento	Protease do <i>R. miehei</i>	Coalho bovino	Quimosina
Soro	Direto	25,76	25,11	25,02
	Indireto	25,45	24,50	25,62
Queijo	Direto	74,24	74,90	74,99
	Indireto	74,55	75,51	74,39

### 3.2.3 Rendimento

Não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no rendimento real e ajustado devido ao tipo de coagulante e aquecimento da massa (Tabela 9). No entanto, observou-se uma tendência de aumento no rendimento ajustado, quando o queijo foi fabricado com coalho bovino, independente do tipo de aquecimento empregado (Tabela 10).

Pode ser observado na Tabela 10, que os queijos fabricados com o coalho bovino e aquecimento direto apresentaram o maior rendimento, enquanto os

queijos elaborados com coagulante quimosina e aquecimento direto resultaram em menor rendimento de fabricação. Queijos fabricados com coalho bovino e aquecimento direto apresentaram aumento de 0,08% no rendimento em relação aos elaborados com coalho bovino indireto, 0,27% em relação aos feitos com quimosina e aquecimento indireto, e 0,37% aos fabricados com coagulante microbiano, protease *do R. miehei*, e aquecimento direto.

TABELA 9. Análise de variância para o rendimento real e ajustado (RAJ).

Fatores	GL	Rendimento real		Rendimento ajustado	
		QM	p	QM	p
Coagulante (1)	2	0,1680	0,2976	0,1582	0,1079
Aq. Massa (2)	1	0,2437	0,1926	0,0008	0,9025
Interação 1*2	2	0,0129	0,8939	0,0228	0,6455
Erro	6	0,1125		0,0479	
Total	11				

GL = Graus de liberdade; QM = Quadrado médio; p = probabilidade ( $\alpha = 0,05$ )

TABELA 10. Valores médios (n=2) do rendimento real (R) e rendimento ajustado (RAJ) da fabricação dos queijos com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.

Rendimentos	Aquecimento	Protease do <i>R. miehei</i>	Coalho bovino	Quimosina
R (Kg Queijo:100Kg Leite)	Direto	9,20 <sup>a</sup>	9,36 <sup>a</sup>	8,85 <sup>a</sup>
	Indireto	9,46 <sup>a</sup>	9,55 <sup>a</sup>	9,26 <sup>a</sup>
Rendimento Ajustado (RAJ)	Direto	9,31 <sup>a</sup>	9,68 <sup>a</sup>	9,22 <sup>a</sup>
	Indireto	9,26 <sup>a</sup>	9,60 <sup>a</sup>	9,41 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Médias com letra(s) em comum não diferem significativamente entre si.

Pequenas variações no rendimento devido ao coagulante têm sido registradas na literatura (FOLEGATTI, 1994, BARBANO, RASMUSSEM, 1992,

BANKS, 1992, BROOME, HICKEY, 1990, USTUNOL, HICKS, 1990, BINES, YOUNG, LAW, 1989). Apesar das diferentes atividades proteolíticas das enzimas estudadas, a maioria dos trabalhos mostra diferenças da ordem de no máximo 1% no rendimento.

A lavagem da massa, que ocorre no aquecimento direto, também parece resultar em diferenças muito pequenas. WALSTRA, NOOMEN, GEURTS (1999) verificaram uma redução de 0,5 a 1% no rendimento de fabricação com adição de 30 a 40% de água quente. Nesse trabalho, variações na composição do leite e dificuldades de exatidão na pesagem de grandes quantidades de leite e soro podem ter mascarado pequenas diferenças de rendimento devido ao tipo de coagulante e aquecimento.

#### 4. CONCLUSÃO

Nas condições industriais estudadas, a variação no tipo de coagulante e aquecimento não resultou em diferenças significativas na recuperação de gordura e proteína no soro e no queijo e no rendimento de fabricação do queijo Prato. Entretanto, o tipo de coagulante e o tipo de aquecimento da massa influenciaram significativamente a composição dos queijos. Resultados mais conclusivos poderiam ser obtidos com um número maior de repetições em escala industrial.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16<sup>th</sup>. Ed. Arlington, 1995, p. 71-75.

BANKS, J. M. Yield and quality of Cheddar cheese produced using a fermentation-derived calf chymosin. **Milchwissenschaft**, v. 47 (3): 153 -156, 1992.

BARBANO, D. M., RASMUSSEM, R. R. Cheese yield performance of fermentation produced chymosin and other milk coagulants. **Journal Dairy Science**, v.75 (1): 1 -12, 1992.

BARBANO, D. M., LYNCH, J. M., FLEEMING, J.R. Direct and indirect determination of true protein content of milk by Kjeldahl analysis: Collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v.74 (2): 281 - 288, 1991.

BINES, V.E.; YOUNG, P.; LAW, B.A. Comparison of Cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. **Journal of Dairy Research**, v. 56: p. 657 – 664, 1989.

BROOME, M. C., HICKEY, M. W. Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in Cheddar cheese. **Australian Journal Of Dairy Technology**, v.45 (2): 53 – 59, 1990.

COSTA JÚNIOR, L.C.G., PINHEIRO, A. J. R. Influência da relação caseína/gordura nas características físico-químicas do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, V.53 (305): 29 - 49, 1998.

DATAMARK. Queijo Prato. <http://www.datamark.com.br>. Acesso em 20.12.2001.

EL-TANBOLY, E., EL- HOFI, M. A., AZZA, I. Changes of proteolytic and lipolytic activities during ripening of Gouda cheese prepared with fungal rennet substitute. **Milchwissenschaft**, v. 55 (11): 624 – 628, 2000.

EMMONS, D. B. Definition and expression of Cheese yield. In: Factors Affecting The Yield of Cheese. **IDF Special Issue nº 9301**. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1993, p. 12 – 25.

EMMONS, D. B. Milk- clotting Enzymes.2.Estimation cheese Yield losses from proteolysis during cheese making. **Journal Dairy Science**, v.73 (8): 2016 - 2021, 1990.

EMMONS, D. B., BINNS, M. Cheese yield experiments and proteolysis by milk-clotting enzymes. **Journal Dairy Science**, v. 73 (8): 2028 - 2043, 1990.

FEDRICK, I. A., FULLER, S. C. Comparison of calf rennet and modified *Mucor miehei* coagulant in Cheddar cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.43 (1): 12 - 15, 1988.

FOLEGATTI, M. I. S. **Avaliação do uso da quimosina produzida por *Aspergillus niger* var. awomori, na fabricação de queijo Prato.** Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1994, 65p.

FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., McSWEENEY, P. L. H. Cheese yield. In: **Fundamentals of Cheese Science.** Aspen Publishers Inc. Maryland, 2000, p. 169 - 205.

FURTADO, M. M., LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de Queijos.** Ed.Dipemar. São Paulo, SP, 1994. 118p.

LERAYER, A. L. S., CARVALHO, A. F. de, BUCIONE, A., KESTENER, B. M. A. C., NUTTI, M. R., SIMÃO FILHO, P. **Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais.** Fonte Comunicação e Editora Ltda. 212p. 1998.

LUCEY, J., KELLY, J. Cheese yield. **Journal of The Society of Dairy Technology**, v.47 (1): 1 - 14, 1994.

MAARA-MINISTÉRIO da AGRICULTURA, do ABASTECIMENTO e da REFORMA AGRÁRIA-DAS/DIPOA. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos.** Brasília, D. F. 50 p.1996.

OLIVEIRA, J. S. **Queijo: Fundamentos Tecnológicos.** 2<sup>a</sup> Ed. Ícone Editora Ltda: São Paulo, SP, 1986, p.115 – 121.

PHELAN, J. A . Standardisation of milk for cheesemaking at factory level. **Journal of The Society of Dairy Technology**, v.34 (4 ):152 - 156, 1981

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

RICHARDSON, G. H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products.** American Publ., Helth Assoc, Washington, 1985.

STATSOFT, Inc. (1999). **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104.

USTUNOL, .Z., HICKS, C. L. Effect of milk-clotting enzymes on cheese yield.  
**Journal Dairy Science**, v.73 (1 ): 8 - 16, 1990.

WALSTRA, P., NOOMEN, A., GEURTS, T. J. Dutch – Types Varieties. In: Fox, P. F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 2.Ed. Aspen Publishers Inc. Maryland. 1999, p. 39 - 82.

### **CAPÍTULO 3**

#### **PROCEDIMENTO PARA SELEÇÃO E TREINAMENTO DE JULGADORES PARA AVALIAÇÃO DO GOSTO AMARGO EM QUEIJO PRATO**

TRABALHO APRESENTADO NO XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4 -7 DE AGOSTO DE 2002, PORTO ALEGRE,  
RS.



# PROCEDIMENTO PARA SELEÇÃO E TREINAMENTO DE JULGADORES PARA AVALIAÇÃO DO GOSTO AMARGO EM QUEIJO PRATO

---

## RESUMO

O gosto amargo, considerado um defeito no queijo Prato, foi sensorialmente avaliado por uma equipe de 6 julgadores selecionados e treinados. Um procedimento para a preparação de amostras e determinação da intensidade do gosto amargo em queijos foi proposto e implementado. Amostras de queijos Prato com 1,25cm de aresta foram imersas em soluções de cafeína de 0 a 0,28% (p/v) por um período de 12 horas a 5°C, e submetidas a secagem por 24 horas à mesma temperatura. A seleção dos julgadores foi realizada através de teste triangular e análise sequencial de Wald. No treinamento dos provadores usou-se uma escala não estruturada de nove cm e teste de Ordenação. Os dados foram avaliados a partir do teste de Friedman , análise de variância e teste de Tuckey à nível de 5% de probabilidade. O gosto amargo foi detectado em diferentes amostras, sendo que a de maior intensidade obteve  $5,89 \pm 1,86$ , o que corresponde a sensação produzida pela imersão das amostras de queijo em solução de cafeína superior a 0,07% (p/v). Os resultados indicam que o procedimento de imersão das amostras de queijo em soluções de cafeína foi adequado para detectar o gosto amargo em queijo Prato.

**Palavras- chave:**Queijo Prato, gosto amargo, proteólise, análise sensorial.

---

## SUMMARY

**PROCEDURE FOR SELECTION AND SCREENING OF A DESCRIPTIVE PANEL FOR EVALUATION OF BITTER TASTE IN BRAZILIAN PRATO CHEESE.** The bitter taste defect in Brazilian Prato cheese was evaluated by sensorial tests, using a panel of 6 selected and trained panelist. A procedure for the sample preparation was proposed and a determination of bitter taste intensity in cheese was performed. Cheese samples with thickness of 1,25 cm were immerded in caffeine solutions, at range of 0 to 0,28% (p/v) for 12 hours at 5 °C, and dried for 24 hours at the same temperature. The judges selection was achieved by triangular test and Wald sequential analysis. Ranking tests and nine cm non structured scale was used for judges training and the results were evaluated by Friedman test, analysis of variance, and test averages according to Tuckey at level of 5% probability. The bitter taste was detected in different samples, and the samples with highest intensity obtained a score of  $5,89 \pm 1,86$  which corresponds to the sensation produced by cheese samples immersed in caffeine 0,07 % (p/v). The results showed that the immersion of samples cheese in caffeine solution was an adequate procedure to detect the bitter taste in Brazilian Prato cheese.

**Key words:** Cheese, bitter taste, proteolysis, sensory analysis.

---

## 1- INTRODUÇÃO

A presença do gosto amargo nos alimentos pode ser devida à ocorrência natural de compostos amargos ou originários de reações químicas ocorridas durante o processamento ou estocagem [10, 14]. Nos produtos lácteos, o amargor está relacionado à presença de peptídeos amargos e aminoácidos, resultante da hidrólise das proteínas do leite. No entanto, outras fontes incluem a presença natural de componentes amargos, absorção de sabores, contaminação microbiana, reações químicas e bioquímicas da gordura do leite [8, 10, 11, 14]. Em queijos, o gosto amargo é descrito como um defeito resultante do lento acúmulo de peptídeos hidrofóbicos [5, 6, 7, 16]. O desenvolvimento do gosto amargo em queijos gera prejuízos à indústria queijeira por diminuir a aceitação do produto

pelo consumidor [6]. Este defeito pode aparecer em queijos frescos e curados, sendo detectado por meio de provas sensoriais .

Uma equipe sensorial pode ser utilizada para medir a qualidade de um produto, de maneira similar ao uso de um instrumento; mas para isso, a seleção e o treinamento dos julgadores se fazem necessários. Assim, os integrantes de uma equipe sensorial devem ser treinados através de experiências diretas com referências para aperfeiçoar sua habilidade em reconhecer, identificar e diferenciar estímulos específicos, obtendo desta forma precisão e consistência nos testes sensoriais [4, 12]. Em face disto, este trabalho teve por objetivo propor um procedimento para preparação de amostras visando à seleção e treinamento dos julgadores para detectar o gosto amargo em queijo Prato.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Matéria-prima**

Neste trabalho foram utilizadas 4 amostras comerciais de queijo Prato obtidas no comércio local da cidade de Rio Grande, RS, e dentro do prazo de validade do produto.

### **2.2. Preparação da amostra**

Soluções de cafeína de 0 – 0,28% (p/v) foram preparadas com água deionizada, com 24 horas de antecedência, estocadas a 5°C até a imersão das amostras de queijo. As amostras de queijo utilizadas para o treinamento dos provadores foram preparadas de acordo com a Figura 1. Os testes foram realizados em cabines individuais e as amostras codificadas com número de três dígitos.

### **2.3. Seleção dos julgadores**

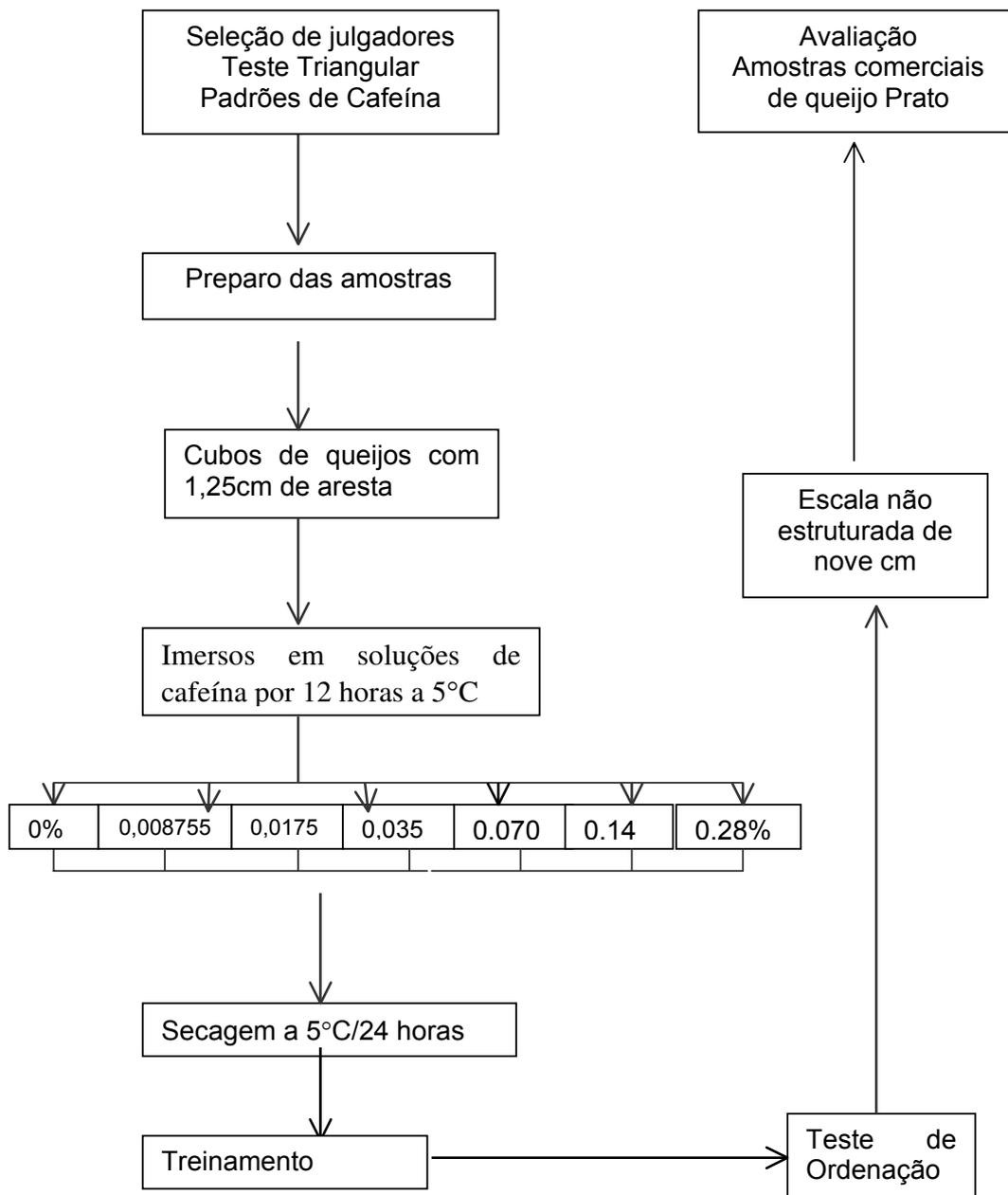
Os julgadores foram selecionados a partir de 20 voluntários, através do teste Triangular [2], utilizando-se soluções de cafeína, e os resultados estatisticamente avaliados pela análise sequencial de Wald, segundo o método gráfico [15]. O sistema de decisão foi realizado mediante o teste de hipóteses:  $H_0$ :

$p_1 \leq p_0$  ;  $H_1: p_1 > p_0$  , e utilizados os valores  $p_0 = 0,33$  (máxima inabilidade aceitável),  $p_1 = 0,66$  (Mínima habilidade aceitável), para os riscos  $\alpha = 0,05$  (aceita candidato sem acuidade) e  $\beta = 0,10$  (rejeita candidato com acuidade sensorial).

A amostra estímulo foi uma solução de cafeína a 0,0038% e a amostra referência utilizada foi água [9]. Para satisfazer às exigências estatísticas as duas amostras foram apresentadas aos candidatos nas 6 possíveis combinações (AAB; BAA; ABA; BBA; BAB; ABB).

#### **2.4. Treinamento dos julgadores**

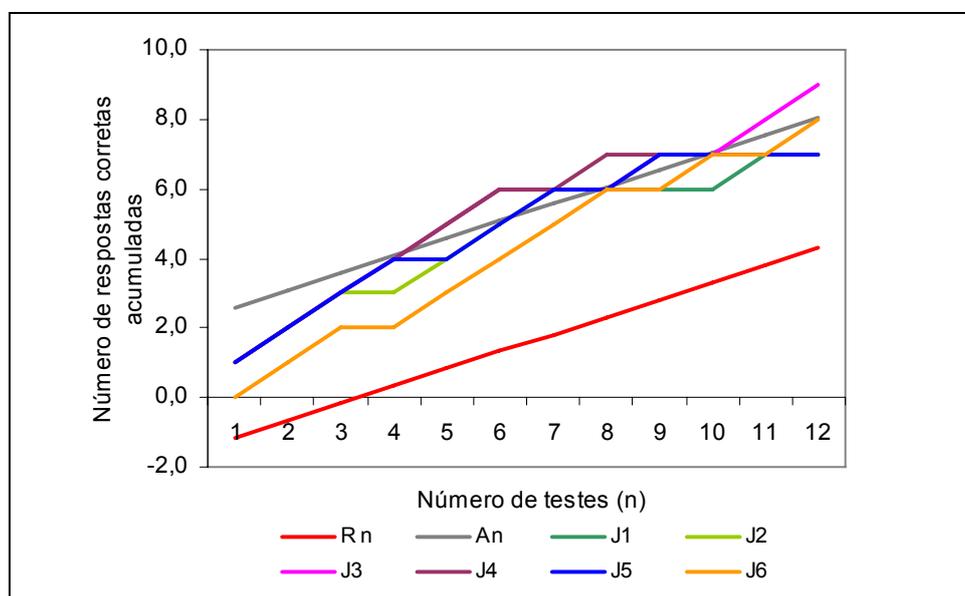
Os seis julgadores selecionados foram submetidos a treinamento com amostras referências de queijo preparadas de acordo com o fluxograma operacional (Figura 1.). Primeiramente, provadores receberam as amostras referências (estímulos), sendo solicitado que as ordenassem em função da intensidade do gosto amargo. Os resultados foram avaliados através do teste de Friedman [3]. Posteriormente, o painel sensorial foi treinado através de procedimento que solicitava que expressassem a intensidade percebida do gosto amargo em várias amostras de queijo através de uma escala não estruturada de 9 cm. Antes da avaliação, os julgadores provaram amostras referências (estímulos) representando os extremos da escala (imperceptível ao fortemente perceptível). Posteriormente, as amostras de queijos codificadas com número de três dígitos foram oferecidas aos provadores e solicitado que as ordenassem do imperceptível ao fortemente perceptível em 6 sessões, com intervalo semanal. Os provadores avaliaram cada amostra de queijo em três repetições. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados.



**FIGURA 1.** Fluxograma operacional do processo para seleção e treinamento dos julgadores.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

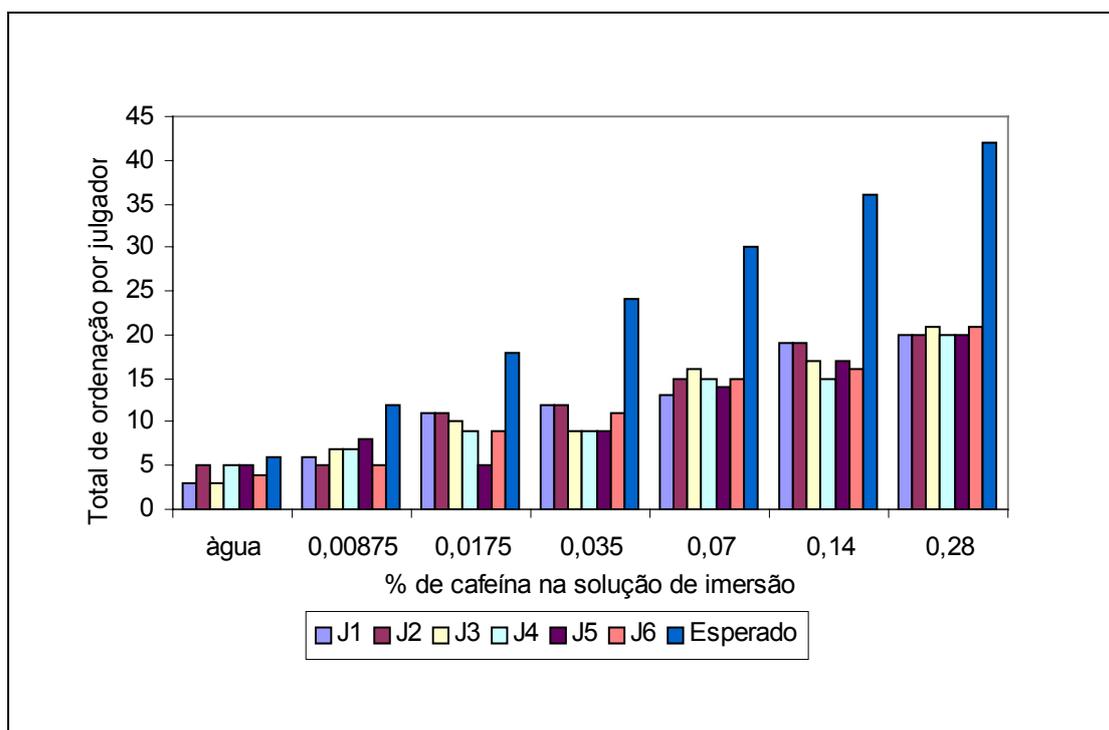
A Figura 2 apresenta os resultados da seleção dos julgadores avaliados através da análise sequencial de Wald [15], utilizando teste triangular. As retas de aceitação e de rejeição obtidas através do teste sequencial para a seleção dos julgadores foram  $A_n = 2,1076 + 0,4946n$  e  $R_n = -1,6418 + 0,4946n$ . Dos 20 candidatos avaliados com o objetivo de compor a equipe, apenas 6 foram selecionados mediante a metodologia proposta para avaliação do gosto amargo em queijo Prato.



**FIGURA 2.** Resultado do desempenho dos candidatos selecionados para compor a equipe de avaliação do gosto amargo em queijo.

A acuidade dos seis candidatos selecionados para detecção do gosto amargo foi superior a  $p_0$  (0,33), com melhor desempenho para os candidatos J1, J3, J4 para o qual foram necessárias apenas 7 provas para definir sua inclusão na equipe sensorial. Isso indica uma alta sensibilidade desse provador ao gosto amargo, uma vez que se trabalhou com concentrações de estímulo no limiar absoluto de detecção 0,0038% de cafeína, conforme indicado por AMERINE, PANGBORN, ROESSLER [1] e JELLINEK [9].

Na Figura 3, estão expressos os resultados do teste de Ordenação dos 6 julgadores selecionados para detecção do gosto amargo nas seis amostras de cubos de queijo Prato, imersos em solução de cafeína que variaram entre 0 e 0,28%.



**FIGURA 3:** Total de ordenação obtidas para amostras de queijo imersas em solução de cafeína pelos julgadores (5 repetições).

A Figura 3 mostra que os julgadores apresentaram resultados bastante similares e válidos, indicando que a técnica de imersão das amostras foi viável para o treinamento do painel sensorial na detecção do gosto amargo em queijos. Isto é melhor evidenciado quando foram avaliados os resultados em função do painel como um todo, conforme mostrado na Tabela 1, que apresenta a avaliação estatística dos dados de ordenação, através do teste de Friedmann.

A análise os dados da Tabela 1 indica que as diferenças foram perceptíveis somente para amostras em concentrações superiores a 0,0038%. A partir desses resultados prosseguiu-se o treinamento, utilizando-se uma escala não estruturada

de 9cm, cujos extremos foram: imperceptível, tendo como referência água (ausência de estímulo cafeína) e muito perceptível, os cubos de queijos imersos em solução de cafeína a 0,28%. Aos julgadores, foi solicitado que marcassem na escala o ponto que melhor representava essa sensação, utilizando amostras de queijos imersas em cafeína nas diferentes concentrações (0,0175; 0,035; 0,070; 0,14; 0,28 %). A Tabela 2 apresenta a análise de variância (amostras x julgadores) dos resultados obtidos com o uso da escala não estruturada de 9 cm.

**TABELA 1.** Diferenças entre os totais de ordenações obtidos através da avaliação das amostras de queijos imersas em soluções de cafeína pela equipe sensorial.

Cafeína g/100g	Cafeína g/100g						
	0,0	0,00875	0,0175	0,035	0,07	0,14	0,28
	8	13	18	24	30	34	41
0,0	-	5	10	16	24*	26*	33*
0,00875			5	11	17	21	28*
0,0175				6	12	16	23*
0,035					6	10	17
0,07						4	11
0,14							7
0,28							--

\*Diferenças de ordem superior ou igual ao valor crítico indicam diferenças significativas

\*\* 6 julgadores e 7 amostras, valor crítico  $\alpha_{0,05} = 22$  (Newell and Mac Farlane, 1987)[13]

Os resultados da Tabela 2 indicam a homogeneidade da equipe, assim como sua habilidade em detectar diferenças entre os tratamentos, diferenças que podem ser avaliadas na Tabela 3, com base no teste de diferença de médias segundo Tukey.

**TABELA 2.** Análise de variância dos resultados obtidos a partir do uso de uma escala de 9 cm para as amostras imersas em solução de cafeína.

CV	GL	SQ	QM	F	p
Julgador (1)	5	11,8015	2,3603	6,8831	0,0004*
Concentração (2)	3	198,3675	66,1225	192,8238	0,0000*
Interação 1*2	15	9,0795	0,6053	1,7652	0,1039
Resíduo	24	8,2296	0,3429		
Total	47	227,4781			

CV:Causas da variação; GL:Graus de liberdade; SQ:Soma dos quadrados ; QM:quadrado médio; p = probabilidade. 2 repetições. \*Estatisticamente significativa (p <0,05).

**TABELA 3.** Intensidade média do gosto amargo para amostras de queijos imersas em soluções contendo cafeína.

Cafeína (g/100g)			
0,0175	0,035	0,07	0,14
1,98 <sup>d</sup> ± 0,91	3,91 <sup>c</sup> ± 0,83	5,50 <sup>b</sup> ± 0,74	7,50 <sup>a</sup> ± 0,77

<sup>a,b,c,d</sup> : Médias seguidas de letras em comum não diferem significativamente a  $p \leq 0,05$ .

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram a diferença entre as amostras quanto ao gosto amargo a  $p \leq 0,05$ , demonstrando a validade do treinamento no painel sensorial através da técnica proposta. A avaliação da veracidade da técnica aplicada pode ser constatada pela análise das Tabelas 4 e 5, que apresentam respectivamente os resultados da análise de variância e a comparação de médias obtidas na avaliação do gosto amargo de 4 amostras comerciais de queijo Prato.

**TABELA 4.** Análise de variância para os resultados obtidos para 4 amostras de queijo comercial.

CV	GL	SQ	QM	F	p
Julgador (1)	5	14,064	2,8128	2,3481	0,0719
Amostra (2)	3	25,1643	8,3881	7,0022	0,0015*
Interação 1*2	15	68,4210	4,5614	3,8078	0,0018*
Resíduo	24	28,7496	1,1979		
Total	47	136,3989			

CV:Causas da variação;GL:Graus de liberdade; SQ:Soma dos quadrados; QM:quadrado médio; p = probabilidade. \*Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

**TABELA 5.** Intensidade média de gosto amargo em amostras de queijos comerciais.

Queijos			
A	B	C	D
5,89 <sup>a</sup> ± 1,86	5,34 <sup>a,b</sup> ± 1,79	4,6 <sup>b,c</sup> ± 1,32	3,98 <sup>c</sup> ± 1,29

<sup>a,b,c</sup>:Médias seguidas de letra (s) em comum não diferem significativamente entre si segundo o teste de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

O gosto amargo foi detectado nas diferentes amostras. A amostra que apresentou maior intensidade de gosto amargo obteve média de 5,89 que corresponde à percepção verificada pela equipe nos cubos de queijo imersos em solução de cafeína superior a 0,07%.

#### 4 - CONCLUSÃO

O procedimento proposto, imersão do queijo em soluções de cafeína a diferentes concentrações, permitiu selecionar e treinar uma equipe de julgadores para a detectar o gosto amargo em queijo. A validade do procedimento foi testada na detecção do gosto amargo em amostras comerciais de queijo Prato verificando-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras, e níveis de amargor até um valor máximo de 5,89.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. AMERINE, M. A., PANGBORN, R. M., & ROESSLER, E. B. **Principles of sensory evaluation of food**. New York, Academic Press, 1965. 602p.
- [2]. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Teste triangular em análise sensorial dos alimentos e bebidas - NBR 12995**. São Paulo, SP. 1993.
- [3]. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Teste de Ordenação em análise sensorial - NBR 13.170**. São Paulo, SP. 7p. 1993.
- [4]. CHAVES, J. B. A Análise sensorial na indústria de laticínios. **Rev.Inst. Latic. Cândido Tostes**, 45 (267-272): 38 - 52.1990.
- [5]. FOX, P.F., O' CONNOR, T. P., McSWEENEY, L. H. Cheese: Physical, Biochemical and Nutrition Aspects. **Advances in Food and Nutrition Research. V.39**: 163-328.1996.
- [6]. FRISTER, H., MICHAELIS, M., SCHWERDTFEGER, T., FOLKENBERG, D. M., SORENSEN, N. K. Evaluation of bitterness in Cheddar cheese. **Milchwissenschaft**, V. 55 n°12, p.691 - 695. 2000.
- [7]. FURTADO, M. M. **Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção**. Fonte Comunicações e Editora. São Paulo, S.P.Br.171pp.1999.
- [8]. GRAPIN, R; BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese: a review. **Bulletin of The International Dairy Federation** n° 327.p.16 -19. 1997.
- [9]. JELLINEK, G. **Sensory Evaluation of Food-Theory and Practice**. Ellis Horwood International Publish. In: Science and Technology. Chichester, England. 1985, 439p.

- [10]. LEMIEUX, L., SIMARD, R. E. Bitter flavour in dairy products.I. A review of the factors likely to influence its development mainly in cheese manufacture. **Lait**. **V.71**: 599 -636. 1991
- [11]. LEMIEUX, L., SIMARD, R. E. Bitter flavour in Dairy Products II. A review of bitters peptides from caseins: Their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. **Lait**. **V.72**: 335 - 382. 1992.
- [12]. MEILGAARD, M., CIVILLE, G. V., & CARR, B. T.. **Sensory evaluation techniques** 3<sup>rd</sup>. Ed. CRC Press. New York, N.Y. USA. 1999. 385p.
- [13]. NEWELL, G. J., & MAC FARLANE, J. D. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. **J. Food Science**, **V.52** n°6. p.1721 - 1725. 1987.
- [14]. SCHMIDT, R. H. Bitter components in dairy products. In: RUSSEL L. ROUSSEF (Ed). **Bitterness in Food and Beverages**. Elsevier Science Publisers, Ltda. Amsterdan, The Netherlands. 1990, p.182 - 204.
- [15]. SHIROSE, I., & MORI, E. E. M. Aplicação da análise sequencial à seleção de provadores, pelo teste Triangular. **Coletânea do ITAL**, Campinas; V.14, p.39-55. 1984.
- [16]. SOUSA, M. J., ARDÖ. Y., & McSWEENEY, P. L. H. Advances in study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, **v.11**, 327 - 345. 2001.

## **CAPÍTULO 4**

### **AVALIAÇÃO SENSORIAL DO GOSTO AMARGO DURANTE A MATURAÇÃO DO QUEIJO PRATO FABRICADO COM DIFERENTES COAGULANTES, COM E SEM LAVAGEM DA MASSA**

TRABALHO A SER ENVIADO À REVISTA MILCHWISSENSCHAFT



## **AVALIAÇÃO SENSORIAL DO GOSTO AMARGO DURANTE A MATURAÇÃO DO QUEIJO PRATO FABRICADO COM DIFERENTES COAGULANTES, COM E SEM LAVAGEM DA MASSA**

---

### **RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo determinar a influência do tipo de coagulante (protease de *Rhizomucor miehei*, quimosina produzida por fermentação e coalho bovino: 20% quimosina e 80% pepsina) e do tipo de aquecimento no cozimento da massa, mediante aquecimento direto (remoção de 1/3 do soro e substituição deste por água quente) e indireto (através de vapor em tanque encamisado) na intensidade do gosto amargo em queijo Prato aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação. A glicólise e proteólise foram determinadas e a intensidade do gosto amargo foi avaliada por uma equipe sensorial treinada. O tipo de coagulante e o tempo de maturação influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) no amargor. Os queijos fabricados com protease do *R. miehei* e aquecimento direto e indireto apresentaram os maiores índices proteolíticos e de intensidade do gosto amargo em relação aos queijos dos demais tratamentos.

**Queijo Prato** (Gosto amargo)

---

### **ABSTRACT**

**SENSORIAL EVALUATION OF THE BITTER TASTE DURING THE AGING OF THE BRAZILIAN PRATO CHEESE MANUFACTURED WITH DIFFERENT COAGULANTS, WITH AND WITHOUT WASHING OF THE CURD.** This work had for objective to determine the influence of the coagulant type and the heating type in curd cooking in the intensity of the bitter taste in Brazilian Prato cheese manufactured with the microbial coagulant (protease of the *Rhizomucor miehei*), chymosin produced by fermentation (type A) and calf rennet (20% chymosin and 80% pepsin) by direct (removal of 1/3 of the whey and substitution of this for hot water) and indirect heating (through vat jacket) to the 5, 15, 30, 45 and 60 days of ripening. The glycolysis and proteolysis were determined and the intensity of the bitter taste was evaluated by a sensory panel trained. The coagulant type

and the time of aging influenced significantly ( $p < 0,05$ ) in the bitterness. The cheeses manufactured with protease of the *Rhizomucor miehei* and direct and indirect heating presented the largest proteolytic indexes and of intensity of the bitter taste in relation to the cheeses of other treatments.

## **Prato cheese (Bitter taste)**

---

### **1. Introdução**

O gosto amargo em queijo Prato é um importante parâmetro de qualidade em razão de influenciar na sua aceitação e consumo. A formação do amargor é um dos problemas mais complexos que podem surgir durante a cura ou a estocagem de queijos (20). A presença do gosto amargo em vários tipos de queijos é relatada como um defeito (15), e resulta da formação e do lento acúmulo de peptídeos hidrofóbicos (12, 13, 20, 22). Este defeito depende de vários eventos que ocorrem durante a proteólise primária e secundária no processo de maturação de queijos (12). Os peptídeos amargos são formados principalmente por ação do coagulante e das proteinases da cultura láctica (17, 20). A hidrólise inicial da caseína é efetuada pelo coagulante, com possível contribuição da plasmina, resultando na formação de peptídeos de alto e médio peso molecular, que posteriormente são degradados pelo coagulante e as proteinases originárias da cultura láctica e da microflora do queijo (20).

As caseínas são proteínas que apresentam certa hidrofobicidade, com determinadas seqüências em sua estrutura particularmente hidrofóbicas. A  $\beta$ -caseína possui a região do carbono terminal especialmente hidrofóbica. Assim, a caseína hidrolisada tem grande tendência ao desenvolvimento do gosto amargo (10). Os peptídeos amargos formados a partir da  $\alpha_{S1}$ -caseína são originários da região dos resíduos 14 - 34, 91 - 101 e 143 - 151, enquanto os da  $\beta$ -caseína são formados a partir do resíduo 46-90 e da região do C- terminal (20). A produção de peptídeos amargos é influenciada pela quimosina e seus substitutos, e a atividade residual do coagulante. As proteinases do coagulante residual são importantes na

produção dos peptídeos amargos em vários tipos de queijo. A ação primária dessas proteinases sobre a  $\beta$ -caseína libera peptídeos extremamente hidrofóbicos, como o resíduo 193 - 203, fortemente amargo (10). A atividade e a retenção do coagulante na massa podem ser afetadas pelo pH e o teor de sal (20). Queijos com baixo pH tendem a reter mais quimosina e pepsina no coágulo, enquanto as proteinases fúngicas têm menor retenção na massa e independem do pH (10, 11).

Proteases do fermento láctico como certas cepas de *Lactococcus* são conhecidas por sua tendência à formação de gosto amargo em queijos, enquanto outras não possuem esta característica definida (10). As bactérias lácticas (LAB), apesar de baixa atividade proteolítica, possuem um sistema proteinase/peptidase capaz de hidrolisar oligopeptídeos em peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos. Quando há ausência de peptidases na cultura láctica, peptídeos amargos podem se acumular no queijo (20). Os coagulantes de origem microbiana apresentam maior tendência para desenvolver o gosto amargo por serem inespecíficos, altamente proteolíticos e de boa estabilidade térmica. Essas características dão aos coagulantes microbianos maior facilidade de degradar as proteínas em peptídeos (7). Portanto, a presença do gosto amargo pode vir a se constituir um problema de qualidade em queijos em razão de influenciar a sua aceitação (12), e uma das formas de detectar este defeito é através da análise sensorial. O objetivo deste trabalho foi determinar a intensidade do gosto amargo em queijo Prato fabricado com diferentes coagulantes usando aquecimento direto e indireto, com e sem lavagem da massa aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação. A glicólise e proteólise foram avaliadas através das análises químicas de pH, acidez titulável, e dos índices de extensão e profundidade da maturação, respectivamente. A intensidade do gosto amargo foi sensorialmente avaliada através de uma equipe sensorial treinada.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Fabricação do queijo

O processamento dos queijos foi realizado em uma indústria de laticínios situada na cidade de Pelotas, RS. O leite destinado ao processamento foi pasteurizado a 72°C por 15 segundos, com teor de gordura de 2,98%, e transferido para o tanque de fabricação. Para cada tanque foram utilizados 5000L de leite, 40 ppm de corante, 250 ppm de CaCl<sub>2</sub>, e a fabricação do queijo foi efetuada de acordo com a técnica descrita por FURTADO & LOURENÇO NETO (14). Para verificar a influência do tipo de coagulante e tipo de aquecimento na composição e intensidade do gosto amargo durante a maturação foram realizados ensaios em duplicata, resultando em 12 ensaios, previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução.

Na fabricação dos queijos foi utilizada a cultura láctica Lyofast CMS 0,19<sup>®</sup> da marca Sacco, composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, na proporção de 4:4:2 respectivamente.

Os coagulantes usados foram quimosina obtida por fermentação (Chymax<sup>®</sup>, da Chr. Hansen), Coalho bovino (Naturen 2154<sup>®</sup>), fornecido pela Chr. Hansen e coagulante microbiano (protease do *Rhizomucor miehei*, Marschall – M<sup>®</sup>), fornecido pela Rhône - Poullenc. Os coagulantes foram utilizados em quantidades suficientes para coagular 5000L de leite em 20 minutos à temperatura de 33°C. No tratamento da massa, o cozimento foi realizado à temperatura de 43°C por 20 minutos. O aquecimento direto ocorreu no tanque, através da remoção de 1/3 do soro e substituição deste por água quente à temperatura de 80°C (lavagem da massa); o aquecimento indireto através de vapor em tanque encamisado. A seguir, foram executadas as etapas de dessoragem, pré-prensagem no tanque, corte, enformagem e prensagem.

A salga foi realizada em salmoura a 20%, por 24 horas e a secagem dos queijos em câmara fria à temperatura de 8°C, por 48 horas. Os queijos de formato

retangular, com aproximadamente 2Kg, foram embalados em material termoencolhível e conduzidos novamente à câmara para maturação na temperatura entre 8 – 10°C por 60 dias. A composição dos queijos foi determinada aos cinco dias de fabricação.

## *2.2 Preparação das amostras*

No preparo das amostras, cada peça de queijo foi retirada aleatoriamente. A peça de queijo foi dividida em três partes, cortada em cubos menores e triturada em multiprocessador, homogeneizada e acondicionada em frascos plásticos. As amostras foram mantidas sob refrigeração entre 4 - 8°C até o momento de sua utilização nas análises. Aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de estocagem refrigerada, os queijos foram submetidos ao mesmo procedimento de amostragem e preparação para as análises de avaliação da glicólise (pH e acidez) e proteólise (nitrogênio solúvel em pH 4,6 e 12% de TCA).

## *2.3 Composição físico - química do queijo*

Para determinar o pH, uma mistura contendo 10g da amostra de queijo com 10mL de água destilada foi avaliada em pHmetro digital Orion modelo 710A<sup>®</sup>. A acidez titulável dos queijos foi realizada pelo método 920.124 da AOAC (2). O conteúdo de gordura no queijo foi determinado pelo método de extração etérea de Mojonnier, segundo o método 989.05 da AOAC (2). As determinações de nitrogênio total (2), nitrogênio não caseíco (4) e nitrogênio não protéico (2), foram realizadas pelo método de Kjeldahl. Utilizou-se o fator de conversão 6,38 para obtenção dos valores equivalentes de proteínas. O teor de umidade do queijo foi determinado gravimetricamente em estufa, a 100°C por 24 horas, segundo método 925.23 da AOAC (2). A porcentagem de cinzas no queijo foi determinada por incineração em mufla a 550°C, conforme o método 935.42 da AOAC (2). O teor de sal do queijo determinado pelo método de Volhard (19). As análises de pH foram realizadas em duplicata e as demais análises químicas em triplicatas.

#### 2.4 Glicólise

Para avaliar a glicólise ocorrida com o tempo de maturação do queijo, através da ação da cultura láctica foi determinado o pH e acidez titulável aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de estocagem do queijo.

#### 2.5 Proteólise

Os índices de proteólise foram quantificados através do nitrogênio solúvel em tampão acetato a pH 4,6 e em 12% de ácido tricloroacético (TCA) e expressos como porcentagem do nitrogênio total. O nitrogênio solúvel em pH 4,6 quantifica a extensão, como medida da ação do coagulante numa fase inicial do fracionamento dos componentes nitrogenados do queijo, enquanto o nitrogênio solúvel em 12%TCA quantifica a profundidade da proteólise, medindo a atividade das enzimas provenientes da cultura láctica (6, 9, 20).

Neste trabalho, a proteólise foi quantificada através dos índices de extensão da maturação (IEM) e de profundidade (IPM) segundo a metodologia de BYNUM & BARBANO (5). Os resultados expressos como porcentagem do teor de nitrogênio total segundo as equações 1 e 2. Estes índices foram determinados aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação do queijo Prato.

$$IEM = \frac{\% \text{ Nitrogênio solúvel a pH 4,6}}{\% \text{ Nitrogênio total}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Equação (1)}$$

$$IPM = \frac{\% \text{ Nitrogênio solúvel em TCA 12\%}}{\% \text{ Nitrogênio total}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Equação (2)}$$

#### 2.6 Análise Sensorial do Gosto Amargo

O gosto amargo dos queijos foi avaliado por uma equipe de seis julgadores selecionados e treinados. A seleção dos provadores foi realizada a partir de 20 voluntários, através do teste Triangular (1). A amostra estímulo utilizada foi uma solução de cafeína a 0,0038% e a de referência água (16). O treinamento dos julgadores foi realizado com amostras de queijo imersas em soluções de cafeína em diferentes concentrações (0,07; 0,14; 0,28 e 0,56 %), e para a expressão da

intensidade percebida foi utilizada uma escala não estruturada de 9cm ancorada nos extremos esquerdo e direito com os termos “imperceptível” e “fortemente perceptível” respectivamente. As avaliações sensoriais foram realizadas em laboratório segundo recomendações da ASTM (3).

A determinação do gosto amargo nas amostras de queijo foi realizada através de duas sessões semanais no período de duração dos experimentos, e avaliadas pela equipe sensorial aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação para cada processamento. Antes das avaliações, os julgadores provaram amostras referências de queijos representando os extremos da escala. Posteriormente, cada julgador recebeu amostras de queijos na forma de cubos com 1,25 cm de aresta e codificadas com um número de três dígitos, e uma ficha de avaliação contendo a escala não estruturada, onde foi solicitado que registrasse a intensidade da sensação percebida.

### *2.7 Planejamento experimental e análise estatística dos resultados*

O delineamento experimental utilizado foi o fatorial completo. Os fatores estudados foram: coagulante, sendo utilizado três níveis (protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina obtida por fermentação) e aquecimento no cozimento da massa em dois níveis (aquecimento direto, retirada de 1/3 do soro e substituição deste por água e indireto, com aquecimento por vapor em tanque encamisado). Estes tratamentos resultaram em 6 experimentos que foram realizados em duplicata, totalizando 12 experimentos. Os resultados obtidos foram analisados através da análise de variância para verificar diferenças significativas e interação entre os fatores. O teste de Tukey foi usado para comparar e verificar diferenças entre médias.

Para a avaliar a glicólise, proteólise e a intensidade do gosto amargo, com o tempo de maturação do queijo, foi adotado um delineamento experimental do tipo split-plot, sendo que a sub-parcela foi obtida pela incorporação do fator tempo de maturação. Os efeitos dos fatores e interações foram analisados através de análise de variância. O teste de Tukey foi utilizado para agrupar tratamentos e/ ou tempos com médias cujas diferenças foram estatisticamente significativas ( $p \leq$

0,05). Na análise dos resultados utilizou-se o programa STATISTICA for Windows (21).

### 3. Resultados e discussão

Verificou-se na Tabela 1 que os queijos obtidos nos diversos tratamentos apresentam a composição característica de um queijo Prato (8, 18). Esses resultados indicam que a fabricação do queijo Prato com protease do *Rhizomucor miehei* ou quimosina, obtida por fermentação, não altera a composição de um queijo Prato típico.

A análise estatística mostrou que o tipo de coagulante utilizado na fabricação dos queijos nos diferentes tratamentos resultou em diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na sua composição, com exceção da acidez titulável. Entretanto, o tipo de aquecimento no cozimento da massa influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) os teores de umidade, proteína total, gordura, pH e acidez titulável. Estatisticamente, as interações entre o agente coagulante e o tipo de aquecimento da massa, resultaram em diferenças significativas na composição dos queijos para os valores de proteína total, gordura, sal, relação sal:umidade, gordura em base seca, pH e acidez titulável. Nota-se que, nos queijos feitos com protease do *Rhizomucor miehei* e aquecimento indireto apresentaram maior conteúdo de umidade e nitrogênio não protéico (NNP) e menor teor de proteína. Queijos mais úmidos poderão ter seu processo de cura acelerado.

O valor de NNP denota a maior ação proteolítica do coagulante microbiano em relação aos tratamentos com coalho bovino e coagulante quimosina com aquecimento direto e indireto. Os queijos com coalho bovino e coagulante quimosina direto apresentaram menor conteúdo de umidade, enquanto o quimosina direto apresentou maior teor de proteínas em comparação aos demais tratamentos que mantiveram valores na faixa de composição para o queijo Prato.

<b>Tabela 1:</b> Média (n = 6) da composição dos queijos obtidos utilizando protease do <i>Rhizomucor miehei</i> , coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto (após cinco dias de fabricação).				
Componente	Aquecimento	Protease do <i>R. miehei</i>	Coalho bovino	Quimosina
Umidade(%)	Direto	42,85 <sup>a,b</sup>	41,33 <sup>b</sup>	41,24 <sup>b</sup>
	Indireto	44,45 <sup>a</sup>	43,02 <sup>a,b</sup>	42,65 <sup>a,b</sup>
Gordura(%)	Direto	26,37 <sup>a</sup>	26,19 <sup>a</sup>	26,19 <sup>a</sup>
	Indireto	26,17 <sup>a</sup>	23,13 <sup>b</sup>	25,57 <sup>a,b</sup>
PT(%) <sup>1</sup>	Direto	25,70 <sup>a,b</sup>	24,81 <sup>a,b,c</sup>	26,05 <sup>a</sup>
	Indireto	23,84 <sup>c</sup>	24,52 <sup>b,c</sup>	25,52 <sup>a,b</sup>
Cinzas(%)	Direto	3,74 <sup>a,b</sup>	3,72 <sup>a,b</sup>	3,64 <sup>b</sup>
	Indireto	3,72 <sup>a,b</sup>	3,85 <sup>a</sup>	3,58 <sup>b</sup>
GBS(%) <sup>2</sup>	Direto	46,11 <sup>a</sup>	44,63 <sup>a,b</sup>	44,62 <sup>a,b</sup>
	Indireto	47,07 <sup>a</sup>	40,60 <sup>b</sup>	44,62 <sup>a,b</sup>
Sal (%)	Direto	1,06 <sup>b</sup>	1,38 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>
	Indireto	1,24 <sup>a</sup>	1,30 <sup>a</sup>	1,06 <sup>b</sup>
NNP(%) <sup>3</sup>	Direto	0,07 <sup>a,b</sup>	0,06 <sup>a,b,c</sup>	0,05 <sup>c</sup>
	Indireto	0,08 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b,c</sup>	0,05 <sup>b,c</sup>
S/U <sup>4</sup>	Direto	2,46 <sup>c</sup>	3,33 <sup>a</sup>	2,60 <sup>c</sup>
	Indireto	2,81 <sup>b,c</sup>	3,03 <sup>a,b</sup>	2,49 <sup>c</sup>
pH	Direto	5,39 <sup>b</sup>	5,44 <sup>b</sup>	5,62 <sup>a</sup>
	Indireto	5,38 <sup>b</sup>	5,35 <sup>b</sup>	5,34 <sup>b</sup>
Acidez(%Ác.láctico)	Direto	0,35 <sup>c</sup>	0,40 <sup>b,c</sup>	0,40 <sup>b,c</sup>
	Indireto	0,52 <sup>a</sup>	0,46 <sup>a,b</sup>	0,40 <sup>b,c</sup>

<sup>1</sup>PT= Proteína Total (%NT x 6,38); <sup>2</sup>GBS = Gordura em base seca ; <sup>3</sup>NNP = Conteúdo de nitrogênio não protéico; <sup>4</sup>S/U = Relação sal/ umidade;

a, b, c : Para um mesmo parâmetro, médias com letra(s) em comum não diferem entre si a p ≤ 0,05.

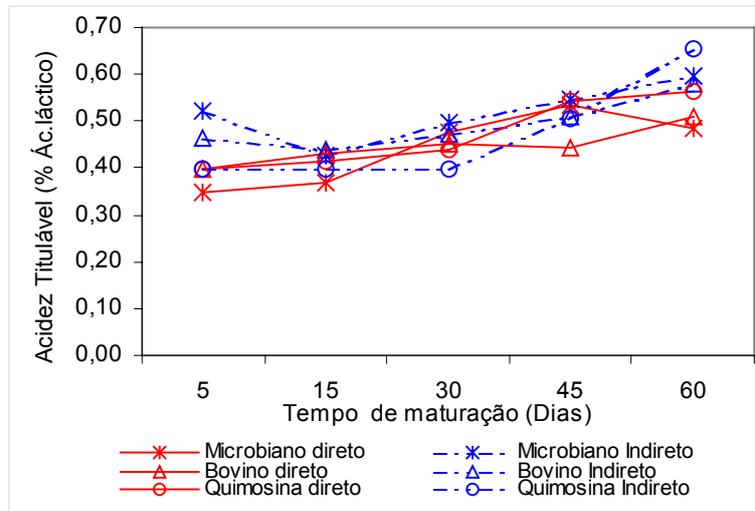
A Tabela 2 mostra a análise estatística dos índices químicos da glicólise e da proteólise dos queijos durante a maturação. Como houve interação do tipo de coagulante com o tipo de aquecimento e com o tempo de maturação dos queijos ( $p < 0,05$ ) para o pH, acidez titulável e os índices de maturação dos queijos, isso significa que essas variáveis não são independentes e, portanto, necessitam ser discutidas em conjunto.

**Tabela 2:** Quadrado médio e probabilidades para acidez titulável, pH e índices de nitrogênio solúvel (pH 4,6 e 12% TCA) em queijo Prato com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e coagulante quimosina e cozimento da massa por aquecimento direto e indireto durante os 60 dias de maturação.

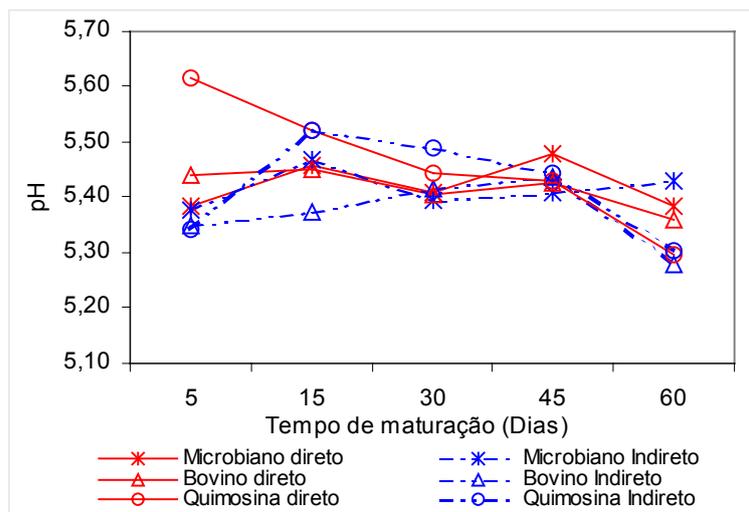
Fatores	GL	Acidez				Nitrogênio solúvel			
		pH		titulável		pH 4,6		12% TCA	
		QM	p	QM	p	QM	p	QM	p
Coagulante (1)	2	0,0222	0,0002*	0,0022	0,3667	329,2485	0,0000*	15,9414	0,0000*
Aq.Massa (2)	1	0,0295	0,0006*	0,0719	0,0000*	4,1233	0,1287	4,5311	0,0012*
Tempo (3)	4	0,0506	0,0000*	0,1494	0,0000*	633,3955	0,0000*	112,2642	0,0000*
Interação (1*2)	2	0,0045	0,1510	0,0225	0,0001*	4,4261	0,0850	9,9394	0,0000*
Interação (1*3)	8	0,0150	0,0000*	0,0135	0,0000*	14,4616	0,0000*	1,1466	0,0072*
Interação (2*3)	4	0,0173	0,0000*	0,0163	0,0000*	3,5169	0,0988	0,8372	0,0956
Interação(1*2*3)	8	0,0128	0,0000*	0,0047	0,0374*	7,5068	0,0000*	1,2638	0,0034*
Erro	150			0,0022		1,7666		0,4160	
Erro (pH)	90	0,0023							

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; p= probabilidade; \* Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

A Figura 1 mostra o desenvolvimento da acidez titulável e do pH dos queijos durante os 60 dias de maturação.



(A)



(B)

Fig. 1: Evolução da acidez titulável (A) e pH (B) dos queijos Prato durante a maturação.

Pode ser observado na Fig. 1A e 1B que a acidez titulável aumenta e o pH diminui com o tempo de maturação para todos os queijos. O maior valor encontrado, pH 5,62, foi para o queijo com quimosina e aquecimento direto com 5

dias de maturação e o menor valor encontrado, pH 5,28, para os queijos com coalho bovino e aquecimento indireto com 60 dias de maturação (Fig.1 B). Os valores de pH obtidos para os queijos dos diferentes coagulantes, com aquecimento direto e indireto estão dentro da faixa de variação para o queijo Prato curado que é de 5,2 a 5,4 (14).

As variações de acidez e do pH estão relacionadas à presença da lactose residual no queijo, que é dependente do método de fabricação do queijo, tipo e atividade do fermento láctico e da concentração de sal na fase aquosa. Nas variedades de queijos com massa cozida que utilizam cultura termofílica (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus*) a concentração da lactose é muita reduzida na primeira semana de cura (9). Nos experimentos realizados foi utilizada uma cultura composta de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Diferenças foram verificadas no valor de acidez dos queijos aos cinco e 60 dias de cura de 0,12% para o tratamento com protease do *Rhizomucor miehei* e coalho bovino indireto, 0,16% para o coagulante quimosina direto e indireto, 0,14% para *Rhizomucor miehei* direto e 0,11 % para o tratamento bovino direto. Estas diferenças não foram acentuadas durante o período de maturação e entre os tratamentos como mostra a Fig. 1A e 1B. O pH dos queijos aumentou ligeiramente aos 15 dias para todos os tratamentos, com exceção do tratamento com quimosina direto, diminuindo com o tempo de cura. O tipo de aquecimento no tratamento da massa foi significativo tanto para a acidez como para o pH. Observou-se que os queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina obtida por fermentação, e aquecimento direto obtiveram valores de pH ligeiramente superiores em relação aos queijos com aquecimento indireto da massa. Assim, no cozimento da massa com aquecimento direto, há maior remoção da lactose devido à lavagem da massa comparativamente ao cozimento da massa com aquecimento indireto.

A Fig. 2A e 2B mostra a evolução dos índices de extensão e profundidade da maturação dos queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto

durante os 60 dias de cura. A análise estatística dos índices de proteólise está apresentada na Tabela 2.

Observou-se que o tipo de coagulante e o tempo de cura influenciaram significativamente nos teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6, indicando diferenças na proteólise primária devida a ação do coagulante, o que refletiu no índice de extensão da maturação. Entretanto, o tipo de aquecimento no cozimento da massa não resultou em diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na extensão da maturação. Estatisticamente, a interação entre os fatores, tipo de coagulante, aquecimento da massa, e o tempo de maturação foi altamente significativa ( $p = 0,0000$ ).

O índice de extensão da proteólise aumentou com o tempo de maturação para todos os queijos, como mostra a Fig. 2A. Os queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei* com aquecimento direto e indireto da massa apresentaram maior acúmulo de substâncias nitrogenadas solúveis em pH 4,6. Esses resultados evidenciam a intensa atividade proteolítica desse coagulante microbiano. Queijos com protease do *Rhizomucor miehei* apresentaram os maiores índices de extensão da maturação, provavelmente devido a maior atividade proteolítica residual na coalhada. Menor especificidade da enzima, maior estabilidade térmica e pouca influência do pH na retenção da protease do *Rhizomucor miehei* podem ser as causas para maior atividade residual nesses queijos.

Os queijos dos tratamentos com coalho bovino e quimosina, independente do tipo de aquecimento usado, mostraram um comportamento similar de aumento nos índices de extensão com o tempo de maturação (Fig. 2A).

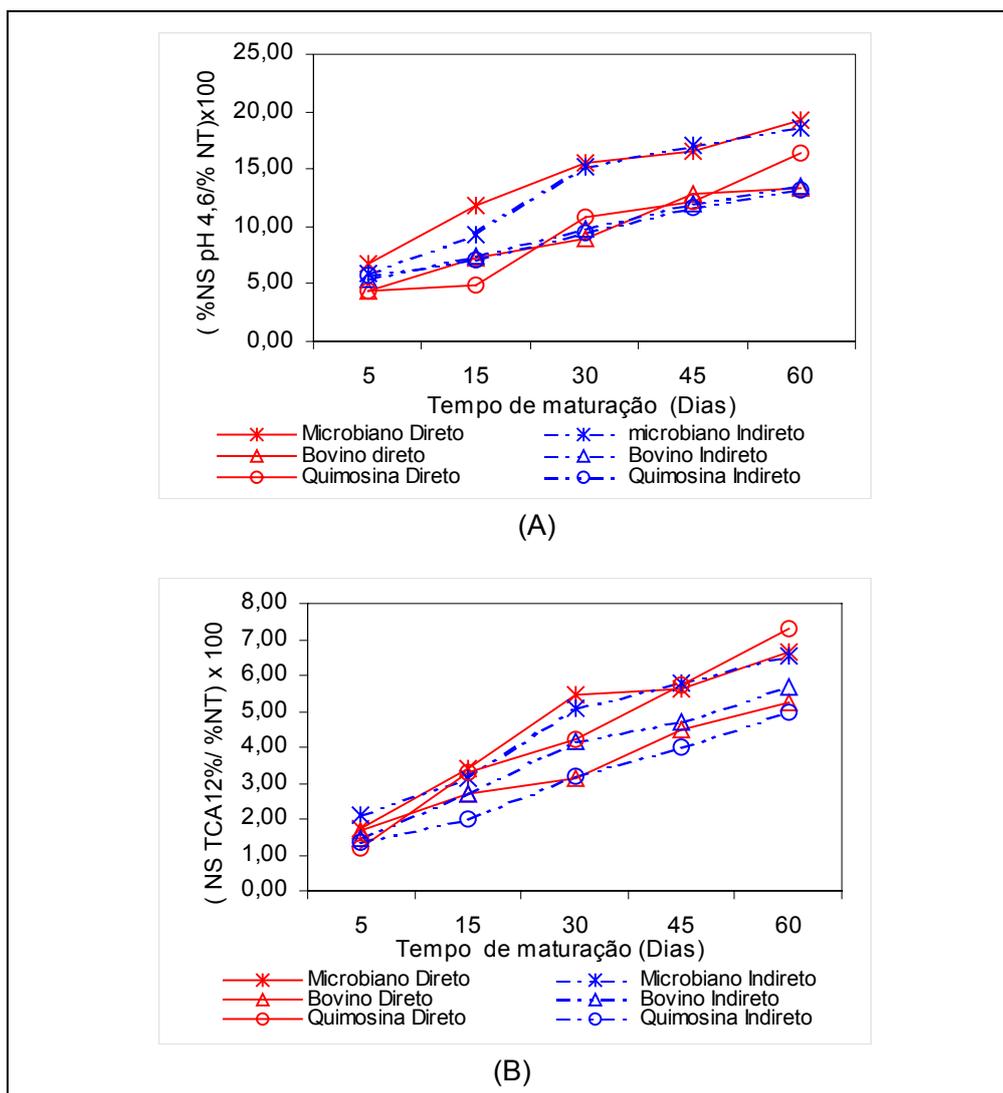


Fig.2: Influência do coagulante e tipo de aquecimento da massa com o tempo de maturação nos níveis do nitrogênio solúvel em pH 4,6/NT (A) e nitrogênio solúvel em 12% TCA/NT (B).

Pode ser observado na Tabela 2, que o tipo de coagulante, o tipo de aquecimento da massa e o tempo de maturação resultaram em diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para as substâncias nitrogenadas solúveis em 12% de TCA, que quantifica o índice de profundidade da proteólise. A interação dos fatores, tipo de coagulante, aquecimento da massa e tempo de maturação foi significativo ( $p = 0,0034$ ) na profundidade da proteólise.

Os queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto apresentaram teores crescentes do índice de profundidade com o tempo de cura (Fig.2B). Nota-se que os queijos do tratamento microbiano direto e indireto obtiveram maior acúmulo de substâncias nitrogenadas em 12% de TCA, com a quimosina direto aumentando a partir dos 45 dias de cura, com valor aos 60 dias superior ao tratamento microbiano direto e indireto.

WALSTRA, NOOMEN & GEURTS (23) observaram que os sistemas enzimáticos agem de forma conjunta nos queijos e a ação do coagulante, na formação de compostos nitrogenados solúveis, pode estimular as bactérias da cultura láctica a acumular peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos, os quais são resultantes da degradação de peptídeos maiores pelas peptidases da cultura láctica. Assim, a atividade proteolítica do coagulante, reflete na ação do sistema proteinase/peptidase da cultura láctica mesofílica utilizada na fabricação dos queijos tendendo ao maior acúmulo de substâncias nitrogenadas solúveis em 12% de TCA.

A intensidade do gosto amargo dos queijos foi influenciada pelo tipo de coagulante ( $p < 0,0000$ ) e pelo tempo de maturação ( $p < 0,0000$ ) sendo dependentes entre si ( $p < 0,0001$ ), como mostra a Tabela 3.

O tipo de coagulante foi altamente significativo na intensidade do amargo, enquanto o tipo de aquecimento usado no cozimento da massa não influenciou de forma significativa ( $p = 0,3584$ ) o amargor dos queijos. Entretanto o tempo de maturação e as interações foram estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) para o desenvolvimento deste defeito, como pode ser observado na Tabela 3.

**Tabela 3:** Quadrado médio e probabilidade para a intensidade do gosto amargo em queijo Prato com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina e cozimento da massa por aquecimento direto e indireto durante os 60 dias de maturação.

Fatores	GL	QM	p
Julgador	5	10,4955	0,0017*
Coagulante (1)	2	188,3417	0,0000*
Aq. Massa (2)	1	2,3056	0,3551
Tempo (3)	4	679,5281	0,0000*
Interação (1*2)	2	35,8221	0,0000*
Interação (1*3)	8	11,2458	0,0001*
Interação (2*3)	4	3,7391	0,2360
Interação (1*2*3)	8	7,0436	0,0078*
Erro	1045	2,6938	

GL= graus de liberdade; QM = quadrado médio; p = probabilidade; \*Estatisticamente significante (p < 0,05).

A intensidade média do gosto amargo para os queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto da massa podem ser observados na Tabela 4.

Queijos feitos com a protease do *Rhizomucor miehei* apresentaram as maiores intensidades de amargor. Portanto, o tipo de coagulante afetou significativamente (p < 0,05) a intensidade do gosto amargo dos queijos, que foi maior quanto mais proteolítico o coagulante empregado. Os queijos dos tratamentos com coalho bovino e coagulante quimosina direto e indireto foram significativamente menos amargos que os do tratamento com protease do *R. miehei*.

O gosto amargo nos queijos foi crescente com o tempo de maturação (Fig. 3) influenciando significativamente (p < 0,05) todos os tratamentos. Observou-se

que a presença do amargo começou a se intensificar a partir dos 30 dias de maturação, e as diferenças na percepção sensorial foram confirmadas através dos valores numéricos obtidos para as amostras dos queijos dos diferentes tratamentos quando submetidas ao painel sensorial treinado. Os queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei* e cozimento da massa por aquecimento direto e indireto obtiveram os maiores valores de amargor em relação aos queijos dos tratamentos com coalho bovino e quimosina durante os 60 dias de cura, e nos queijos do tratamento microbiano indireto foram encontrados os maiores teores de gosto amargo.

**Tabela 4:** Médias (n=180) da intensidade do gosto amargo obtidas para os queijos Prato feitos com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.

Aquecimento	Protease do <i>R. miehei</i>	Coalho bovino	Quimosina
Direto	4.17 <sup>b</sup>	3.30 <sup>c</sup>	3.65 <sup>c</sup>
Indireto	4,98 <sup>a</sup>	3,15 <sup>c</sup>	3,28 <sup>c</sup>

<sup>a, b, c</sup>: Médias com letra(s) em comum não diferem entre si a  $p \leq 0.05$

Os queijos do tratamento microbiano indireto foram os mais amargos e apresentaram maior teor de umidade, NNP e acidez titulável em relação aos queijos dos demais tratamentos. Os resultados obtidos para os índices proteolíticos, como nitrogênio solúvel em pH 4,6 e 12% de TCA dos queijos com *Rhizomucor miehei* direto e indireto foram maiores comparativamente aos outros tratamentos. Os teores da intensidade de amargo obtidos para os queijos elaborados com protease do *Rhizomucor miehei* evidenciam a intensa atividade proteolítica do coagulante microbiano, cuja especificidade é diferente da quimosina.

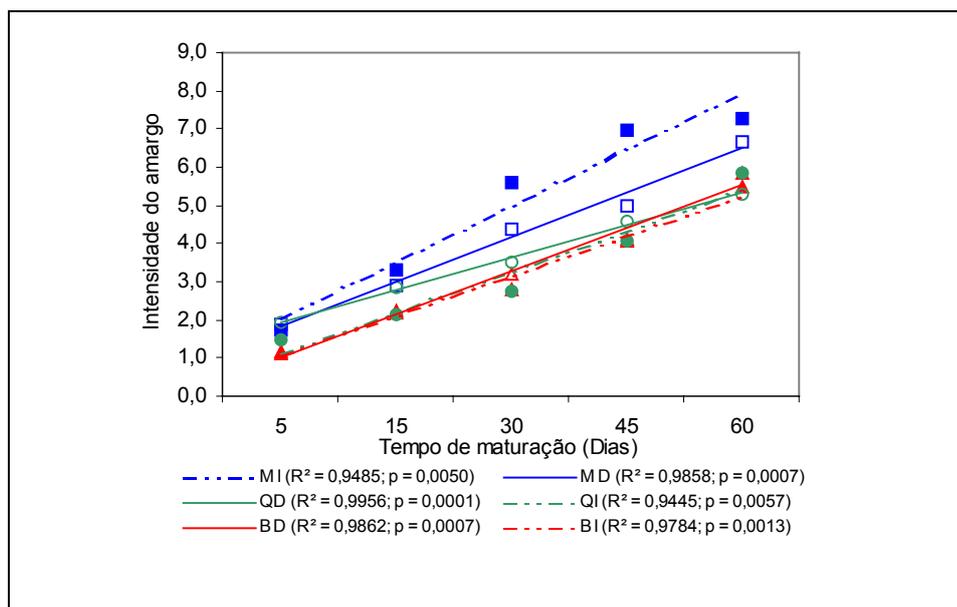


Fig.3: Desenvolvimento da intensidade do gosto amargo com o tempo de maturação dos queijos Prato. (MD = microbiano direto (□); MI = microbiano indireto (■); BD = bovino direto (Δ); BI = bovino indireto (▲); QD = quimosina direta (○); QI = quimosina indireto (●)

Os resultados desse trabalho confirmam a grande influência do coagulante na formação do gosto amargo, em especial a intensa atividade proteolítica do coagulante microbiano no aumento da intensidade do amargor. A presença do amargor nesses queijos se deve também ao tipo de cultura que mostrou-se incapaz de degradar os compostos amargos durante a maturação. Nos queijos com coagulante microbiano e aquecimento direto, a lavagem da massa auxiliou na remoção do número de células presentes do fermento, conseqüentemente com a redução no número de células, a intensidade do amargor nos queijos foi menor comparativamente aos queijos do tratamento microbiano indireto.

#### 4. Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que a intensidade do gosto amargo em queijo Prato é dependente do tipo de coagulante e do tempo de maturação e independente do aquecimento no cozimento da massa. Os queijos dos diferentes tratamentos tiveram um pequeno aumento da acidez titulável e diminuição do pH durante os 60 dias de cura. Durante a maturação os queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei* e aquecimento direto e indireto apresentaram os maiores índices de extensão e profundidade da maturação em relação aos demais tratamentos. A maior intensidade do gosto amargo foi obtida para os queijos do tratamento microbiano, com as maiores médias de intensidade para o tratamento microbiano indireto.

#### 5. Referências

- (1) ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Teste triangular e análise sensorial de alimentos e bebidas – NBR 12995. São Paulo, SP. 1993.
- (2) AOAC : Association Of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 16<sup>th</sup>. Ed. Arlington, VA (1995).
- (3) ASTM : American Society For Testing And Materials. Sensory testing methods. STP434. Philadelphia: ASTM. (1996)
- (4) BARBANO, D. M., LYNCH, J. M., FLEEMING, J. R.: J. AOAC. **74** (2) 281- 288 (1991).
- (5) BYNUM, D. G., BARBANO, D. M.: J. Dairy Sci. **68** (1) 1-10 (1985)
- (6) CHAVES, C., VIOTTO, W. H., GROSSO, C. R. F.: J. Food Sci. **64** (2) 202-204 (1999).
- (7) CHITPINITYOL, S., CRABBE, M. J. C.: Food Chemistry. **61** (4) 395-418 (1998).

- (8) DUTRA, E. R. P.: Fundamentos Básicos de Tecnologia de Queijos. EPAMIG/CEPE/ILCT (1997).
- (9) FARKYE, N. Y., FOX, P. F.: Trends in Food Sci. & Technol. **8** 37-40 (1990).
- (10) FOX, P. F.: Proceedings of 25<sup>th</sup> International Dairy Federation, 11-38 (1998).
- (11) FOX, P. F. : J. Dairy Sci. **72** (6) 1379 – 1400 (1989).
- (12) FRISTER, H., MICHAELIS, M., SCHWERDTFEGER, T., FOLKENBERG, D. M., SORENSEN, N. K.: Milchwissenschaft. **55** (12) 691-695 (2000).
- (13) FURTADO, M. M.: Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção. (Fonte Comunicações e Editora) São Paulo, S.P. Br. (1999).
- (14) FURTADO, M. M., LOURENÇO NETO, J. P. M.: Tecnologia de Queijos.(Ed Dipemar), São Paulo, SP, (1994).
- (15) HABIBI-NAJAFI, M. B., & LEE, B. H.: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. **36** (5) 397-411 (1996).
- (16) JELLINEK, G. Sensory Evaluation of Food- Theory and Practice. Ellis Horwood International Publish. In: Chichester. Series in Science and Tgechnology. England. 1985. 429p.
- (17) LAW, J., FITZGERALD, G. F., DALY, C., FOX , P. F., FARKYE, N. Y.: J. Dairy Sci. **75** (5) 1173-1185 (1992).
- (18) OLIVEIRA, J. S.: Queijo: Fundamentos Tecnológicos. 2<sup>a</sup> Ed. Ícone Editora Ltda: São Paulo, SP. (1986).
- (19) RICHARDSON, G. H.: In: Standard Methods for Examination of Dairy Products. 15<sup>th</sup> ed. Washington, DC. (1985).
- (20) SOUZA, M. J., ARDÖ, Y., McSWEENEY, P. L. H.: Int. Dairy Journal. **11** 327-345 (2001).
- (21) STATSOFT, Inc. (1999). STATISTICA for Windows [Computer program

- manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104,
- (22) VISSER, S. : J. Dairy Sci. **76** (1) 329-350 (1993).
- (23) WALSTRA, P., NOOMEN, A., & GEURTS, T. J: In: Cheese: Chemistry,  
Physics and Microbiology (2.Ed. Aspen Publishers Inc.) Maryland, 39-82.  
(1999).



## **CAPÍTULO 5**

### **INFLUÊNCIA DO TIPO DE COAGULANTE E COZIMENTO DA MASSA NAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DO QUEIJO PRATO**

**TRABALHO A SER ENVIADO A REVISTA FOOD QUALITY AND PREFERENCE**



## INFLUÊNCIA DO TIPO DE COAGULANTE E COZIMENTO DA MASSA NAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DO QUEIJO PRATO

---

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a influência do tipo de coagulante e cozimento da massa nas características sensoriais de aparência, sabor e propriedades de textura do queijo Prato durante os 60 dias de maturação. Os queijos foram elaborados com coagulante microbiano (protease do *Rhizomucor miehei*), quimosina produzida por fermentação e coalho bovino (20% quimosina e 80% pepsina) usando aquecimento direto (remoção de 1/3 do soro e substituição deste por água quente) e indireto (através de vapor em tanque encamisado). Características de aparência, propriedades de textura e atributos de sabor do queijo Prato foram sensorialmente avaliadas por uma equipe sensorial treinada e suas intensidades determinadas através de uma escala não estruturada de 9 cm. As características de aparência, a dureza e a elasticidade dos queijos foram significativamente ( $p < 0,05$ ) influenciadas pelo tipo de coagulante, aquecimento da massa e o tempo de maturação. Os atributos do sabor do queijo Prato foram significativamente afetados ( $p < 0,05$ ) pelo tipo de coagulante e tempo de maturação. Os queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto apresentaram maior intensidade de cor, maior elasticidade e maior intensidade de sabor em relação aos queijos dos demais tratamentos. Maior amargor foi percebido nos queijos elaborados com a protease do *Rhizomucor miehei* e aquecimento indireto.

*Palavras – Chave:* queijo Prato; análise sensorial; coagulante.

---

---

## ABSTRACT

### **INFLUENCE OF THE TYPE OF COAGULANT AND CURD COOKING IN THE SENSORIAL CHARACTERISTICS OF PRATO CHEESE.**

The objective of this work was to determine the influence of the coagulant type and curd cooking on the sensorial characteristics of appearance, flavour and texture properties of Prato cheese during 60 days of ripening. The cheeses were elaborated with microbial coagulant (protease of the *Rhizomucor miehei*), chymosin produced by fermentation and calf rennet (20% chymosin and 80% pepsin) by direct heating (removal of 1/3 of the whey and substitution of this for hot water) and indirect (through vat jacket). The appearance characteristics, texture properties and flavour of the Brazilian Prato cheese were sensory evaluated by a trained sensory panel and their intensities determined through of 9cm non structured scale. The appearance characteristics, the hardness and the springness of the cheeses were significantly ( $p < 0,05$ ) influenced by the coagulant type, the curd heating and the time of aging. The flavour of Prato cheese resulted in statistical differences ( $p < 0,05$ ) for the coagulant type and time of aging. The cheeses manufactured with chymosin and direct heating introduced greater color intensity, higher springiness, and flavour intensity in relation to the cheeses of the other treatments. Bitterness was observed in the cheeses elaborated with protease of the *Rhizomucor miehei* and indirect heating.

*Keywords:* Sensory analysis, descriptive quantitative analysis, coagulant, Prato cheese.

---

## 1. Introdução

As características sensoriais são consideradas critérios de qualidade na escolha e aceitação de um produto alimentício. Dentre essas características estão a aparência, o sabor e a textura (Bárcenas, San Román, Pérez Elortondo & Albisu, 2001). Cada variedade de queijo apresenta características típicas de aparência, sabor e textura (Fox, Guinee, Cogan & McSweeney, 2000). O sabor e a textura final do queijo são resultantes de uma série de transformações químicas, bioquímicas e microbiológicas que ocorrem durante a maturação dos queijos (Irigoyen, Izco, Ibáñez & Torre, 2001), principalmente durante os primeiros estágios do processo de cura (Adda, Gripon & Vassal, 1982). O sabor do queijo pode ser definido como uma sensação complexa que envolve o aroma, gosto e propriedades de textura (Walstra, Noomen & Geurts, 1999). Os componentes que dão origem ao sabor do queijo são obtidos a partir do metabolismo microbológico, degradação das proteínas e dos lipídios do leite (Piggott & Mowat, 1991, Kristoffersen, 1973). Dentre os principais compostos que contribuem para o sabor estão ácidos graxos de cadeia curta, ácido acético e láctico, álcoois, aldeídos cetonas, ésteres, amônia, aminas, sulfetos e mercaptanas (Kristoffersen, 1973). Dentre os componentes químicos derivados de reações químicas, como a reação de Maillard e Strecker, mencionam-se os compostos carbonílicos, especialmente dicarbonílicos, diacetil, glioxal ou metilglioxal. Muitos compostos do sabor são produzidos por ação das enzimas endógenas do leite e enzimas adicionadas ao leite, como a quimosina e seus substitutos. Alguns são formados por ação de enzimas de microrganismos ou ainda de compostos liberados pela lise ou morte das células microbianas durante a maturação (Fox, Guinee, Cogan & McSweeney, 2000; Fox, Singh & McSweeney, 1995). Outros compostos podem contribuir para o sabor dos queijos, como por exemplo a amônia, aminas, aldeídos, fenóis, indol e álcoois que resultam do catabolismo de aminoácidos (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001).

Em queijos de massa lavada como o Prato, os componentes que podem influenciar no sabor são resultantes da degradação da lactose e do ácido cítrico

(como ácido láctico, diacetil, CO<sub>2</sub>, dentre outros), da paracaseína (peptídeos e aminoácidos) e dos lipídios (ácidos graxos), devendo esses compostos apresentar um balanço de proporções e concentrações adequadas entre si (Walstra, Noomen & Geurts, 1999). A lavagem da massa efetuada no queijo Prato pode influenciar as características de sabor, uma vez que este procedimento permite retirar a lactose dos grãos, controlar a acidificação e, produzir um queijo de sabor mais suave.

O gosto é um atributo sensorial de vital importância na qualidade do queijo, resultado de um balanceamento correto dos compostos sápidos (Sousa, Ardö & McSweeney, 2001). A proteólise contribui para o gosto através da produção de peptídeos e aminoácidos e de componentes que se encontram na fase solúvel do queijo, enquanto os compostos que dão o aroma estão principalmente na fração volátil. A proteólise também determina a textura do queijo (Fox, 1998; Fox, 1989), já que implica na quebra da rede de paracaseinato, o que ocasiona mudanças na consistência e no sabor do queijo (Walstra, Noomen & Geurts, 1999; Adda, et al. 1982). Os agentes proteolíticos que contribuem para essas mudanças, são as proteases nativas do leite, o coagulante residual, as proteases e peptidases do fermento láctico, e as enzimas de bactérias que não sejam do fermento láctico (Irigoyen, Izco, Ibáñez & Torre, 2001). O coagulante é o principal responsável pela formação de peptídeos (Urbach, 1995), que podem ser degradados em compostos nitrogenados de baixo peso molecular, responsáveis pelo sabor (Sousa, et al., 2001). A mudança na rede protéica tem início na ação da quimosina sobre as ligações Phe<sub>105</sub>- Met<sub>106</sub> induzindo a coagulação. Nos queijos novos, a matriz protéica do queijo é praticamente formada por moléculas de  $\alpha_{S1}$ -caseína (Creamer & Olson, 1982). Nas primeiras semanas de maturação a  $\alpha_{S1}$ -caseína é hidrolisada pelo coagulante nas ligações Phe<sub>23</sub> - Phe<sub>24</sub> e Phe<sub>24</sub> - Val<sub>25</sub> produzindo a  $\alpha_{S1}$ -I caseína, o que é a causa do enfraquecimento da rede protéica (Adda et al., 1982). Assim, a firmeza do queijo está relacionada com a quantidade de  $\alpha_{S1}$ -caseína intacta (Lawrence, Creamer & Gilles, 1987). A atividade proteolítica depende do tipo e quantidade do coagulante residual, mudanças de pH e

temperatura (Yun, Kiely, Kindstedt & Barbano, 1993). A atividade residual da quimosina depende do pH, enquanto que os coagulantes microbianos independem do pH. Quanto menor for o pH da massa, durante a dessoragem, maior será a retenção de quimosina, e conseqüentemente mais  $\alpha_{S1}$ -caseína pode ser hidrolisada (Lawrence, Creamer & Gilles, 1987). A sensibilidade ao calor varia com o tipo de coagulante, sendo a protease do *Rhizomucor miehei* a mais resistente termicamente (Guinee & Wilkinson, 1992). Mudanças no tipo de cozimento e o uso de lavagem da massa podem afetar a atividade proteolítica e a quantidade de coagulante residual no queijo e, portanto resultar em diferença na textura e sabor durante a maturação.

A importância do queijo Prato para as empresas e consumidores brasileiros, justifica uma avaliação de suas características sensoriais visando à melhoria de sua qualidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tipo de coagulante e cozimento da massa nas características sensoriais do queijo Prato fabricado durante 60 dias de maturação.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Fabricação do queijo

Os queijos foram fabricados em uma indústria de laticínios da cidade de Pelotas, RS, Brasil. O leite foi padronizado a 2,9% de gordura, pasteurizado a 72°C por 15 segundos e transferido para o tanque de fabricação. Para cada tanque foram utilizados 5000L de leite, 40 ppm de corante, 250 ppm de CaCl<sub>2</sub>, e a fabricação do queijo foi efetuada de acordo com a técnica descrita por Furtado & Lourenço Neto (1994).

Utilizou-se uma cultura láctica Lyofast CMS 0,19<sup>®</sup> da marca Sacco, composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, na proporção 4:4:2 respectivamente. Para verificar a influência do tipo de coagulante e tipo de

aquecimento foram realizados 6 ensaios em duplicata, totalizando 12 tratamentos, previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução.

Os coagulantes usados foram a quimosina obtida por fermentação (Chymax<sup>®</sup>, da Chr.Hansen), coalho bovino (Naturen 2154<sup>®</sup>) fornecido pela Chr.Hansen e coagulante microbiano (protease do *Rhizomucor miehei*, Marschall – M<sup>®</sup>) fornecido pela Rhône- Poullenc. A quantidade de cada coagulante usada foi a suficiente para coagular 5000L de leite em 20 minutos à temperatura de 33°C.

O cozimento da massa, direto e indireto, foi realizado à temperatura de 43°C por 20 minutos. O aquecimento direto ocorreu diretamente no tanque, pela substituição de 1/3 da quantidade de soro por água quente à temperatura de 80°C caracterizando o processo com lavagem da massa. O aquecimento indireto se realizou com vapor em tanque encamisado caracterizando o processo sem lavagem da massa. As operações de dessoragem, pré-prensagem no tanque, corte, enformagem e prensagem foram comuns a ambos processos.

A salga foi feita em salmoura a 20%, por 24 horas e a secagem dos queijos foi realizada por 48 horas em câmara à temperatura de 8°C. Os queijos, de formato retangular com aproximadamente 2Kg cada um, foram embalados em material termoencolhível e conduzidos a uma câmara com temperatura controlada entre 8 – 10 °C para o período de maturação de até 60 dias.

## 2.2 Preparação das amostras

Cada peça de queijo de 2,0kg foi retirada aleatoriamente da câmara de maturação de acordo com o planejamento dos experimentos. Cada peça foi dividida em três partes, cortadas em cubos menores, triturada em multiprocessador, homogeneizada manualmente e acondicionada em frascos plásticos. As amostras foram mantidas sob refrigeração entre 4 - 8°C até o momento de sua utilização.

### *2.3 Composição físico - química.*

A composição dos queijos foi determinada aos cinco dias de fabricação. Para a determinação do pH, misturou-se 10g da amostra com 10mL de água destilada e realizou-se a leitura do pH em pHmetro digital Orion modelo 710 A<sup>®</sup>. A acidez titulável dos queijos foi realizada pelo método 920.124 da AOAC (1995). O conteúdo de gordura foi determinado por extração etérea em Mojonnier segundo o método 989.05 da AOAC (1995). Determinou-se nitrogênio total pelo método 991.20 AOAC (1995), nitrogênio não caséico segundo Barbano, Lynch & Fleeming, (1991) e nitrogênio não protéico pelo método 991.21 AOAC (1995). Para obter o teor de proteína foi utilizado o fator 6,38. O teor de umidade foi determinado por gravimetria em estufa a 100°C por 24 horas, segundo o método 925.23 da AOAC (1995). A porcentagem de cinzas foi determinada por incineração em mufla a 550°C, conforme o método 935.42 da AOAC (1995). O teor de sal foi determinado pelo método de Volhard (Richardson,1985). As determinações de pH foram realizadas em duplicata e as demais determinações em triplicatas.

### *2.4 Análise Sensorial.*

As características sensoriais dos queijos Prato foram determinadas utilizando a metodologia da análise descritiva quantitativa (ADQ), conforme Stone & Sidel (1993). Os provadores foram recrutados e selecionados com base no desempenho e habilidade para descrever e discriminar os atributos de odor, gostos básicos, sabor residual e textura do queijo. De 20 candidatos somente 6 foram selecionados e treinados.

Inicialmente foi realizado o levantamento individual de termos descritivos de atributos sensoriais utilizando amostras comerciais de queijos Prato. Posteriormente, sob a orientação de um líder, realizaram-se discussões para elaborar um vocabulário consensual de termos descritivos, com a definição de cada termo (Fig.1), e a ficha de avaliação das amostras (Fig. 2). Em cada sessão de avaliação as amostras de queijos, devidamente codificadas, na forma de cubos

com 1,25cm de aresta foram servidas aos julgadores selecionados e treinados. Cada julgador recebeu uma ficha de definições dos termos descritivos (Fig. 1) e a ficha de avaliação descritiva contendo a escala não estruturada de 9,0cm (Fig. 2), sendo solicitando o registro da intensidade da sensação percebida nas amostras de queijo para cada atributo. As determinações foram realizadas em triplicata, em três sessões semanais. A análise sensorial foi realizada aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias, respectivamente, do período de maturação das amostras para cada processo.

### 2.5 Planejamento experimental e análise estatística dos resultados

O delineamento experimental utilizado foi o do tipo fatorial completo. Os fatores estudados foram tipo de agente coagulante, em três níveis (protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina obtida por fermentação) e forma de aquecimento no cozimento da massa em dois níveis: aquecimento direto e indireto.

Atributos		Definição
Aparência	Cor	Amarelo ou amarelo-palha
	Mescla	Regiões de cores escuras e claras misturadas às demais regiões.
Textura	Dureza	Força necessária para comprimir o produto com o dente molar
	Elasticidade	Grau do retorno do produto a forma original após cessada a compressão do dente.
	Adesividade	Força requerida para remover o produto aderido ao palato durante a mastigação
	Fraturabilidade	Força com a qual a amostra fratura, quebra, esfarela.
Odor	Leite	Associado ao leite fresco
	Doce de leite	Associado ao leite condensado caramelizado
	Azedo	Relacionado ao leite fermentado
	Manteiga	Associado a manteiga fresca
Gosto	Salgado	Sensação gustativa percebida em solução aquosa de cloreto de sódio
	Doce	Sensação gustativa percebida em solução aquosa de açúcar
	Amargo	Sensação gustativa percebida em solução aquosa de cafeína
Sabor	leite	Relacionado ao leite fresco
	Manteiga	Associado a manteiga fresca
	Ranço	Relacionado a gordura, óleo, sebo, sabão
Residual	Salgado	Sensação levemente remanescente de sal
	Gorduroso	Remanescente associado à manteiga, margarina, material gorduroso
	Amargo	Sensação remanescente na parte posterior da língua após a deglutição.

Fig.1. Termos descritivos utilizados no treinamento da equipe da avaliação sensorial.

Estes tratamentos resultaram em 6 experimentos realizados em duplicata, num total de 12 tratamentos. Os resultados foram analisados através da análise de variância, utilizando-se o teste de Tukey para verificar diferenças entre as médias.

Na avaliação das características sensoriais foi adotado um delineamento experimental do tipo split-plot, sendo que a sub-parcela foi obtida pela incorporação do fator tempo de maturação. Os efeitos dos fatores e interações foram analisados através de análise de variância. A relação entre o tempo de maturação e os atributos que descrevem as características sensoriais dos queijos foi analisada por regressão linear. O teste de Tukey foi utilizado para agrupar tratamentos e/ou tempos com médias cujas diferenças foram estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). A análise dos resultados foi realizada utilizando o programa Statistica for Windows.

LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL E CONTROLE DE QUALIDADE	
Nome: _____	Data: _____
<b>Produto:</b> QUEIJO PRATO <b>INSTRUÇÕES:</b> Por favor, prove as amostra e responda cada item, na sequência dada, marcando na linha horizontal o ponto que melhor expressa a intensidade da característica avaliada.	
<b>APARÊNCIA</b>	
Cor	Fraca _____ Forte
Mesclado Pouco	Muito _____
<b>TEXTURA</b>	
Dureza	Macio _____ Duro
Elasticidade Pouco	Muito _____
Fraturabilidade Pouco	Muito _____
Adesividade Pouco	Muito _____
<b>ODOR</b>	
Leite	Fraco _____ Forte
Doce de leite	Fraco _____ Forte
Azedo	Fraco _____ Forte
Manteiga	Fraco _____ Forte
<b>GOSTO</b>	
Salgado	Fraco _____ Forte
Doce	Fraco _____ Forte
Amargo	Fraco _____ Forte
<b>SABOR</b>	
Leite	Fraco _____ Forte
Manteiga	Fraco _____ Forte
Ranço	Fraco _____ Forte
<b>SABOR RESIDUAL</b>	
Salgado	Fraco _____ Forte
Gorduroso	Fraco _____ Forte
Amargo	Fraco _____ Forte
Observações: _____	

Fig. 2. Ficha utilizada na avaliação sensorial das amostras de queijo Prato.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Composição do queijo Prato.

A análise estatística dos resultados da composição dos queijos demonstrou que existe diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os coagulantes, exceto para a acidez titulável. O tipo de aquecimento influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) os teores de umidade, proteína total, gordura, pH e acidez titulável. A interação entre tipo de coagulante e forma de aquecimento apresentou diferença significativa nos teores de proteína total, gordura, sal, relação sal:umidade, gordura em base seca, pH e acidez titulável. A composição média dos queijos Prato obtidas nos diferentes tratamentos é apresentada na Tabela 1 .

Os resultados da Tabela 1 mostram que os queijos feitos com coagulante microbiano e aquecimento indireto foram significativamente diferentes dos fabricados com quimosina e aquecimento direto, em relação a umidade, proteína total e nitrogênio não protéico (NNP).

Queijos feitos com coagulante microbiano e aquecimento indireto apresentaram os menores teores de proteína total e os maiores teores de NNP. O oposto ocorreu com os queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto. Isso foi provavelmente devido a maior atividade proteolítica e estabilidade térmica da protease do *Rhizomucor miehei* em relação a quimosina. Além disso, a lavagem da massa efetuada no aquecimento direto pode ter contribuído para diminuir a quantidade de quimosina ativa retida na massa do queijo. Entretanto, o maior teor de umidade dos queijos fabricados com coagulante microbiano e aquecimento indireto em relação aos elaborados com quimosina e aquecimento direto pode também ser a causa da maior proteólise ocorrida uma vez que em queijos mais úmidos, a velocidade das reações aumenta.

Tabela 1. Composição média (n=6) obtida para os queijos Prato elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto (após cinco dias de fabricação).

Parâmetros	Aquecimento	Protease do <i>R. miehei</i>	Bovino	Quimosina
Umidade(%)	Direto	42,85 <sup>a, b</sup>	41,33 <sup>b</sup>	41,24 <sup>b</sup>
	Indireto	44,45 <sup>a</sup>	43,02 <sup>a, b</sup>	42,65 <sup>a, b</sup>
Gordura(%)	Direto	26,37 <sup>a</sup>	26,19 <sup>a</sup>	26,19 <sup>a</sup>
	Indireto	26,17 <sup>a</sup>	23,13 <sup>b</sup>	25,57 <sup>a, b</sup>
PT(%) <sup>1</sup>	Direto	25,70 <sup>a, b</sup>	24,81 <sup>a, b, c</sup>	26,05 <sup>a</sup>
	Indireto	23,84 <sup>c</sup>	24,52 <sup>b, c</sup>	25,52 <sup>a, b</sup>
Cinzas(%)	Direto	3,74 <sup>a, b</sup>	3,72 <sup>a, b</sup>	3,64 <sup>b</sup>
	Indireto	3,72 <sup>a, b</sup>	3,85 <sup>a</sup>	3,58 <sup>b</sup>
GBS(%) <sup>2</sup>	Direto	46,11 <sup>a</sup>	44,63 <sup>a, b</sup>	44,62 <sup>a, b</sup>
	Indireto	47,07 <sup>a</sup>	40,60 <sup>b</sup>	44,62 <sup>a, b</sup>
Sal (%)	Direto	1,06 <sup>b</sup>	1,38 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>
	Indireto	1,24 <sup>a</sup>	1,30 <sup>a</sup>	1,06 <sup>b</sup>
NNP(%) <sup>3</sup>	Direto	0,07 <sup>a, b</sup>	0,06 <sup>a, b, c</sup>	0,05 <sup>c</sup>
	Indireto	0,08 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b, c</sup>	0,05 <sup>b, c</sup>
S/U <sup>4</sup>	Direto	2,46 <sup>c</sup>	3,33 <sup>a</sup>	2,60 <sup>c</sup>
	Indireto	2,81 <sup>b, c</sup>	3,03 <sup>a, b</sup>	2,49 <sup>c</sup>
pH	Direto	5,39 <sup>b</sup>	5,44 <sup>b</sup>	5,62 <sup>a</sup>
	Indireto	5,38 <sup>b</sup>	5,35 <sup>b</sup>	5,34 <sup>b</sup>
Acidez	Direto	0,35 <sup>c</sup>	0,40 <sup>b, c</sup>	0,40 <sup>b, c</sup>
	Indireto	0,52 <sup>a</sup>	0,46 <sup>a, b</sup>	0,40 <sup>b, c</sup>

PT= Proteína Total (%NT x 6,38). <sup>2</sup>GBS= Gordura em base seca. <sup>3</sup>NNP= Conteúdo de nitrogênio não protéico. <sup>4</sup>S/U= Relação sal/ umidade. <sup>a, b, c</sup>: Para um mesmo parâmetro, médias com letra (s) em comum não diferem entre si a  $p \leq 0,05$ .

## *3.2 Análise Sensorial*

### *3.2.1 Atributos de aparência e textura.*

A análise estatística dos resultados dos atributos de aparência e propriedades de textura (Tabela 2) revelou que as características de aparência, como a cor e o mesclado foram influenciados significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo tipo de coagulante, forma de aquecimento da massa e o tempo de maturação.

A dureza, a elasticidade e a fraturabilidade dos queijos Prato foram influenciadas significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo tipo de coagulante, aquecimento da massa e o tempo de maturação. Entretanto, a adesividade apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o tipo de coagulante e o tempo de maturação.

Pode ser observado na Tabela 2, que a interação de mais alta ordem entre os fatores: tipo de coagulante, aquecimento da massa e tempo de maturação foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para as características de aparência como a cor e mesclado, e para as propriedades de textura como a dureza, elasticidade e adesividade. Assim, esses fatores foram dependentes entre si, e devem ser discutidos como um todo. A fraturabilidade foi dependente do tipo de coagulante, do aquecimento da massa e do tempo de maturação e suas interações, com exceção da interação de mais alta ordem entre os fatores.

A interação tipo de coagulante e aquecimento da massa foi verificada nos atributos de aparência e propriedades de textura dos queijos Prato no quinto dia de fabricação e aos 30 dias de maturação. A Fig. 3 mostra as características de aparência e de textura dos queijos com cinco dias de fabricação para os diferentes tratamentos.

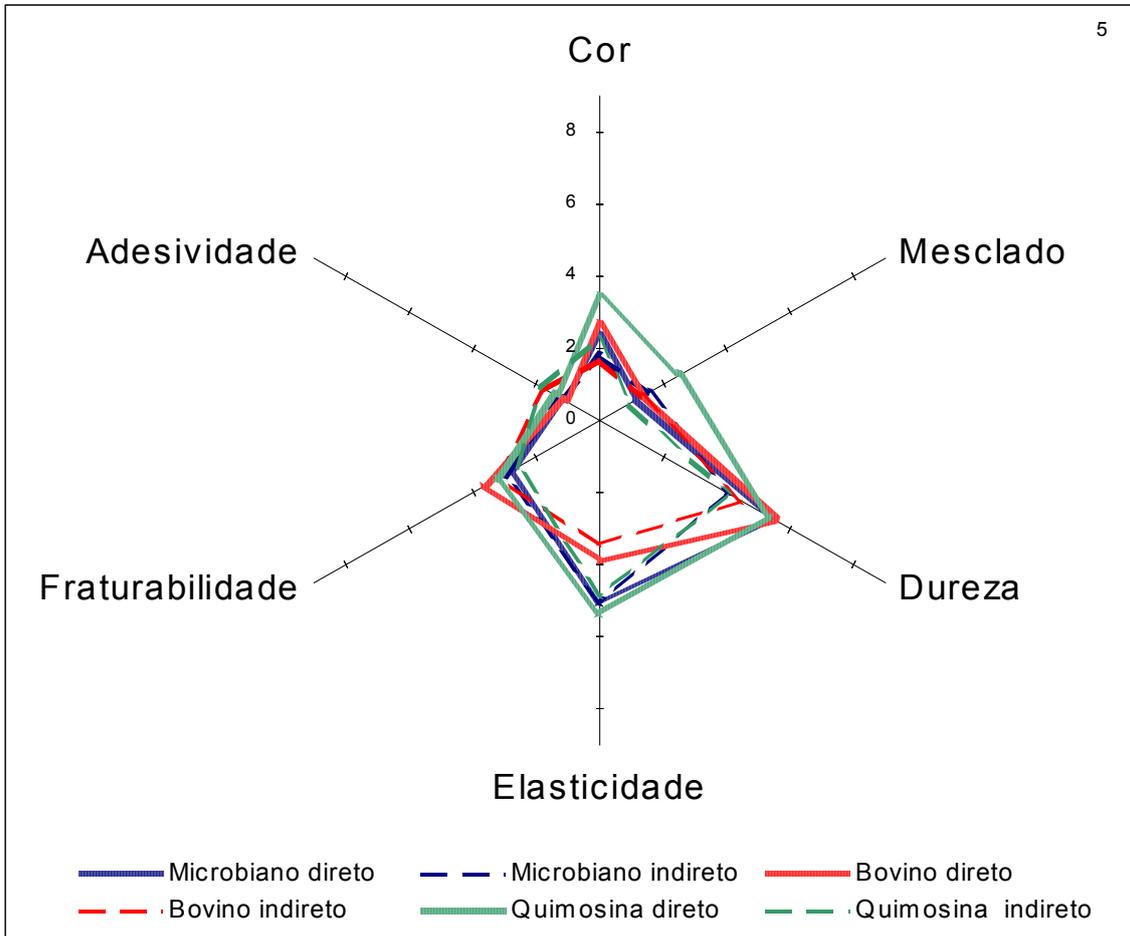


Fig. 3. Características de aparência e textura dos queijos Prato elaborados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, com aquecimento direto e indireto aos cinco dias de fabricação.

Tabela 2. Quadrado médio e probabilidades dos atributos de aparência e textura dos queijos Prato elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino, quimosina, por cozimento da massa com aquecimento direto e indireto.

Atributos	GL	Fatores								Erro
		Julgador	Coagulante (1)	Aq. Massa (2)	Tempo (3)	Interação 1*2	Interação 1*3	Interação 2*3	Interação 1*2*3	
		5	2	1	4	2	8	4	8	1045
Aparência										
Cor	QM	3,3525	76,5967	113,7502	10,6463	22,4336	2,9751	3,0737	1,8439	0,5068
	p	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0001*	0,0003*	
Mesclado	QM	30,8203	6,6658	12,9145	6,9220	8,8667	1,0007	2,0328	4,5268	0,4222
	p	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0157*	0,0008*	0,0000*	
Textura										
Dureza	QM	83,3823	73,8168	56,7188	162,8928	8,1487	5,6829	13,7234	4,8449	1,3504
	p	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0025*	0,0001*	0,0000*	0,0004*	
Elasticidade	QM	14,6900	76,5541	13,4804	11,2041	11,5096	3,6708	2,1422	4,9330	2,4703
	p	0,0000*	0,0000*	0,0197*	0,0012*	0,0097*	0,1578	0,4830	0,0438*	
Fraturabilidade	QM	43,8711	21,2746	4,9817	43,2664	12,4773	7,0087	4,3603	1,5356	1,1257
	p	0,0000*	0,0000*	0,0356*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0039*	0,2081	
Adesividade	QM	98,9108	23,2303	0,4877	71,5915	10,0784	5,2224	4,9870	10,4466	1,3213
	p	0,0000*	0,0000*	0,5436	0,0000*	0,0005*	0,0001*	0,0047*	0,0000*	

GL= grau de liberdade; QM= Quadrado médio; p= probabilidade. \* Estatisticamente significante (p<0,05).

Os valores médios das intensidades atribuídas pela equipe sensorial a cada um dos tratamentos estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Pode ser observado na Tabela 3 e Fig. 3 que os queijos fabricados com quimosina obtida por fermentação e aquecimento direto apresentaram maiores intensidades de cor e mesclado, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) dos queijos com protease do *R. miehei* e coalho bovino, com aquecimento direto e indireto. A cor do queijo é função do teor de gordura e do corante adicionado durante a fabricação. A análise dos resultados de composição do queijo (Tabela 1) sugere que o teor de umidade do queijo fabricado com quimosina e aquecimento direto podem ter contribuído para acentuar a cor desses queijos.

Tabela 3. Valores médios (n=36) atribuídos pelos provadores para a aparência e textura dos queijos Prato elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto com cinco dias de fabricação.

Atributos	Aquecimento	Protease do		
		<i>R.miehei</i>	Coalho Bovino	Quimosina
Aparência				
Cor	Direto	2,35 <sup>b</sup>	2,66 <sup>b</sup>	3,44 <sup>a</sup>
	Indireto	1,79 <sup>c</sup>	1,69 <sup>c</sup>	2,31 <sup>b</sup>
Mesclado	Direto	1,18 <sup>b, c</sup>	1,43 <sup>b</sup>	2,50 <sup>a</sup>
	Indireto	1,55 <sup>b</sup>	1,30 <sup>b, c</sup>	0,90 <sup>c</sup>
Textura				
Dureza	Direto	5,35 <sup>a</sup>	5,55 <sup>a</sup>	5,31 <sup>a</sup>
	Indireto	3,97 <sup>b</sup>	4,44 <sup>b</sup>	4,05 <sup>b</sup>
Elasticidade	Direto	5,06 <sup>a</sup>	3,89 <sup>b, c</sup>	5,38 <sup>a</sup>
	Indireto	5,05 <sup>a</sup>	3,41 <sup>c</sup>	4,86 <sup>a, b</sup>
Fraturabilidade	Direto	2,86 <sup>b, c</sup>	3,60 <sup>a</sup>	3,26 <sup>a, b</sup>
	Indireto	3,01 <sup>a, b, c</sup>	3,19 <sup>a, b, c</sup>	2,59 <sup>b, c</sup>
Adesividade	Direto	1,15 <sup>c</sup>	1,09 <sup>c</sup>	1,36 <sup>b, c</sup>
	Indireto	1,23 <sup>c</sup>	1,71 <sup>a, b</sup>	1,82 <sup>a</sup>

<sup>a, b, c</sup> : Para o mesmo atributo, médias com letra (s) em comum não diferem entre si a  $p \leq 0,05$ .

Não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na dureza devido ao tipo de coagulante quando a comparação foi feita com queijos que sofreram o mesmo tipo de aquecimento. O uso de aquecimento direto resultou em queijos

mais duros que os queijos fabricados com aquecimento indireto. Esses resultados podem ser explicados pela combinação de menor teor de umidade e efeito da lavagem da massa na quantidade de coagulante residual.

Os resultados da Tabela 3 mostram que não houve diferença de elasticidade entre os queijos fabricados com quimosina e protease do *R. miehei*, independente do tipo de aquecimento utilizado, aos 5 dias de fabricação. Em geral, quando se usou o coalho bovino, os queijos resultantes foram significativamente ( $p < 0,05$ ) menos elásticos que os fabricados com os outros coagulantes, com exceção dos queijos com coalho bovino direto que não apresentaram diferenças na elasticidade com relação aos queijos feitos com quimosina e aquecimento indireto.

Os queijos do tratamento com coalho bovino e com aquecimento direto apresentaram maior fraturabilidade, contudo sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos queijos fabricados com coalho bovino e coagulante microbiano por aquecimento indireto, e quimosina com aquecimento direto. Fatores como o teor de umidade mais elevado, aliado ao baixo teor de proteína do queijo fabricado com coalho bovino e aquecimento direto devem ter contribuído para a menor elasticidade e maior fraturabilidade desses queijos.

As maiores médias de adesividade dos queijos aos cinco dias fabricação foram atribuídas aos queijos com quimosina e coalho bovino indireto, que diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos demais queijos.

A Fig. 4 e a Tabela 4 apresentam as características de aparência e de textura dos queijos aos 30 dias de maturação. Os resultados mostram que os queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto apresentaram maior intensidade de cor com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os queijos com protease do *R. miehei* e coalho bovino, com aquecimento direto e indireto. A intensidade do mesclado não resultou em diferenças estatísticas entre os queijos dos diversos tratamentos.

Os queijos com protease do *R. miehei* e aquecimento direto apresentaram menor dureza, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos queijos com coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, e do microbiano indireto. Aos 30

dias de cura, a menor dureza dos queijos com protease do *R. miehei* pode ser atribuída a maior atividade proteolítica do coagulante e sua ação hidrolítica sobre a caseína do leite, ocorrida durante o tempo de maturação dos queijos.

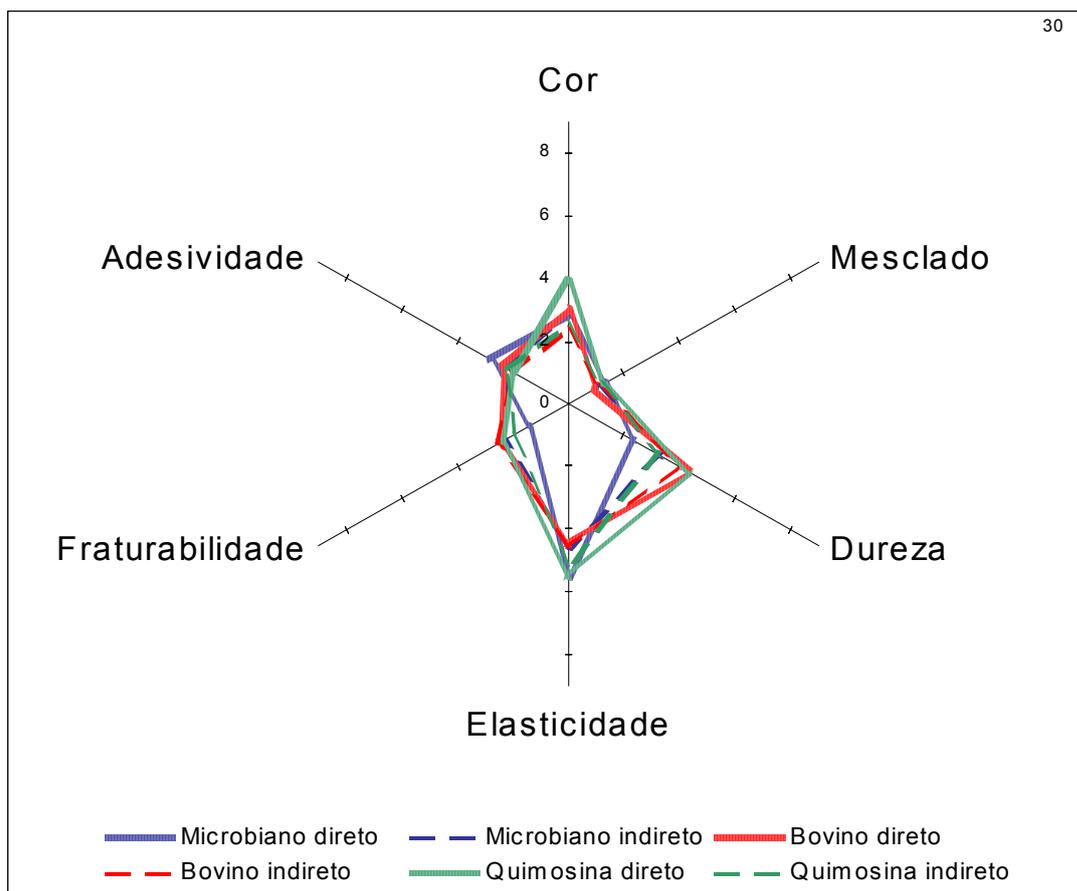


Fig. 4. Características de aparência e textura dos queijos Prato elaborado com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, com aquecimento direto e indireto aos 30 dias de maturação.

A elasticidade do queijo com coalho bovino e aquecimento direto diferiu significativamente dos queijos fabricados com coagulante microbiano e quimosina, com aquecimento direto. Entretanto, os queijos do tratamento bovino direto não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com o tratamento bovino indireto,

microbiano indireto e quimosina indireto. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os queijos com *R. miehei* direto e indireto, bem como entre os queijos com quimosina e aquecimento direto e indireto. Os queijos elaborados com coalho bovino e aquecimento indireto apresentaram maior fraturabilidade, contudo sem apresentar diferença significativa em relação aos queijos com protease do *R. miehei* e aquecimento indireto, coalho bovino e quimosina com aquecimento direto.

Tabela 4. Valores médios (n=36) atribuídos pelos provadores para a aparência e textura dos queijos Prato elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto com 30 dias maturação.

Atributos	Aquecimento	Protease do <i>R. miehei</i>	Coalho Bovino	Quimosina
Aparência				
Cor	Direto	2,85 <sup>b, c</sup>	3,02 <sup>b</sup>	3,91 <sup>a</sup>
	Indireto	2,97 <sup>b</sup>	2,41 <sup>d</sup>	2,54 <sup>c, d</sup>
Mesclado	Direto	1,26 <sup>a</sup>	0,97 <sup>a</sup>	1,20 <sup>a</sup>
	Indireto	1,03 <sup>a</sup>	1,05 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>
Textura				
Dureza	Direto	2,34 <sup>c</sup>	4,28 <sup>a</sup>	4,32 <sup>a</sup>
	Indireto	3,31 <sup>b</sup>	3,98 <sup>a, b</sup>	3,27 <sup>b</sup>
Elasticidade	Direto	5,56 <sup>a</sup>	4,48 <sup>b</sup>	5,51 <sup>a</sup>
	Indireto	4,56 <sup>a, b</sup>	4,53 <sup>b</sup>	5,12 <sup>a, b</sup>
Fraturabilidade	Direto	1,39 <sup>c</sup>	2,44 <sup>a, b</sup>	2,41 <sup>a, b</sup>
	Indireto	2,28 <sup>a, b</sup>	2,56 <sup>a</sup>	1,96 <sup>b, c</sup>
Adesividade	Direto	2,82 <sup>a</sup>	2,34 <sup>a, b</sup>	1,99 <sup>b</sup>
	Indireto	2,25 <sup>a, b</sup>	2,00 <sup>b</sup>	2,16 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup> : Para o mesmo atributo, médias com letra (s) em comum não diferem entre si a  $p \leq 0,05$ .

Entretanto, diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) dos queijos do tratamento microbiano com aquecimento direto e quimosina com aquecimento indireto. Os queijos elaborados com protease do *R. miehei* e aquecimento direto apresentaram menor fraturabilidade e não diferiram do tratamento quimosina indireto.

As maiores médias para a adesividade foram atribuídas para os queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei* e aquecimento direto, que foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos queijos elaborados com coalho bovino e aquecimento indireto, e quimosina por aquecimento direto e indireto da massa. Comparativamente, os queijos dos diferentes tratamentos aos 5 dias de fabricação e 30 dias de maturação mostraram uma evolução nos atributos de aparência e textura, principalmente para a dureza, e a adesividade.

As Figs. 3 e 4 ao mostrarem, respectivamente, os atributos de aparência e textura dos queijos aos 5 e 30 dias de fabricação são um “instantâneo” das características desses atributos num tempo determinado, mas não a tendência com o tempo. A ANOVA mostra se as variáveis (coagulante, aquecimento e tempo) foram significativas mas não quais tratamentos exibem uma correlação linear com o tempo e diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si ao longo do tempo de maturação.

Para isso a correlação entre os atributos sensoriais de aparência e textura e o tempo de maturação dos queijos foi analisada através do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) aceitando-se a existência de correlação ao nível de significância de  $p \leq 0,05$ . A Fig. 5 apresenta a evolução das características de aparência dos queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto, a cada 15 dias durante o período de maturação de 60 dias.

Pode ser observado na Fig. 5a que a intensidade da cor dos queijos do tratamento com protease do *Rhizomucor miehei* e aquecimento direto ( $R^2 = 0,8968$ ;  $p = 0,0145$ ), e o tratamento com quimosina direto ( $R^2 = 0,8064$ ;  $p = 0,0385$ ) tenderam a aumentar com o tempo de maturação em relação aos queijos dos demais tratamentos. Queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto apresentaram maior intensidade de cor que os outros queijos desde o quinto dia pós-fabricação. Como não há diferença de umidade e GBS (Tabela1) que possa justificar o ocorrido, é razoável supor que havia maior concentração de corante nesses queijos.

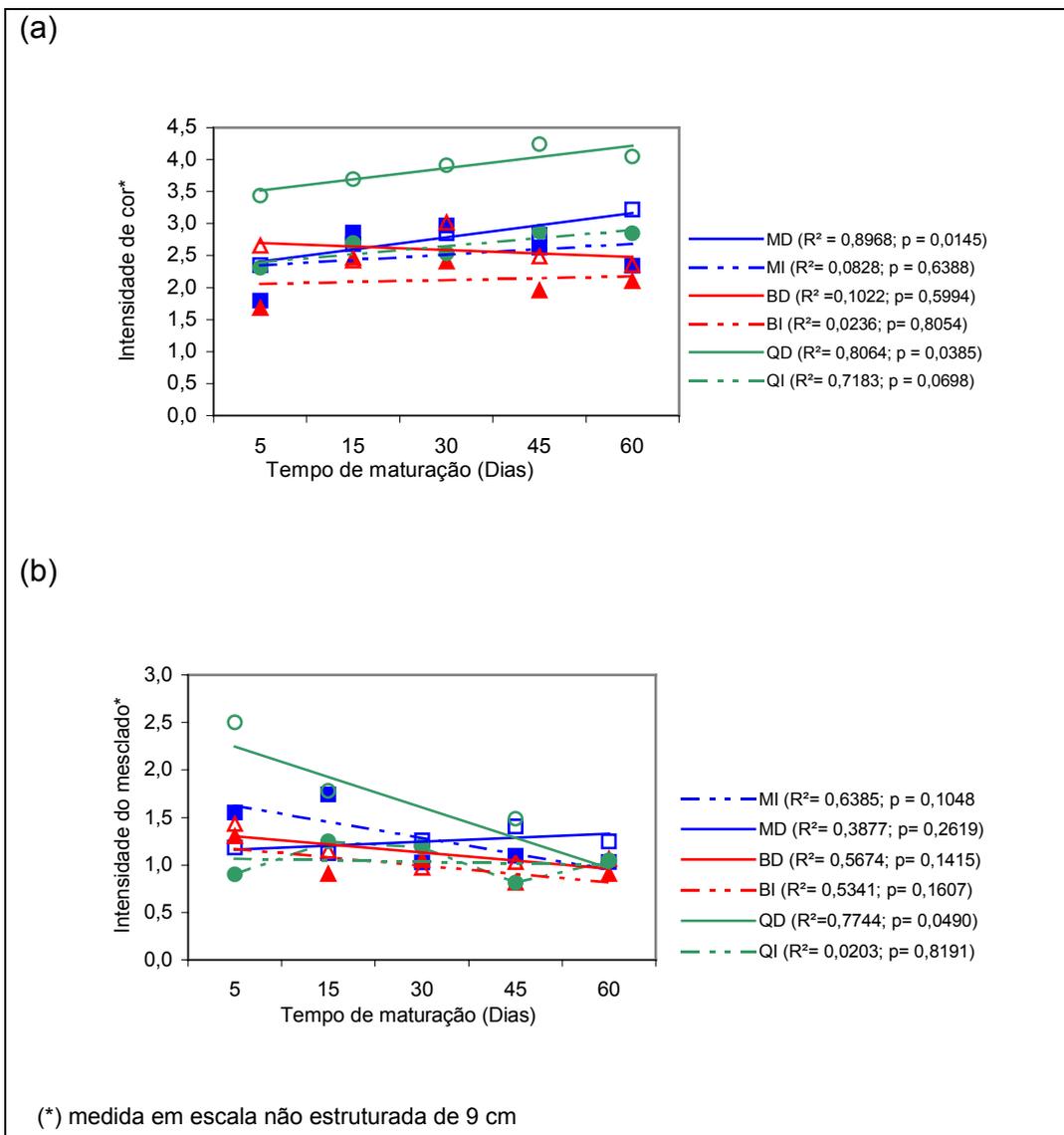


Fig. 5. Evolução das intensidades de cor (a) e mesclado (b) dos queijos Prato fabricados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina e aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. (MD = microbiano direto (□); MI = microbiano indireto (■); BD = bovino direto (Δ); BI = bovino indireto (▲); QD = quimosina direto (○); QI = quimosina indireto (●)).

A Fig. 5b mostra que a intensidade do mesclado tendeu a diminuir com o tempo de maturação para todos os tratamentos, sendo significativo para os queijos com quimosina e aquecimento direto ( $R^2 = 0,7744$  ;  $p = 0,0489$ ). A presença do mesclado no queijo indica defeito de umidade da massa. Durante a cura houve um equilíbrio da umidade, que resultou na diminuição da intensidade do mesclado na massa dos queijos. A análise das Figs. 3 e 4 mostra que após 30 dias de maturação não há diferenças na intensidade de mesclado entre os queijos, independente do tratamento utilizado.

As propriedades de textura dos queijos fabricados com a protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina foram significativamente afetadas ( $p < 0,05$ ) pelo tempo de maturação. As Figs. 6 e 7 apresentam as alterações dos atributos de textura com o tempo de maturação.

Pode ser observado na Fig. 6a que a dureza diminuiu com o tempo de maturação para todos os queijos ( $p < 0,05$ ). Em geral, apesar da maior dureza inicial dos queijos fabricados com aquecimento direto, as diferenças com os queijos fabricados com aquecimento indireto se tornaram menores ao final dos 60 dias de maturação. Aparentemente, no aquecimento direto, por efeito da lavagem da massa, menor quantidade de quimosina e coalho bovino residual foi retida na massa, resultando em menor hidrólise da  $\alpha_{S1}$ - caseína e, portanto, queijos mais duros no início da maturação (Fig. 6a, Tabelas 3 e 4). Os dados da Tabela 4 mostram que aos 30 dias de maturação não há diferença significativa na dureza dos queijos bovino e quimosina, quando feitos com o mesmo tipo de aquecimento ( $p < 0,05$ ; Tabela 3). Já queijos feitos com protease do *R. miehei* se mostram mais macios desde o início e apresentam uma taxa de diminuição da dureza mais abrupta com o tempo de maturação. Esse comportamento distinto é provavelmente devido ao fato da protease do *R. miehei* ser mais termorresistente e mais proteolítico que a quimosina e o coalho bovino (Guinee & Wilkinson, 1992). Além disso, coalhos microbianos não são afetados pelo pH, ao contrário da quimosina cuja retenção na massa é menor em pH mais elevado (5,4 -5,6) com o que ocorre em queijos de massa lavada.

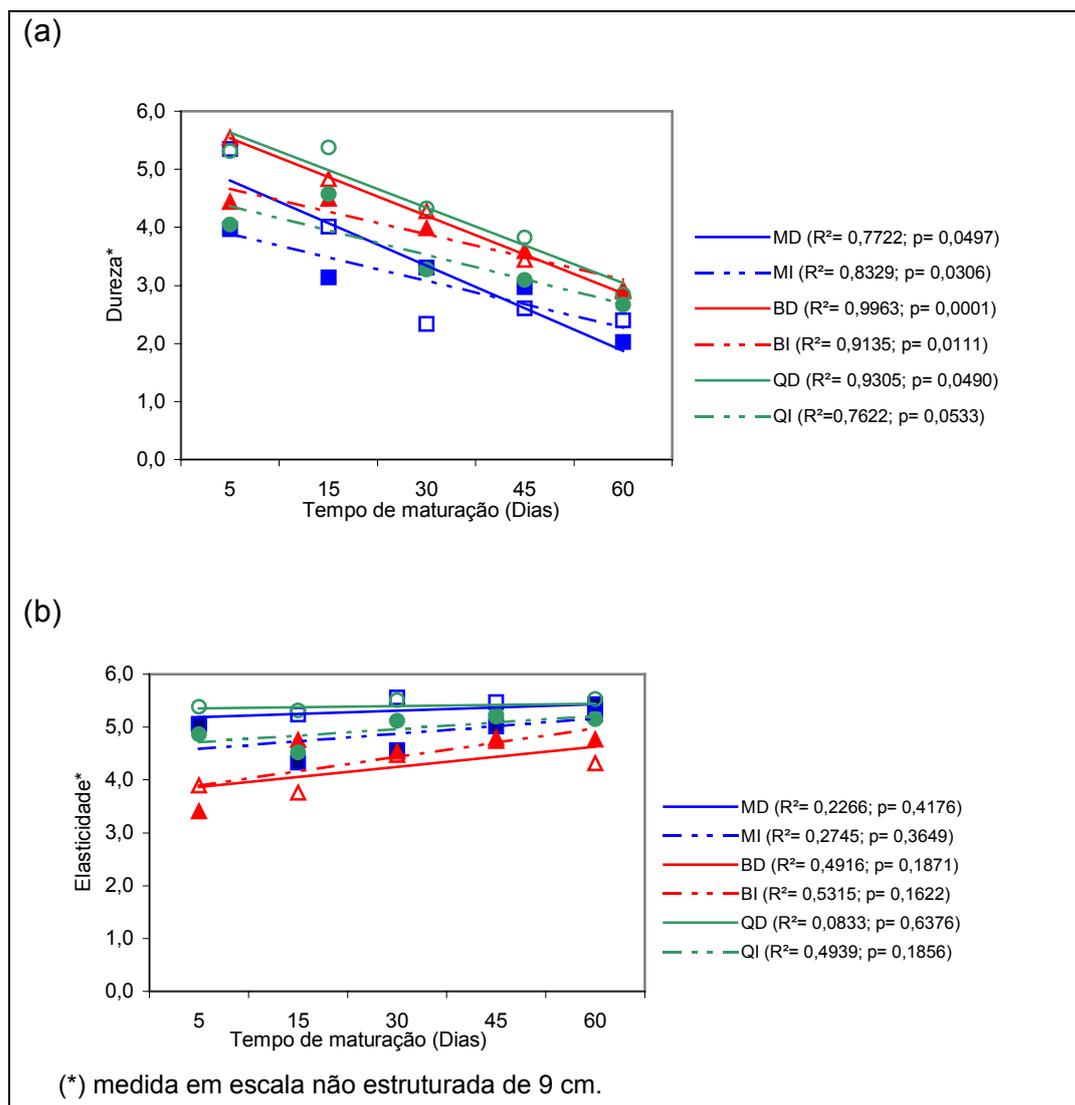


Fig. 6. Evolução da dureza (a) e elasticidade (b) para os queijos Prato fabricados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. (MD = microbiano direto (□); MI = microbiano indireto (■); BD = bovino direto (△); BI = bovino indireto (▲); QD = quimosina direto (○); QI = quimosina indireto (●)).

Pode ser observado na Fig. 6a que a dureza tende a diminuir com o tempo de maturação para todos queijos elaborados com os diferentes coagulantes independente do tipo de aquecimento. Nos queijos com coalho bovino e

aquecimento direto ( $R^2 = 0,9963$ ;  $p = 0,0001$ ), o tempo de maturação influenciou significativamente esse atributo de textura, seguido dos tratamentos quimosina direto ( $R^2 = 0,9305$ ;  $p = 0,0490$ ) e bovino indireto ( $R^2 = 0,9135$ ;  $p = 0,0111$ ). Essa tendência possivelmente se deve aos baixos teores de umidade e de nitrogênio não protéico observado nos queijos dos tratamentos bovino direto e quimosina direto (Tabela 1). O maior teor de NNP desses queijos já evidenciam uma menor atividade proteolítica, enquanto o menor teor de umidade resulta em menor velocidade da proteólise com o tempo de maturação. Os queijos elaborados com protease do *Rhizomucor miehei* foram os que se apresentaram menos firmes aos 60 dias de maturação, como resultado da maior atividade proteolítica desse coagulante. A menor média de dureza foi obtida para os queijos do tratamento com coagulante microbiano e aquecimento indireto.

A dureza representa uma importante característica de textura dos queijos visto que essa propriedade é modificada em razão do mecanismo de degradação proteolítica durante o processo de maturação. Nesse processo fica evidenciada a atividade proteolítica do coagulante e sua ação sobre a rede de caseína, e a maciez dos queijos fica condicionada a quantidade de ligações da  $\alpha_{s1}$ -caseína que são hidrolisadas durante a cura (Fox, 1988; Adda, Gripon & Vassal, 1982).

Na Fig. 6b pode ser visto que o tempo de maturação não influenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) a elasticidade. No entanto, o pH parece influenciar essa característica de textura. Observa-se que os queijos dos tratamentos quimosina direto e bovino direto apresentaram altos valores de pH. Creamer & Olson (1982) demonstraram que os queijos com pH elevado apresentaram uma estrutura plástica, e quando em pH baixo tendem a uma estrutura granular. Os queijos com quimosina e aquecimento direto apresentaram maior média para a elasticidade, e tendem a ser mais elásticos em relação aos queijos dos outros tratamentos.

As mudanças ocorridas na fraturabilidade e na adesividade dos queijos com o tempo de maturação podem ser observadas na Fig. 7. Nota-se que a fraturabilidade tende a decrescer nos queijos, enquanto a adesividade tende a aumentar com o tempo de maturação. Os queijos dos tratamentos com coalho

bovino direto ( $R^2 = 0,9708$ ;  $p = 0,0021$ ), coalho bovino indireto ( $R^2 = 0,8462$ ;  $p = 0,0268$ ), quimosina direto ( $R^2 = 0,9395$ ;  $p = 0,0064$ ) e quimosina indireto ( $R^2 = 0,9057$ ;  $p = 0,0127$ ) apresentaram menor tendência de fratura que os queijos com *R. miehei* com aquecimento direto e indireto. Os menores valores para a fraturabilidade foram obtidos para os queijos com coalho bovino e aquecimento direto, e quimosina com aquecimento direto e indireto.

Os queijos fabricados com protease do *R. miehei* e aquecimento direto ( $R^2 = 0,9531$ ;  $p = 0,0044$ ) apresentaram forte tendência de aumento de adesividade durante o tempo de maturação, seguido do tratamento bovino direto ( $R^2 = 0,9210$ ;  $p = 0,0097$ ) e quimosina indireto ( $R^2 = 0,7959$ ;  $p = 0,0418$ ).

As maiores médias para a adesividade foram obtidas para o tratamento microbiano direto. Pode ser observado na Tabela 1, que esses queijos apresentaram teor elevado de nitrogênio não protéico (NNP) e umidade. Essas características indicam a atividade proteolítica do coagulante sobre a matriz protéica, resultando numa textura menos firme e adesiva.

### 3.2.2 Atributos de sabor

A análise estatística dos resultados para os atributos do sabor dos queijos fabricados com o coagulante microbiano, coalho bovino e quimosina por aquecimento direto e indireto podem ser observados na Tabela 5.

Verificou-se que o tipo de coagulante influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) os odores de leite, doce de leite, azedo e manteiga. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) devido ao coagulante para o gosto salgado, o sabor de leite, o sabor de ranço e o residual gorduroso. Mas, tendo influenciado significativamente os demais atributos do sabor.

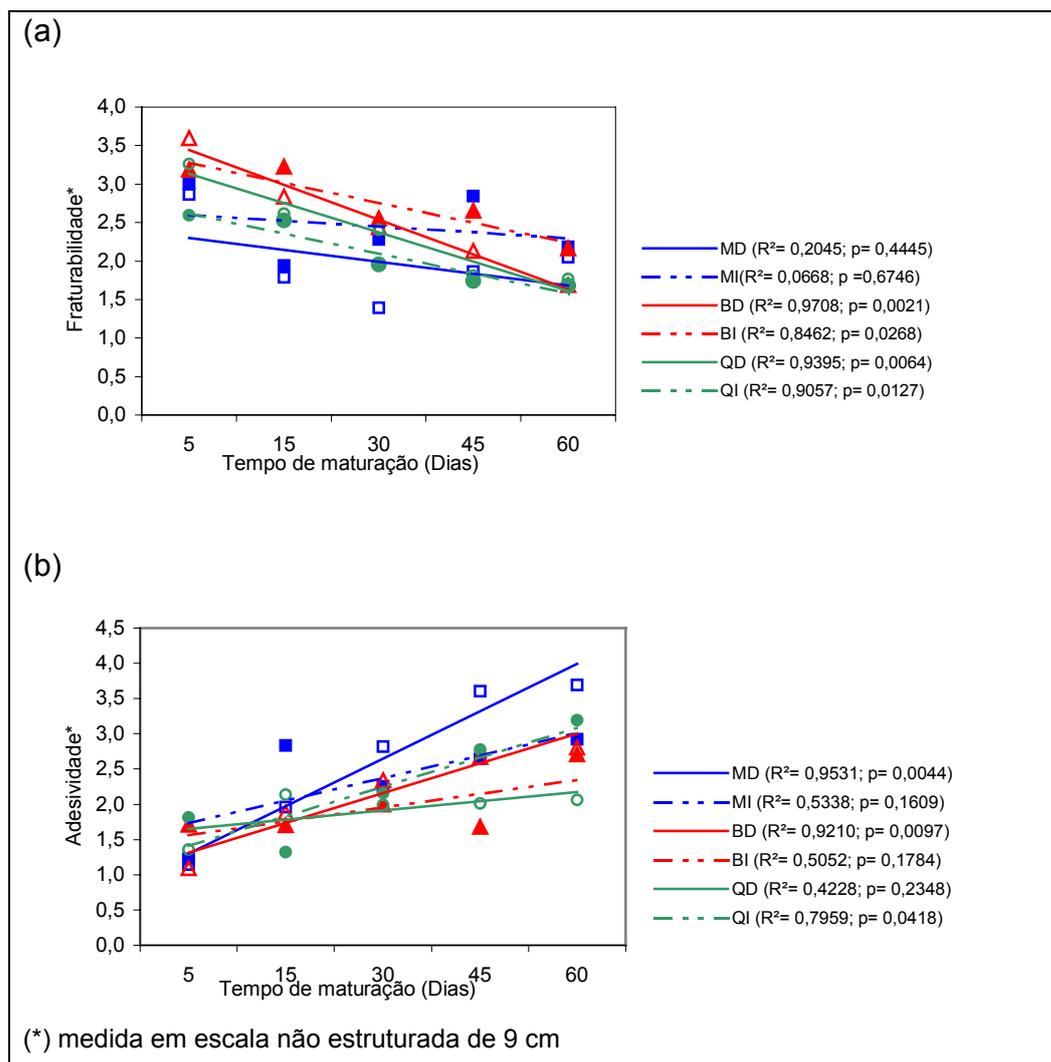


Fig.7. Evolução da fraturabilidade (a) e adesividade (b) para os queijos Prato fabricados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina e aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. (MD = microbiano direto (□); MI = microbiano indireto(■); BD = bovino direto (△); BI = bovino indireto (▲); QD = quimosina direto (○); QI = quimosina indireto (●)).

TABELA 5. ANOVA para os atributos de sabor dos queijos elaborados com protease de *R.miehei*, coalho bovino e quimosina com aquecimento direto e indireto.

Atributos		Fatores									
		Julgador	Coagulante (1)	Aq. Massa (2)	Tempo (3)	Interação 1*2	Interação 1*3	Interação 2*3	Interação 1*2*3	Erro	
Odor	Leite	GL	5	2	1	4	2	8	4	8	1045
		QM	92,8879	14,6009	36,8890	5,8098	43,1724	7,0490	7,0327	2,7711	0,9205
		p	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0001*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0024*
	Doce de leite	QM	90,7361	11,5440	35,7885	5,4260	26,9905	1,9923	3,3874	2,2319	0,8112
		p	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0123*	0,0023*	0,0052*	
	Azedo	QM	62,3690	5,9714	1,8336	8,5975	14,0346	1,5684	0,9465	1,4317	0,6234
p		0,0000*	0,0001*	0,0867	0,0000*	0,0000*	0,0104*	0,1947	0,0193*		
Manteiga	QM	101,2673	22,9529	0,7895	27,1414	0,0601	2,9893	5,7630	7,8526	1,0268	
	p	0,0000*	0,0000*	0,3808	0,0000*	0,9431	0,0032*	0,0002*	0,0000*		
Gosto	Salgado	QM	54,5866	0,7360	2,3380	1,5018	9,4148	3,5350	6,5057	3,1341	0,7869
		p	0,0000*	0,3928	0,0851	0,1068	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0001*	
	Doce	QM	52,1008	5,0405	1,8833	0,8514	1,0587	2,1109	0,4137	0,7036	0,4304
		p	0,0000*	0,0000*	0,0367*	0,0957	0,0859	0,0000*	0,4278	0,1106	
	Amargo	QM	135,2397	19,5201	1,0767	34,6111	14,1325	5,9728	1,3275	1,5325	0,9535
		p	0,0000*	0,0000*	0,2882	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,2346	0,1183	
Sabor	Leite	QM	93,8794	1,6766	1,0893	11,0318	11,6005	1,4560	2,2621	4,3445	0,8626
		p	0,0000*	0,1437	0,2614	0,0000*	0,0000*	0,0971	0,0335*	0,0000*	
	Manteiga	QM	88,5975	17,1815	2,5911	18,2143	1,0691	4,2640	3,3364	3,9891	0,9600
		p	0,0000*	0,0000*	0,1007	0,0000*	0,3287	0,0000*	0,0079*	0,0001*	
	Ranço	QM	36,5394	0,3581	0,0696	2,1797	1,4770	0,4308	0,3761	1,0444	0,2251
		p	0,0000*	0,2043	0,5783	0,0000*	0,0015*	0,0546	0,1545	0,0000*	
Residual	Salgado	QM	73,7313	7,3062	0,4006	3,6626	10,8200	0,5480	1,6874	7,0239	0,7448
		p	0,0000*	0,0001*	0,4635	0,0006*	0,0000*	0,6599	0,0603	0,0000*	
	Gorduroso	QM	94,4006	1,5696	6,9120	19,5412	0,3840	1,5107	1,7877	4,3595	0,7956
		p	0,0000*	0,1396	0,0033*	0,0000*	0,6172	0,0568	0,0621	0,0000*	
	Amargo	QM	115,3846	79,8933	2,9558	64,1379	14,8665	10,7054	1,0184	2,7879	1,1931
		p	0,0000*	0,0000*	0,1158	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,4914	0,0173*	

O tipo de aquecimento da massa afetou significativamente os odores de leite, doce de leite, o gosto doce e o residual gorduroso. O tempo de maturação foi significativo ( $p < 0,05$ ) para todos os atributos do odor, do sabor e para o gosto amargo. A interação entre os fatores tipo de coagulante, aquecimento da massa e tempo de maturação foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para todos os odores, gosto salgado e todos os atributos do sabor.

A Fig. 8 apresenta as características de odor e sabor dos queijos com os coagulantes (protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina) e aquecimento direto e indireto aos cinco dias de fabricação. Os valores médios das intensidades dos atributos de odor e sabor para os queijos atribuídos pela equipe sensorial são mostrados na Tabela 6.

Observou-se que nos queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto, o odor de leite foi intensamente perceptível, obtendo a maior média e diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais tratamentos. Os queijos do tratamento com quimosina e aquecimento indireto tiveram a maior média para o odor de doce de leite, porém sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos queijos com coalho bovino direto e indireto, e microbiano direto. Entretanto, apresentou diferenças significativas em relação aos queijos dos tratamentos com protease do *R.miehei* indireto e quimosina direto.

O odor azedo dos queijos com quimosina e aquecimento direto diferiu significativamente do tratamento bovino e aquecimento direto, porém sem diferenças para os tratamentos com microbiano direto e indireto, quimosina indireto e bovino indireto. Os queijos com quimosina e aquecimento direto apresentaram a maior média para o odor de manteiga, resultando em diferenças estatística em relação aos demais tratamentos.

A presença de algum odor marcante nos queijos aos 5 dias após fabricação, foi influenciada pela forma de aquecimento no cozimento da massa e pelo tipo de coagulante empregado. Fox et al. (2000) verificaram que o cozimento por lavagem da massa minimiza as variações de pH e concentração de lactose na massa, tendo um efeito positivo sobre a qualidade do queijo apresentando um sabor mais brando. A presença da lactose residual pode levar à reação de Maillard

quando o queijo é aquecido. A sensação percebida do odor de doce de leite está associada à sensação de um odor de leite caramelizado. A quimosina, por estar na forma pura e ter baixa atividade proteolítica parece ter contribuído para provocar poucas mudanças nos atributos normalmente associados ao leite. É visível na Fig. 8 que os queijos feitos com quimosina e aquecimento direto apresentaram as maiores médias naqueles atributos considerados desejáveis num queijo fresco (odor de leite, odor de manteiga, sabor de leite e sabor de manteiga). Verificou-se que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para o gosto salgado nos queijos com coalho bovino e aquecimento direto e indireto, protease do *R.miehei* e aquecimento indireto e quimosina direto. Porém, esses tratamentos foram significativos ( $p < 0,05$ ) em relação ao tratamento com protease do *R.miehei* direto e quimosina indireto. Entretanto, nos queijos com coalho e aquecimento direto o gosto salgado foi mais perceptível.

A intensidade do gosto doce para os queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto e indireto foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que a dos queijos com protease do *R.miehei* e aquecimento indireto, porém não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais.

Não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o gosto amargo nos queijos devido as diferenças no tipo de coagulante e cozimento da massa, aos cinco dias de fabricação. O gosto amargo é consequência do acúmulo de peptídeos hidrofóbicos originários da degradação da  $\beta$ -caseína (Fox,1998) e nos 5 dias pós - fabricação do queijo, não houve tempo para a formação do gosto amargo. A mesma explicação pode ser dada para o fato de, aos 5 dias de fabricação, diferenças no tipo de coagulante e aquecimento da massa não terem resultado em diferenças na intensidade do residual amargo dos queijos.

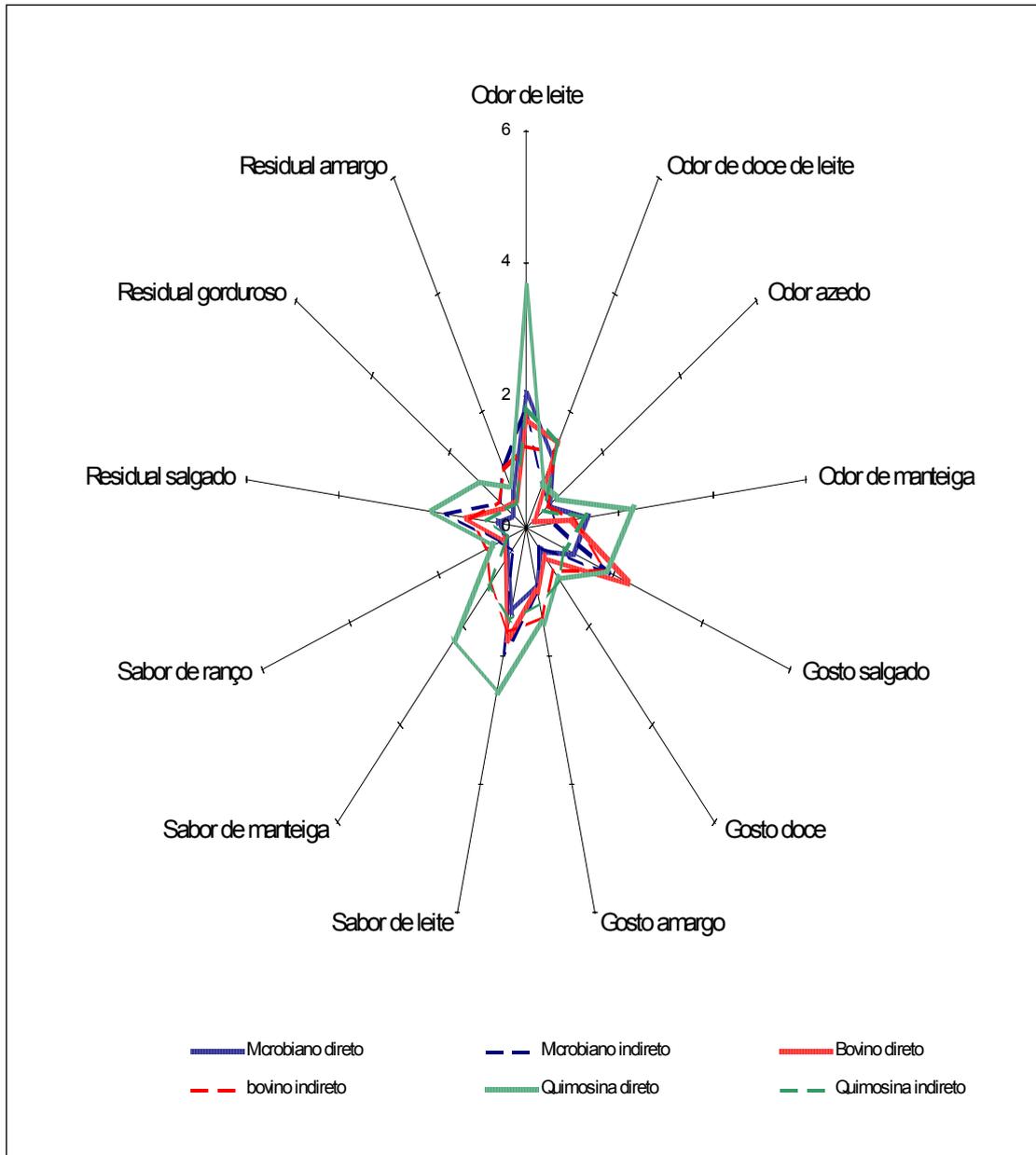


Fig. 8. Características de odor e sabor dos queijos Prato fabricados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, com aquecimento direto e indireto aos 5 dias de fabricação.

Tabela 6. Valores médios (n=36) atribuídos pelos provadores para os atributos de odor e sabor dos queijos Prato elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto com 5 dias de fabricação.

Atributos	Aquecimento	Protease do <i>R.miehei</i>	Coalho Bovino	Quimosina
Odor de leite	Direto	2,00 <sup>b</sup>	1,67 <sup>b</sup>	3,63 <sup>a</sup>
	Indireto	1,78 <sup>b</sup>	1,23 <sup>b</sup>	1,81 <sup>b</sup>
Odor de doce de leite	Direto	1,19 <sup>a,b,c</sup>	1,46 <sup>a,b</sup>	0,77 <sup>c,b</sup>
	Indireto	0,69 <sup>c</sup>	1,29 <sup>a,b,c</sup>	1,46 <sup>a</sup>
Odor azedo	Direto	0,61 <sup>a,b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,78 <sup>a</sup>
	Indireto	0,59 <sup>a,b</sup>	0,58 <sup>a,b</sup>	0,44 <sup>a,b</sup>
Odor de manteiga	Direto	1,34 <sup>b</sup>	0,99 <sup>b,c</sup>	2,31 <sup>a</sup>
	Indireto	0,62 <sup>c</sup>	0,98 <sup>b,c</sup>	1,28 <sup>b,c</sup>
Gosto salgado	Direto	1,07 <sup>b,c</sup>	2,33 <sup>a</sup>	1,83 <sup>a</sup>
	Indireto	1,90 <sup>a</sup>	1,80 <sup>a,b</sup>	0,86 <sup>c</sup>
Gosto doce	Direto	0,46 <sup>a,b</sup>	0,60 <sup>a,b</sup>	1,02 <sup>a</sup>
	Indireto	0,38 <sup>b</sup>	0,86 <sup>a,b</sup>	1,05 <sup>a</sup>
Gosto amargo	Direto	0,89 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	1,48 <sup>a</sup>
	Indireto	1,01 <sup>a</sup>	1,41 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>
Sabor de leite	Direto	1,30 <sup>b</sup>	1,74 <sup>b</sup>	2,57 <sup>a</sup>
	Indireto	1,94 <sup>a,b</sup>	1,63 <sup>b</sup>	1,45 <sup>b</sup>
Sabor de manteiga	Direto	0,61 <sup>b,c</sup>	0,69 <sup>b,c</sup>	2,23 <sup>a</sup>
	Indireto	0,44 <sup>c</sup>	1,15 <sup>b</sup>	1,21 <sup>b</sup>
Sabor de ranço	Direto	0,46 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,74 <sup>a</sup>
	Indireto	0,59 <sup>a</sup>	0,89 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>
Residual salgado	Direto	0,61 <sup>c</sup>	1,29 <sup>b,c</sup>	2,04 <sup>a</sup>
	Indireto	1,69 <sup>a,b</sup>	1,17 <sup>b,c</sup>	0,84 <sup>c</sup>
Residual gorduroso	Direto	0,35 <sup>b</sup>	0,56 <sup>b</sup>	1,23 <sup>a</sup>
	Indireto	0,69 <sup>a,b</sup>	0,71 <sup>a,b</sup>	0,53 <sup>b</sup>
Residual amargo	Direto	0,63 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>
	Indireto	1,08 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>	0,42 <sup>a</sup>

<sup>a, b, c</sup> : Para o mesmo atributo, médias com letra (s) em comum não diferem entre si a  $p \leq 0,05$ .

Verificou-se que a intensidade do sabor de leite foi maior nos queijos com quimosina e aquecimento direto, não diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) dos queijos com protease do *R. miehei* e aquecimento indireto, porém diferindo dos queijos com coalho bovino direto e indireto, quimosina indireto e protease do *R. miehei* direto. Não houve diferença significativa para o sabor de leite entre o

tratamento microbiano indireto e os tratamentos microbiano direto, bovino direto e indireto, e quimosina indireto.

A percepção do sabor de manteiga foi maior nos queijos com quimosina e aquecimento direto que diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) dos queijos com quimosina e aquecimento indireto, coalho bovino direto e indireto, protease do *R. miehei* e aquecimento direto e indireto. Os queijos dos tratamentos quimosina indireto, bovino direto e indireto, microbiano direto não diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si, mas os tratamentos com quimosina e bovino indireto foram significativamente diferentes para o tratamento microbiano indireto. Os queijos dos tratamentos com coalho bovino direto, microbiano direto e indireto não resultam em diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre si para o sabor de manteiga.

Não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na intensidade do sabor de ranço dos queijos devido ao tipo de coagulante ou aquecimento empregado. O sabor de ranço é consequência da lipólise e esse fenômeno só poderia ter ocorrido nesse tempo de maturação se o leite já tivesse sofrido ação da lipase natural do leite, facilmente destruída pela pasteurização (Fox et al.,2000). Lipases microbianas, originárias do fermento láctico, que atuam na cura do queijo Prato, normalmente se manifestam mais tardiamente, após lise celular (Walstra et al.,1999)

A proteólise é fundamental na formação do sabor, permitindo transformar a paracaseína, que é insípida, em produtos de degradação com sabores característicos. Os peptídeos podem ser amargos, enquanto que os aminoácidos podem ter gostos específicos como doces ou amargos vindo contribuir para o sabor básico do queijo (Walstra et al,1999).

A intensidade do residual salgado foi significativamente maior nos queijos com quimosina e aquecimento direto, que não diferiu dos queijos com protease do *R. miehei* indireto, mas foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) para os queijos com quimosina indireto, coalho bovino direto e indireto, e protease do *R. miehei* direto. Os tratamentos quimosina indireto, bovino direto e indireto, microbiano direto não diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si. O tratamento microbiano

indireto diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do microbiano direto, mas não dos tratamentos bovino direto e indireto para o residual salgado.

O residual gorduroso foi mais perceptível nos queijos com quimosina e aquecimento direto diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) dos queijos com quimosina indireto, coalho bovino direto, e com protease do *R. miehei* direto. Entretanto, não diferiu dos queijos com coalho bovino indireto e com protease do *R. miehei* indireto. Os queijos dos tratamentos microbiano direto e indireto, bovino direto e indireto, e quimosina indireto não foram significativamente diferentes entre si para o residual gorduroso.

A Fig. 9 apresenta a evolução das características de odor e sabor dos queijos fabricados com diferentes tipos de coagulantes e aquecimento, aos 30 dias de maturação. Os valores médios das intensidades dos atributos de odor e sabor para os queijos atribuídos pela equipe sensorial estão apresentados na Tabela 7.

Observa-se na Fig. 9 e Tabela 7, que o odor de leite dos queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto foi menor aos 30 dias do que aos 5 dias de fabricação. O tratamento quimosina direto não diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) dos tratamentos com coalho bovino direto e indireto, e microbiano indireto, porém foi significativamente diferente dos queijos do tratamento quimosina indireto e com protease do *R. miehei* direto. Os queijos dos tratamentos com coalho bovino direto e indireto, quimosina indireto, microbiano direto e indireto não diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si.

O odor de doce de leite foi percebido mais intensamente nos queijos com coalho bovino e aquecimento direto, não tendo havido diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos queijos com coalho bovino indireto, quimosina indireto, com protease do *R. miehei* direto e indireto. Entretanto, os queijos do tratamento com coalho bovino direto diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) do tratamento com quimosina direto. A intensidade do odor azedo foi maior para os queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto, que não diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) dos queijos com coalho bovino direto e indireto, e com protease do *R. miehei* indireto, mas foram mais intensos que os queijos com

protease do *R. miehei* direto e quimosina indireto. Não houve diferença na intensidade de odor azedo dos queijos microbiano direto e indireto, bovino direto e indireto, e quimosina indireto.

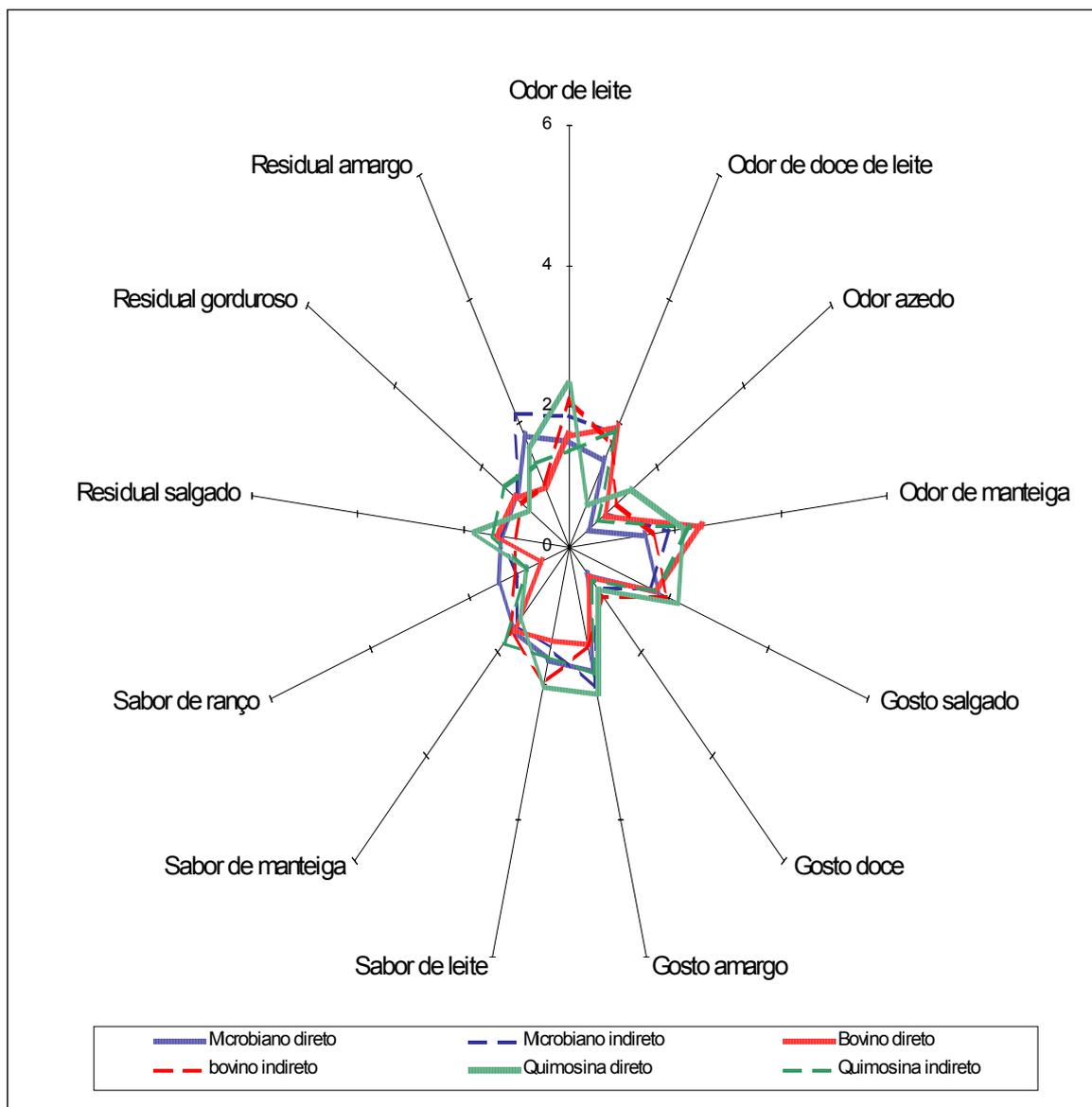


Fig. 9. Características de odor e sabor dos queijos Prato fabricados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto aos 30 dias de maturação.

Tabela 7. Valores médios (n=36) da intensidade dos atributos de odor e sabor atribuídos pelos provadores para os queijos Prato elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto com 30 dias de maturação.

Atributos	Aquecimento	Protease do <i>R.miehei</i>	Coalho Bovino	Quimosina
Odor de leite	Direto	1,52 <sup>b</sup>	1,60 <sup>a,b</sup>	2,30 <sup>a</sup>
	Indireto	1,87 <sup>a,b</sup>	2,09 <sup>a,b</sup>	1,37 <sup>b</sup>
Odor de doce de leite	Direto	1,39 <sup>a,b</sup>	1,95 <sup>a</sup>	0,69 <sup>b</sup>
	Indireto	1,81 <sup>a</sup>	1,69 <sup>a</sup>	1,89 <sup>a</sup>
Odor azedo	Direto	0,43 <sup>b</sup>	0,82 <sup>a,b</sup>	1,44 <sup>a</sup>
	Indireto	0,84 <sup>a,b</sup>	1,09 <sup>a,b</sup>	0,65 <sup>b</sup>
Odor de manteiga	Direto	1,38 <sup>c</sup>	2,52 <sup>a</sup>	2,14 <sup>a,b,c</sup>
	Indireto	1,91 <sup>a, b, c</sup>	1,56 <sup>b, c</sup>	2,28 <sup>b, c</sup>
Gosto salgado	Direto	1,79 <sup>a</sup>	1,73 <sup>a</sup>	2,17 <sup>a</sup>
	Indireto	1,62 <sup>a</sup>	1,95 <sup>a</sup>	1,72 <sup>a</sup>
Gosto doce	Direto	0,52 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,77 <sup>a</sup>
	Indireto	0,80 <sup>a</sup>	0,96 <sup>a</sup>	0,63 <sup>a</sup>
Gosto amargo	Direto	1,79 <sup>a</sup>	1,42 <sup>a</sup>	2,15 <sup>a</sup>
	Indireto	2,03 <sup>a</sup>	1,46 <sup>a</sup>	1,85 <sup>a</sup>
Sabor de leite	Direto	1,64 <sup>a</sup>	1,37 <sup>a</sup>	2,01 <sup>a</sup>
	Indireto	1,47 <sup>a</sup>	1,98 <sup>a</sup>	1,61 <sup>a</sup>
Sabor de manteiga	Direto	1,57 <sup>a</sup>	1,56 <sup>a</sup>	1,40 <sup>a</sup>
	Indireto	1,51 <sup>a</sup>	1,66 <sup>a</sup>	1,83 <sup>a</sup>
Sabor de ranço	Direto	1,43 <sup>a</sup>	0,54 <sup>b</sup>	0,86 <sup>a,b</sup>
	Indireto	1,06 <sup>a,b</sup>	1,10 <sup>a,b</sup>	0,84 <sup>a,b</sup>
Residual salgado	Direto	1,28 <sup>a,b</sup>	1,38 <sup>a,b</sup>	1,79 <sup>a</sup>
	Indireto	1,35 <sup>a,b</sup>	1,02 <sup>b</sup>	1,44 <sup>a,b</sup>
Residual gorduroso	Direto	1,21 <sup>a</sup>	1,21 <sup>a</sup>	0,93 <sup>a</sup>
	Indireto	1,21 <sup>a</sup>	1,08 <sup>a</sup>	1,50 <sup>a</sup>
Residual amargo	Direto	1,79 <sup>a,b</sup>	0,98 <sup>b</sup>	1,61 <sup>a,b</sup>
	Indireto	2,14 <sup>a</sup>	1,02 <sup>b</sup>	1,34 <sup>a,b</sup>

<sup>a, b, c</sup> : Para o mesmo atributo, médias com letra (s) em comum não diferem entre si a  $p \leq 0,05$ .

Os queijos elaborados com coalho bovino e aquecimento direto obtiveram a maior intensidade do odor de manteiga diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) dos queijos feitos com coalho bovino e aquecimento indireto, do quimosina indireto e com protease do *R.miehei* direto; porém, sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto, e com protease do *R. miehei* indireto. Os queijos dos tratamentos com quimosina direto e indireto,

microbiano direto e indireto, e bovino indireto não diferiram significativamente entre si para odor de manteiga.

Aos 30 dias de maturação não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os atributos gosto salgado, doce e amargo dos queijos devido às diferenças no tipo de coagulante ou aquecimento da massa. O mesmo ocorreu para os atributos de sabor de leite e manteiga, não havendo diferenças entre os queijos (Tabela 7).

Os queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto apresentaram a maior média para o residual salgado, diferindo significativamente dos queijos com coalho bovino indireto, mas sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os queijos com protease do *R.miehei* direto e indireto, coalho bovino direto e quimosina indireto. Os tratamentos microbiano direto e indireto, bovino direto e indireto, e quimosina indireto não diferiram entre si. Não foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o residual gorduroso entre os queijos dos diferentes tratamentos, porém os queijos do tratamento com quimosina indireto obtiveram a maior média para esse atributo.

O residual amargo dos queijos feitos com protease do *R. miehei* e aquecimento indireto foram mais intenso ( $p < 0,05$ ) que o dos queijos com coalho bovino direto e indireto. Os queijos dos tratamentos quimosina direto e indireto, bovino direto e indireto, e microbiano direto não diferiram entre si. As maiores médias do residual amargo foram obtidas para os queijos do tratamento com *R. miehei* direto e indireto, provavelmente devido a maior atividade proteolítica desse coagulante.

A correlação entre os atributos sensoriais de odor e sabor com o tempo de maturação dos queijos foi analisada através do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) aceitando-se a existência de correlação linear ao nível de significância de  $p \leq 0,05$ . As Figs. 10, 11,12,13, e 14 apresentam a evolução das características de odor e sabor dos queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto, a cada 15 dias durante o período de maturação de 60 dias.

A Fig. 10 mostra a evolução dos odores de leite (a) e doce de leite (b) com o tempo de maturação.

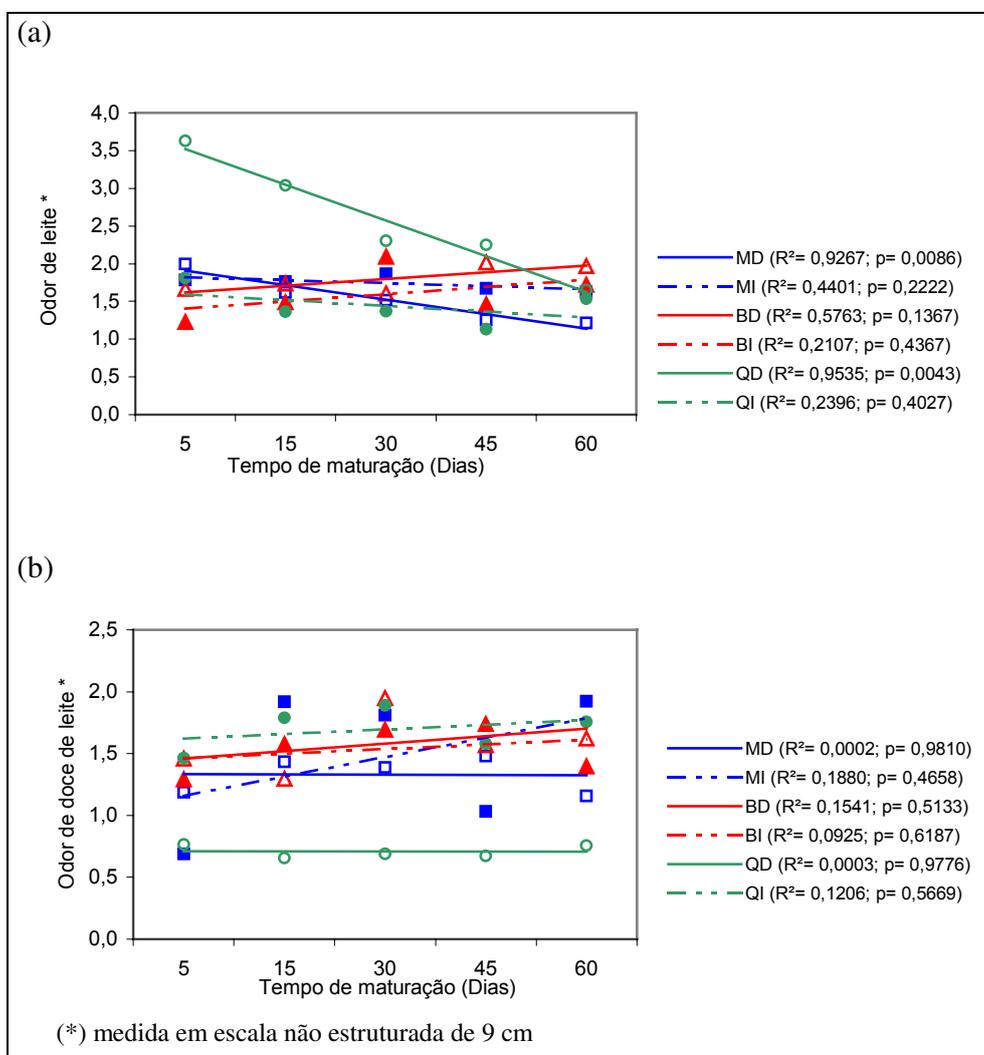


Fig. 10. Evolução do odor de leite (a), e de doce de leite (b) dos queijos Prato elaborados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, durante o tempo de maturação. (MD=microbiano direto (□); MI= microbiano indireto (■); BD = bovino direto (△) ; B I = bovino indireto (▲); QD = quimosina direto (○); QI = quimosina indireto (●)).

Pode ser observado na Fig.10a que a intensidade do odor de leite tende a diminuir com o tempo de maturação e foi significativo para os queijos com quimosina e aquecimento direto ( $R^2 = 0,9535$ ;  $p = 0,0043$ ) e protease do *R. miehei* e aquecimento direto ( $R^2 = 0,9267$ ;  $p = 0,0086$ ).

A maior intensidade do odor de leite aos 60 dias de maturação foi percebida nos queijos com coalho bovino e aquecimento indireto. O odor de doce de leite foi percebido com maior intensidade nos queijos com protease do *R. miehei* e aquecimento indireto. Este atributo apresentou oscilações ao longo da cura, e os queijos com aquecimento indireto obtiveram valores maiores em relação aos queijos com aquecimento direto. Possivelmente, a presença da lactose residual nos queijos com aquecimento indireto, podem levar a reação de degradação de açúcares. Assim, a sensação percebida do odor de doce de leite está associado à sensação de um odor de leite caramelizado.

A Fig. 11 apresenta a evolução dos odores azedo e de manteiga com o tempo de maturação. Houve uma tendência de aumento do odor azedo com o tempo de cura para todos tratamentos (Fig.11a), embora tenha sido significativamente linear somente para o tratamento com coalho bovino direto ( $R^2 = 0,9034$ ;  $p = 0,0131$ ) e quimosina indireto ( $R^2 = 0,7456$ ;  $p = 0,0593$ ).

O odor de manteiga tendeu a aumentar com o tempo de maturação, mas só foi significativamente linear para os queijos com coalho bovino indireto ( $R^2 = 0,9927$ ;  $p = 0,0002$ ) e quimosina indireto ( $R^2 = 0,8253$ ;  $p = 0,0328$ ). A maior intensidade desse atributo foi percebida nos queijos com quimosina e aquecimento indireto.

As mudanças ocorridas nos gostos salgado, doce e amargo podem ser observadas na Fig. 12.

Em geral, a intensidade do gosto salgado diminuiu com o tempo, sendo linearmente significativo para o queijo fabricado com *R. miehei* e aquecimento direto ( $R^2 = 0,7756$ ;  $p = 0,0486$ ) (Fig. 12a).

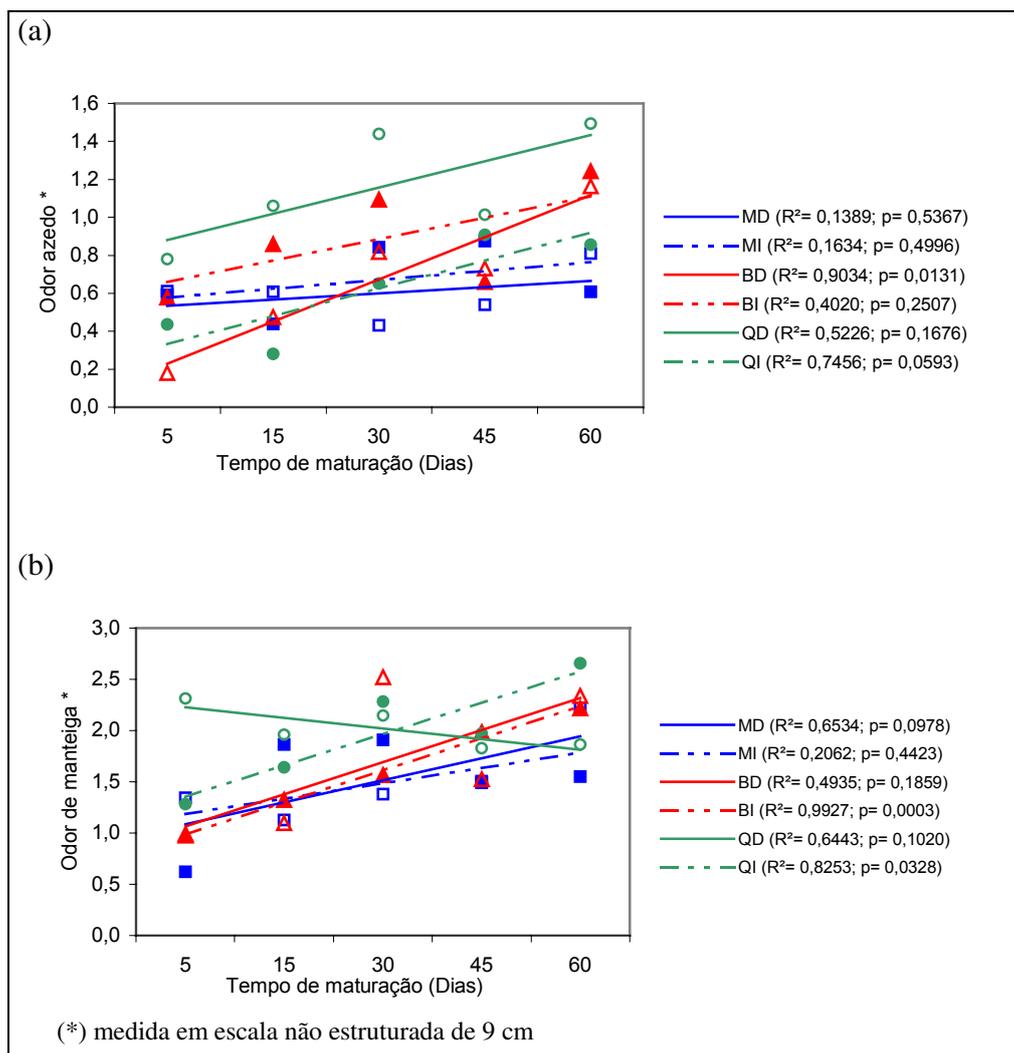


Fig. 11. Evolução do odor azedo (a), e de manteiga (b) dos queijos Prato elaborados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. (□); MI = microbiano indireto (■); BD = bovino direto (△); BI = bovino indireto (▲); QD = quimosina direto (○); QI = quimosina indireto (●).

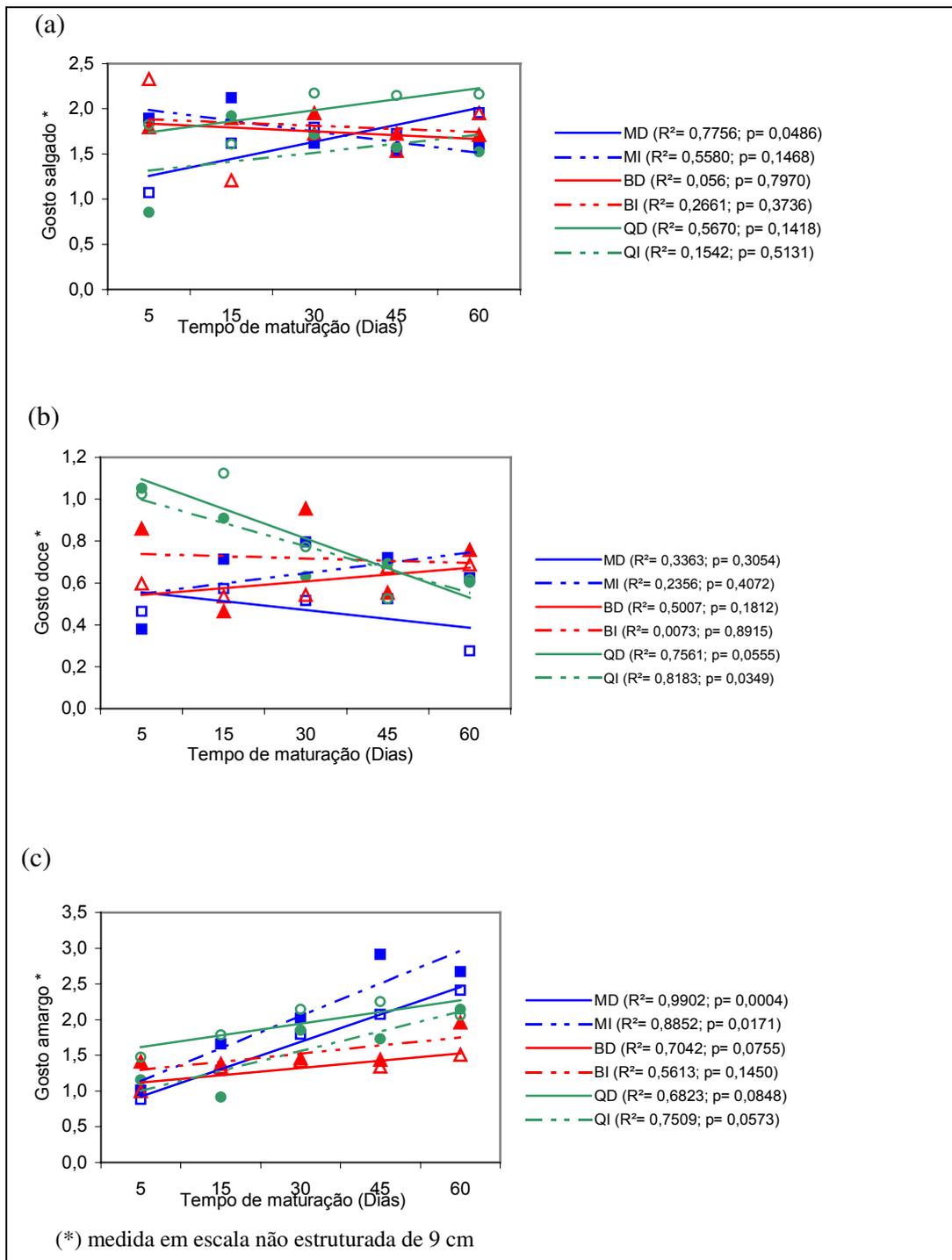


Fig. 12. Evolução do gosto salgado (a), doce (b) e amargo (c) dos queijos Prato elaborados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. (MD=microbiano direto (□); MI = microbiano indireto (■); BD = bovino direto (△); BI = bovino indireto (▲); QD = quimosina direto (○); QI = quimosina indireto(●)).

O processo de difusão de sal no queijo é um processo lento devido a fatores como impedimento estérico da proteína e gordura, e diâmetro dos poros da matriz protéica (Geurtz, Walstra & Mulder,1974). Além disso, a absorção de sal no queijo depende do gradiente de concentração, da geometria do queijo, do tempo de salga, pH e umidade do queijo (Geurtz et al.,1980). Portanto, é duvidoso estabelecer qualquer conclusão quando um ou mais desses parâmetros não foram estritamente padronizados como é de se esperar numa planta industrial.

O gosto doce tendeu a diminuir com o tempo de maturação para todos os tratamentos, exceção para os queijos do tratamento microbiano indireto e bovino direto que tiveram leve aumento. Para os queijos do tratamento com quimosina direto ( $R^2 = 0,7561$ ;  $p = 0,0555$ ) e quimosina indireto ( $R^2 = 0,8183$ ;  $p = 0,0349$ ), o gosto doce diminuiu linearmente com o tempo de maturação (Fig. 12b).

Como pode ser visto na Fig. 12c, a intensidade do gosto amargo tendeu a aumentar com o tempo de maturação para todos os queijos. O tratamento microbiano direto ( $R^2 = 0,9902$ ;  $p = 0,0004$ ), microbiano indireto ( $R^2 = 0,8852$ ;  $p = 0,0171$ ) e quimosina indireto ( $R^2 = 0,7509$ ;  $p = 0,0573$ ) mostraram correlação linear significativa a  $p < 0,05$ . Os queijos com protease do *R.miehei* com aquecimento direto e indireto apresentaram maior intensidade do gosto amargo em relação aos demais tratamentos. A maior formação do gosto amargo nos queijos elaborados com coagulante microbiano indica a intensa atividade proteolítica desse coagulante comparado aos queijos fabricados com coalho bovino e quimosina obtida por fermentação.

Nas Figs. 13 e 14 estão representados os atributos do sabor com o tempo de maturação dos queijos. Nota-se na Fig. 13a, que o sabor de leite tendeu a diminuir com o tempo de maturação para os queijos de todos os tratamentos. A intensidade do sabor de leite diminuiu linearmente com o tempo para os queijos com quimosina e aquecimento direto ( $R^2 = 0,9265$ ;  $p = 0,0086$ ), que ao final da cura apresentaram a menor intensidade do sabor de leite.

(a)

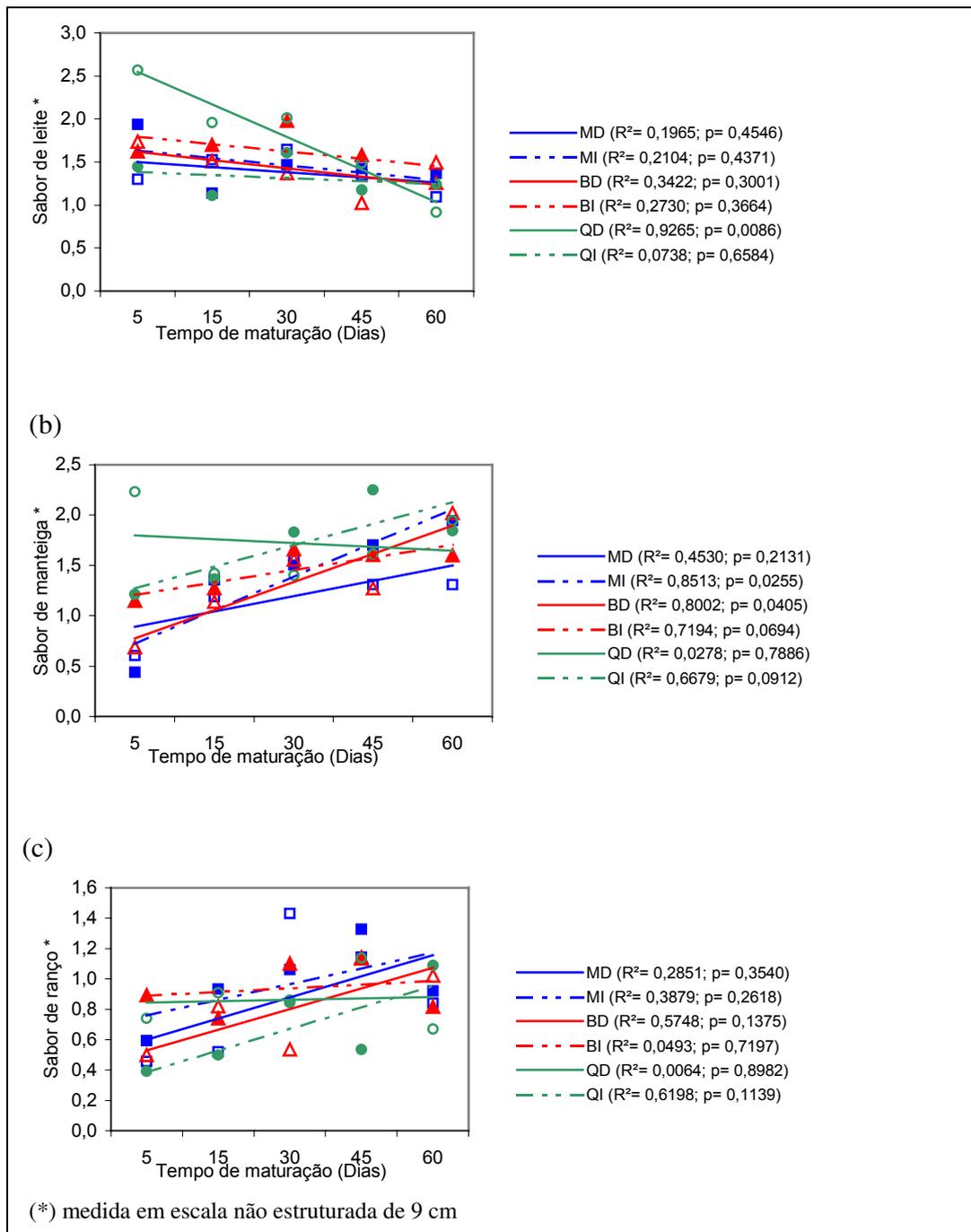


Fig. 13. Evolução do sabor de leite (a), manteiga (b) e ranço (c) dos queijos Prato elaborados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. (MD = microbiano direto (□); MI = microbiano Indireto (■); BD = bovino direto (△); BI = bovino indireto (▲); QD = quimosina direto (○); QI = quimosina indireto(●)).

Em geral, a intensidade do sabor de manteiga tendeu a aumentar com o tempo de maturação, mas o aumento da intensidade só foi linearmente correlacionado com o tempo para os queijos com *R. miehei* e aquecimento indireto ( $R^2 = 0,8513$ ;  $p = 0,0255$ ) e coalho bovino e aquecimento direto ( $R^2 = 0,8002$ ;  $p = 0,0405$ ) (Fig.13 b).

A intensidade do sabor de ranço apresentou tendência de aumento com o tempo de cura, mas não houve correlação linear como mostra a Fig. 13c. A maior intensidade desse atributo foi percebida nos queijos do tratamento com quimosina indireto ao final da maturação. A percepção desse atributo está associada à gordura, sebo e óleo.

A presença do sabor a ranço, nos queijos dos diferentes tratamentos, relaciona-se com a degradação lipídica que se intensificou com o tempo de cura. Em queijos maturados, a presença de ácidos graxos livres está relacionada ao sabor picante do queijo (Walstra et al,1999).

A Fig.14 apresenta as mudanças no sabor residual dos queijos durante a cura. O sabor residual salgado dos queijos apresentou tendência de aumento com o tempo de maturação para os queijos fabricados com protease do *R. miehei* e aquecimento direto, coalho bovino direto e indireto. O aumento da sabor residual salgado foi linear com o tempo de maturação para o tratamento com quimosina indireto ( $R^2 = 0,8332$ ;  $p = 0,0305$ ) e microbiano direto ( $R^2 = 0,8664$ ;  $p = 0,0216$ ) (Fig.14 a). Entretanto, o residual salgado tendeu a diminuir para os queijos do tratamento microbiano indireto e quimosina direto. A maior intensidade foi percebida aos 60 dias de maturação nos queijos com quimosina e aquecimento direto. A diferença no comportamento dos queijos deve ser devida a dificuldade de padronização das condições de salga e diferenças na composição, como já explicado anteriormente para o gosto salgado.

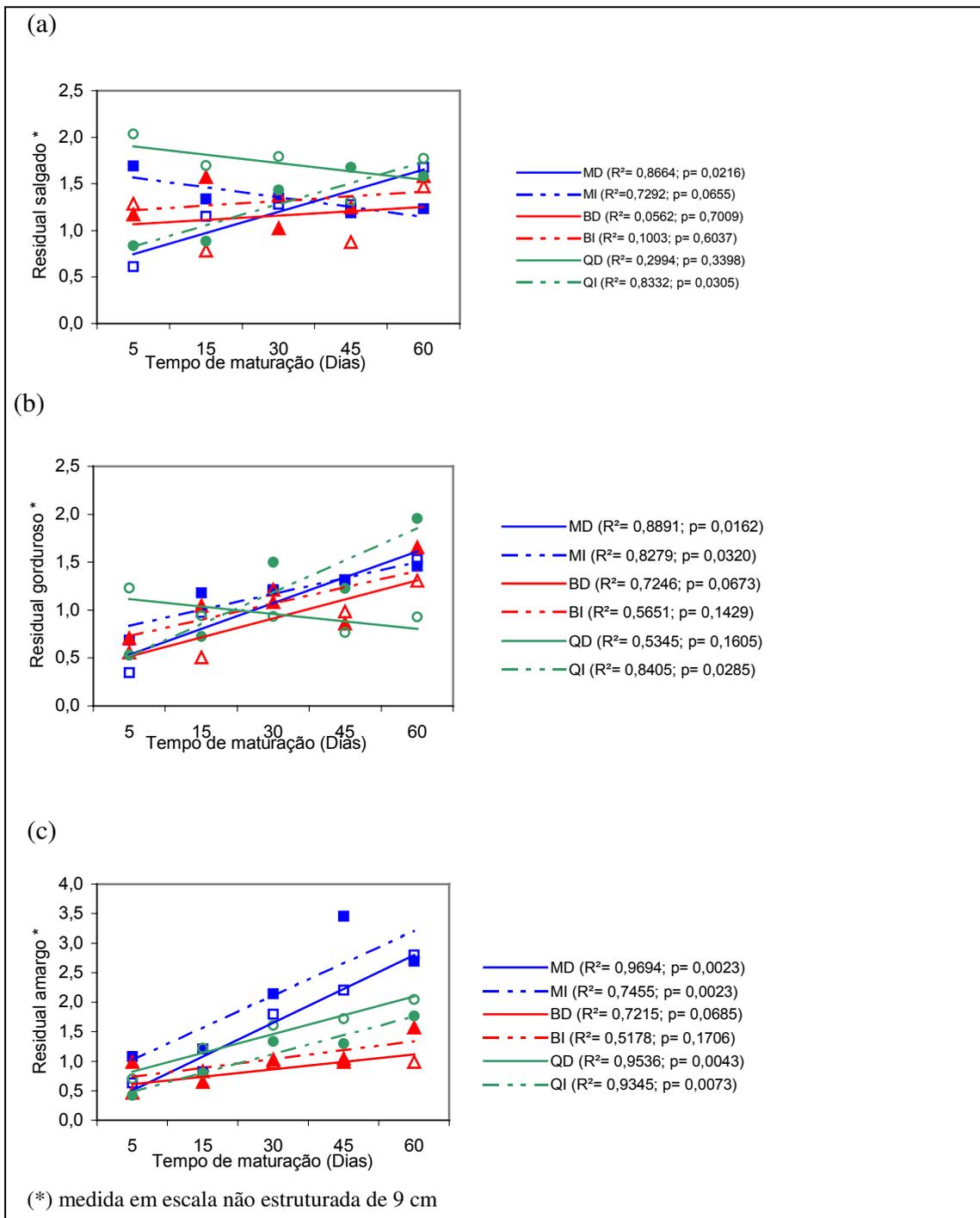


Fig.14. Evolução do residual salgado (a), gorduroso (b) e amargo (c) dos queijos Prato elaborados com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. (MD = microbiano direto (□); MI = microbiano indireto (■); BD = bovino direto (△); BI = bovino indireto (▲); QD = quimosina direto (○); QI = quimosina indireto(●)).

A intensidade do residual gorduroso tendeu a aumentar com o tempo de maturação, mas só houve correlação linear significativa para os queijos fabricados com protease do *R. miehei* e aquecimento direto ( $R^2 = 0,8891$ ;  $p = 0,0162$ ) e indireto ( $R^2 = 0,8279$ ;  $p = 0,0320$ ), e quimosina indireto ( $R^2 = 0,8405$ ;  $p = 0,0285$ ) (Fig.14 b). A percepção do residual gorduroso ao final da cura foi mais intensa nos queijos com quimosina e aquecimento indireto. Essa sensação se deve a associação com a manteiga, que nos queijos pode estar aliada à percepção de cremosidade.

Pode ser observado na Fig.14c que a intensidade do residual amargo tendeu a crescer com o tempo de maturação para os queijos fabricados com coagulante microbiano, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto da massa. O aumento linear do residual amargo com o tempo foi significativo para os queijos feitos com protease do *R. miehei* e aquecimento direto ( $R^2 = 0,9694$ ;  $p = 0,0023$ ) e indireto ( $R^2 = 0,7455$ ;  $p = 0,0593$ ), e quimosina com aquecimento direto ( $R^2 = 0,9536$ ;  $p = 0,0043$ ) e indireto ( $R^2 = 0,9345$ ;  $p = 0,0073$ ).

As maiores intensidades do residual amargo a partir dos 30 dias de cura foram atribuídas aos queijos feitos com protease do *R. miehei* com aquecimento direto e indireto. Esse comportamento evidencia a tendência das características sensoriais desses queijos durante o processo de maturação.

#### **4. Conclusões**

Os resultados permitem concluir que as características sensoriais dos queijos Prato fabricados em escala industrial foram afetadas pelo tipo de coagulante, aquecimento da massa e tempo de maturação.

Os queijos fabricados com quimosina e com cozimento por aquecimento direto apresentaram maior intensidade de cor, maior elasticidade e menor adesividade em relação aos queijos dos demais tratamentos. Já os queijos elaborados com protease do *R. miehei* foram mais macios, fraturáveis e adesivos.

Os queijos fabricados com quimosina e aquecimento direto apresentaram maior intensidade para o odor azedo, gosto salgado e residual salgado, enquanto que

maior odor de manteiga, sabor de ranço e residual gorduroso foram perceptíveis nos queijos do tratamento com quimosina e aquecimento indireto.

Nos queijos elaborados com coalho bovino e aquecimento direto foram percebidas maiores intensidades de odor de leite, sabor de leite e manteiga, o gosto doce foi mais intenso nos queijos com coalho bovino indireto.

Maior intensidade de gosto amargo e residual amargo foram atribuídas aos queijos feitos com protease do *R. miehei*.

As características sensoriais apresentadas pelos queijos Prato elaborados nos diferentes tratamentos entre 30 e 45 dias de maturação podem ser utilizadas para aperfeiçoar sua tecnologia de fabricação e direcionar seu consumo.

O emprego de coalho bovino, ou coagulante quimosina, na fabricação dos queijos Prato, com cozimento da massa por aquecimento direto, resultaram em queijos mais firmes, de odor e sabor suave, adequados a uso como queijo de mesa, ou uso culinário como ingrediente.

A elaboração de queijo Prato com protease do *R. miehei* independente do tratamento térmico utilizado no cozimento da massa se mostrou apropriado para ser usado como queijo de mesa, por sua maciez, gosto e sabor forte.

## 5. Referências Bibliográficas

Adda, J., Gripon, J. C., & Vassal, L. (1982). The chemistry of flavour and texture generation in cheese. *Food Chemistry*, V.9: 115-129.

AOAC - Association Of Official Analytical Chemists. (1995). *Official Methods of Analysis*. 16<sup>th</sup>. Ed. Arlington.

Barbano, D. M., Lynch, J. M., & Fleeming, J. R. (1991). Direct and indirect determination of true protein content of milk by kjeldahl analysis: collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v. 74(2), 281- 288.

- Bárcenas, P., San Román, R. P., Pérez Elortondo, F. J., & Albisu, M. (2001). Consumer preference structures for traditional Spanish cheeses and their relationship with sensory properties. *Food Quality and Preference*, v.12:269-279.
- Creamer, L.K., & Olson, N. F. (1982). Rheological evaluation of maturing cheddar cheese. *Journal of Food Science*, v. 47, n° 2, 631-646.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg Maryland: Aspen Publishers, Inc. 587 pp.
- Fox, P. F. (1998). Developments in the biochemistry of cheese ripening. *Proceedings of 25<sup>th</sup> International Dairy Federation*. p.11-38.
- Fox, P.P., Singh, T.K., & McSweeney, P.L.H. (1995). Biogenesis of flavour compounds in cheese. In: Malin, E. L.; Tunick, M. H. *Chemistry of Structure – Function Relationships in Cheese*. Plenum Press, N.Y. p,59 - 99.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, v. 72(6), 1379 – 1400.
- Fox, P. F. (1988). Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.10, 522-535.
- Furtado, M. M., & Lourenço Neto, J. P. M. (1994). *Tecnologia de Queijos*. Ed. Dipemar, São Paulo, SP.
- Geurtz, T. J., Walstra, P., & Mulder, H. Transport of salt and water during salting of cheeses. 2. Quantities of salt taken up and of moisture lost. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, v.34 (4): 229-254,1980.
- Geurtz, T. J., Walstra, P., & Mulder, H. Transport of salt and water during salting of cheeses. 1. Analysis of process involved. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, v.28 (2): 102-129,1974.
- Guinee, T. P., & Wilkinson, M. G. Rennets coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Journal of Society of Dairy Technology*, v. 45 (4): 94 – 104.1992.

- Irigoyen, A., Izco, J. M., Ibáñez, F. C., & Torre, P. (2001). Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics an ovine cheese. *Food Chemistry*, v.72 (2):137-144.
- Kristoffersen, T. (1973). Biogenesis of cheese flavor. *Journal Agr. Food Chem.*, v.21, (4), 573-575.
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K., & Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Science*, v. 70 (8): 1748-1760.
- Oliveira, J. S. (1986). *Queijo: Fundamentos Tecnológicos*. 2<sup>a</sup> Ed. Ícone Editora Ltda: São Paulo,SP.
- Piggott, J. R., & Mowat, R. G. (1991). Sensory aspects of maturation of Cheddar cheese by descriptive analysis. *Journal of Sensory Studies*, v.6: 49 - 62.
- Richard, G. H. (1985). *Standard Methods for Examination of Dairy Products*. American Publ., Helth Assoc, Washington.
- Stone,H., & Sidel,J.L. (1993). *Sensory Evaluation Practices*. 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press, Inc. N.Y. p.202 - 246.
- Sousa, M. J., Ardö. Y., & McSweeney, P. L. H. ( 2001). Advances in study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, v.11,327 - 345.
- Urbach, G.(1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavor compound formation in dairy produts. *International Dairy Journal*, v.5, 877-903.
- Walstra, P., Noomen, A., & Geurts, T. J. (1999). Dutch – types varieties. In: Fox, P. F. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2<sup>nd</sup>. Ed. Aspen Publishers Inc. Maryland. p 39 - 82.
- Yun, J. J., Kiely, L. J., Kindstedt, P. S., & Barbano, D. M. (1993). Mozzarella Cheese: Impact of Coagulant Type on Functional Properties. *Journal of Dairy Science*, v. 76 (12): 3657 - 3663.



## **CAPÍTULO 6**

### **CONTRIBUIÇÃO DO TIPO DE COAGULANTE E DO AQUECIMENTO NO COZIMENTO DA MASSA NA TEXTURA DO QUEIJO PRATO DURANTE A MATURAÇÃO**

TRABALHO A SER ENVIADO À REVISTA MILCHWISSENSCHAFT



## CONTRIBUIÇÃO DO TIPO DE COAGULANTE E DO AQUECIMENTO NO COZIMENTO DA MASSA NA TEXTURA DO QUEIJO PRATO DURANTE A MATURAÇÃO

---

### RESUMO

Este trabalho teve por objetivo determinar a influência do tipo de coagulante e do aquecimento da massa nas propriedades de textura (TPA) dos queijos Prato fabricados com coagulante microbiano (protease do *Rhizomucor miehei*), coalho bovino (20% quimosina e 80% pepsina) e quimosina obtida por fermentação, através do cozimento da massa por aquecimento direto (remoção de 1/3 do soro e substituição deste por água quente) e aquecimento indireto (através de vapor em tanque encamisado) aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação. A textura dos queijos foi analisada por testes de compressão, os quais foram realizados utilizando o Instron (Instron Corp., Canton, MA, USA). O tipo de coagulante e o tempo de maturação influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) todos os atributos de textura dos queijos. A forma de aquecimento da massa resultou em diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na elasticidade TPA e coesividade TPA. Os queijos elaborados com coalho bovino e aquecimento direto apresentaram maior dureza TPA comparativamente aos demais tratamentos. Os queijos do tratamento com quimosina e aquecimento direto tiveram menor elasticidade TPA .

**Queijo Prato** (propriedades de textura TPA)

---

---

## ABSTRACT

### CONTRIBUTION OF THE COAGULANT TYPE AND THE CURD COOKING IN THE TEXTURE OF THE PRATO CHEESE DURING THE AGING

The objective of this work was to determine the influence of the coagulant type and curd cooking in the texture properties TPA of the Prato cheese manufactured with microbial coagulant (protease of the *Rhizomucor miehei*), calf rennet (20% chymosin and 80% pepsin) and chymosin obtained by fermentation, through the curd cooking using direct heating (removal of 1/3 of the whey and substitution of this for hot water) and indirect heating (through vat jacket) at the 5, 15, 30, 45 and 60 days of aging. The texture of the cheeses was analyzed by compression tests, which were carried out using Instron (Instron Corp., Canton, MA, USA). The coagulant type and the time of aging influenced significantly ( $p < 0,05$ ) all of the texture attributes of the cheeses. The type of curd heating resulted in significant difference ( $p < 0,05$ ) for the springiness TPA and cohesiveness TPA. The cheeses elaborated with calf rennet and direct heating presented greater hardness TPA comparatively to the other treatments. The cheeses of the treatment with chymosin and direct heating had lower springiness TPA.

**Prato cheese** (texture properties TPA)

---

## 1. Introdução

A textura ou corpo do queijo é uma das características mais importante que determinam a identidade e qualidade de um queijo (9). A percepção dos atributos de textura resultam da estrutura física e das propriedades reológicas dos alimentos (16).

A textura é definida como a manifestação sensorial e funcional das propriedades mecânicas e estruturais dos alimentos percebidas através dos sentidos da visão, audição, tato e propriedades cinestésicas (23). As propriedades

que contribuem para a textura no queijo podem ser divididas em propriedades mecânicas, geométricas e outras propriedades associadas com a presença da gordura e umidade no alimento (25). As propriedades mecânicas são manifestadas pela reação do alimento quando submetido a uma pressão, como por exemplo na mastigação e a resistência ao corte. Essas propriedades envolvem as características de dureza, coesividade, viscosidade, elasticidade, mastigabilidade, fraturabilidade e gomosidade (24). A textura pode ser avaliada de muitas formas para determinar as diversas propriedades. Assim, técnicas objetivas e subjetivas de análise de textura têm sido aplicadas para avaliar a estrutura do alimento, como parte do controle de qualidade de produtos acabados, e no desenvolvimento de novos produtos (26).

A avaliação de textura através de métodos instrumentais está baseada nos testes de força de compressão, e a quantificação através dos parâmetros mecânicos a partir do registro das curvas da força de deformação (23, 17). O primeiro instrumento baseado neste princípio foi desenvolvido para a General Foods Texturometer (13, 25) introduzindo mudanças na análise do perfil de textura. BOURNE (7) adaptou o Instron para a análise do perfil de textura, seguindo as interpretações de FRIEDMANN et al. (13). Posteriormente, o método foi aprimorado por BOURNE (6).

Dos processos bioquímicos envolvidos durante a maturação de queijos, a proteólise é a mais complexa e, possivelmente a mais importante para o desenvolvimento das características sensoriais dos queijos (22, 12). A proteólise é a responsável direta pelas modificações de textura no queijo e contribui significativamente no desenvolvimento do sabor (12).

A proteólise, como modificação bioquímica mais complexa da maturação é causada por agentes proteolíticos originários de várias fontes. A função dos agentes proteolíticos é hidrolisar a paracaseína em peptídeos e aminoácidos (15).

Durante os primeiros estágios da maturação, o coagulante hidrolisa a ligação Phe<sub>23</sub>- Phe<sub>24</sub> da  $\alpha_{S1}$ - caseína ocasionando o enfraquecimento da rede protéica (9). A textura do queijo é então modificada durante a cura pela hidrólise

da  $\alpha_{S1}$ - CN f24-199 ( $\alpha_{S1}$ -I-caseína) e outras caseínas (18). A velocidade e a extensão da proteólise durante a maturação são determinadas pelo tipo e atividade das enzimas proteolíticas presentes, como atividade residual do coalho, plasmina, sistema proteases/peptidases do fermento láctico e de outros microrganismos remanescentes. A composição química do queijo em termos de pH, conteúdo de sal e umidade influencia a proteólise. Adicionalmente, a estrutura e o acesso a vários sítios de clivagem da caseína na matriz do queijo determinam a velocidade e a extensão da proteólise (11).

A presença do coagulante residual tem contribuição relevante na proteólise e sua retenção na massa é responsável pela proteólise primária do queijo. A atividade residual é dependente do tipo de enzima coagulante, das condições de fabricação, como por exemplo o pH do leite e temperatura de cozimento da massa, e do conteúdo final de umidade e variedade dos queijos (22, 11).

Nos queijos maturados, o processo proteolítico pode variar em função do tipo de queijo devido às diferenças na tecnologia de fabricação. Nas variedades de queijos de massa lavada, a proteólise ocorre principalmente por ação do coagulante e das enzimas do fermento láctico, com menor atuação da plasmina, proteinase nativa do leite. A atividade proteolítica do coagulante é função da quantidade de coagulante ativo remanescente na massa e também sofre influência da composição e quantidade do fermento láctico, da velocidade de acidificação e do pH inicial do queijo (28). O tipo de aquecimento no cozimento da massa pode afetar a quantidade de coagulante residual ativo, o teor de lactose e fermento láctico no queijo e, portanto, afetar a proteólise e, conseqüentemente, a textura do queijo. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência do tipo de coagulante e do tipo de aquecimento no cozimento da massa nas propriedades de textura TPA dos queijos Prato elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino (20% quimosina e 80% pepsina) e quimosina obtida por fermentação aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Fabricação do queijo

O processamento dos queijos foi realizado em uma indústria de laticínios situada na cidade de Pelotas, RS. O leite foi pasteurizado a 72°C por 15 segundos, com teor de gordura de 2,98%, e transferido para o tanque de fabricação. Para cada tanque foram utilizados 5000L de leite, 40 ppm de corante, 250 ppm de CaCl<sub>2</sub>, e a fabricação do queijo foi efetuada de acordo com a técnica descrita por FURTADO & LOURENÇO NETO (14).

Para verificar a influência do tipo de coagulante e do tipo de aquecimento no cozimento da massa nas propriedades de textura foram realizados 6 ensaios, que em duplicata totalizam 12 experimentos, previamente aleatorizados para efeito da ordem de execução.

Na fabricação dos queijos foi utilizada a cultura láctica Lyofast CMS 0,19 50U composta de *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* da marca Sacco, na proporção 4:4:2 respectivamente.

Os coagulantes usados foram quimosina obtida por fermentação (Chymax<sup>®</sup>, da Chr.Hansen), coalho bovino (Naturen<sup>®</sup>) fornecido pela Ha-La e coagulante microbiano (protease do *Rhizomucor miehei*, Marschall – M<sup>®</sup>), fornecido pela Rhône- Poullenc. Para a coagulação, o coalho e os coagulantes foram utilizados em quantidades suficientes para coagular 5000L de leite em 20 minutos à temperatura de 33°C.

No tratamento da massa, o cozimento foi realizado à temperatura de 43°C por 20 minutos. O aquecimento direto ocorreu no tanque, através da remoção de 1/3 do soro e substituição deste por água quente à temperatura de 80°C; o aquecimento indireto através de vapor em tanque encamisado. A seguir, foram executadas as etapas de dessoragem, pré-prensagem no tanque, corte, enformagem e prensagem.

A salga foi realizada em salmoura a 20%, por 24 horas e, a secagem dos queijos em câmara fria à temperatura de 8°C, por 48 horas. Os queijos de formato retangular, com aproximadamente 2Kg, foram embalados em material termoencolhível, identificados e conduzidos novamente à câmara para maturação na temperatura entre 8 – 10 °C por 60 dias. A composição dos queijos foi determinada aos cinco dias de fabricação.

## *2.2. Preparo de amostras*

No preparo das amostras para análise da composição, cada peça de queijo foi retirada aleatoriamente. A peça de queijo foi dividida em três partes, cortadas em cubos menores e triturada em multiprocessador, homogeneizada e acondicionada em frascos plásticos. As amostras foram mantidas sob refrigeração entre 4 - 8°C até o momento de sua utilização nas análises. Aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de estocagem refrigerada, os queijos foram submetidos ao mesmo procedimento de amostragem e preparação para as análises de avaliação da glicólise (pH e acidez) e proteólise (nitrogênio solúvel em pH 4,6 e 12% de TCA).

Na preparação das amostras para as análises de textura TPA , cada peça de queijo foi retirada aleatoriamente. Na peça de queijo fez-se uma remoção de 3 – 4 mm de sua superfície, depois dividiu-se em três partes. Da parte central retirou-se uma fatia de 2,5 cm de onde foram retiradas as amostras. Um cilindro de 2 cm de diâmetro foi utilizado para cortar cilindros de queijos (2 cm de diâmetro x 2 cm de altura). As amostras, assim obtidas foram embaladas em filme plástico e colocadas em bolsa plástica e mantidas à temperatura de 4°C até a hora do teste. Aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de estocagem refrigerada, os queijos foram submetidos ao mesmo procedimento de amostragem e preparação para os testes de textura. As medidas das propriedades de textura foram realizadas com no mínimo 10 cilindros, sendo 5 para cada tratamento e tempo de estocagem.

### *2.3. Composição química do queijo*

Para determinar o pH, uma mistura preparada contendo 10 g de amostra de queijo com 10 mL de água destilada e lida em pHmetro digital da marca Orion modelo 710 A . A acidez titulável dos queijos foi determinada pelo método 920.124 da AOAC (3). O conteúdo de gordura no queijo foi realizado pelo método de extração etérea de Mojonnier, conforme o método 989.05 da AOAC (3). As análises de nitrogênio total (3), nitrogênio não caséico (4) e nitrogênio não protéico (3) foram determinados pelo método de Kjeldahl. Os valores de nitrogênio foram multiplicados pelo fator de conversão 6,38 para obtenção dos valores equivalentes de proteínas. O teor de umidade do queijo foi determinado gravimetricamente em estufa, a 100°C por 24 horas, segundo o método 925.23 da AOAC (3). A porcentagem de cinzas no queijo foi realizada por incineração em mufla a 550°C, conforme o método 935.42 da AOAC (3). O teor de sal do queijo foi determinado pelo método de Volhard (21). As análises de pH foram realizadas em duplicata e as demais análises químicas em triplicatas.

### *2.4. Proteólise*

Os teores de nitrogênio solúvel em tampão acetato a pH 4,6 e em 12% de ácido tricloroacético (TCA) foram determinados para medir a extensão e a profundidade da proteólise ocorrida no queijo durante o tempo de estocagem, através do método de BYNUM & BARBANO (8). As análises de nitrogênio solúvel foram determinadas por Kjeldhal e os resultados expressos como porcentagem do nitrogênio total.

### *2.5. Eletroforese*

A eletroforese em gel de uréia poliacrilamida (uréia – PAGE) (gel de separação a 12,5% e de concentração a 4%) foi realizada utilizando-se uma unidade vertical Mini Protean 3 (Bio- Rad®), usando o método de ANDREWS (2) e MELACHOURIS (20). Os géis foram corados com Brilliant Blue Colloidal, de acordo com BLAKESLEY & BOEZI (5). Os extratos para eletroforese foram

preparados dissolvendo-se 20 mg de amostra liofilizada em 1 mL de tampão, e padrão de caseinato de sódio 10 mg dissolvido em 1 mL de tampão. Amostra e padrão foram levados a banho com aquecimento a 37°C por 1 hora, após, adicionou-se à amostra e padrão 5 $\mu$  L de  $\beta$ - mercaptoetanol, com aquecimento a 37°C por 45 minutos. Finalmente, adicionou-se pequena quantidade de azul de bromofenol. O tampão para dissolução da amostra foi preparado usando-se 1,50g de tris-hidroximetil aminometano (TRIS), 84g de uréia em 150 mL de água destilada, adicionado de HCl até pH 6,7, para um volume final de 200 mL. Foram aplicados 5 $\mu$ L de padrão e 5 $\mu$ L de amostra no gel. A separação das amostras foi feita inicialmente com 26 mA e depois a 10 mA, até o corante indicador (azul de bromofenol) atingir o final do gel (cerca de 3 a 4 horas). Os géis foram corados por imersão na solução corante durante uma noite e descorados com água destilada.

#### *2.6. Análise instrumental de Textura*

As propriedades de textura como a dureza TPA, elasticidade TPA, adesividade TPA, coesividade TPA, gomosidade TPA foram determinadas no Instron, Instrumento universal de ensaios (modelo1130, Instron Corporation, Canton, MA) conforme o procedimento de BOURNE (6). O Instron, equipado com célula de compressão de 50Kg, e as condições usadas nos testes foram de 50% de compressão, velocidade de cabeça de 5 cm/min e velocidade de carta de 20 cm/min. A curva típica da força de deformação obtida por ciclo duplo de compressão pode ser observada na Fig 1.

#### *2.7. Planejamento experimental e análise estatística dos resultados*

O delineamento experimental utilizado foi o fatorial completo. Os fatores estudados foram tipo de agente coagulante, em três níveis (protease do *R. miehei*, coalho bovino e coagulante quimosina obtida por fermentação) e tipo de aquecimento no cozimento da massa em dois níveis: aquecimento direto (retirada de 1/3 do soro e substituição deste por água) e indireto (com aquecimento por

vapor em tanque encamisado). Estes tratamentos resultaram em 6 experimentos que foram realizados em duplicata, totalizando 12 experimentos.

Para a avaliar as propriedades de textura com o tempo de maturação do queijo foi adotado um delineamento experimental do tipo split-plot, sendo que a sub-parcela foi obtida pela incorporação do fator tempo de maturação. Os efeitos dos fatores e interações foram analisados através de análise de variância. Na análise dos resultados utilizou-se o programa STATISTICA for Windows.

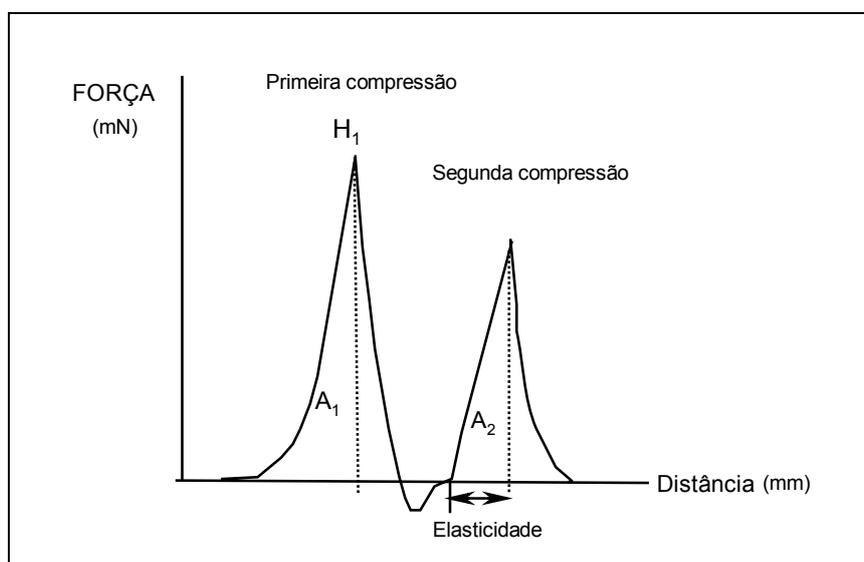


Fig. 1: Curva típica da força de deformação obtida pelo Instron para queijo Prato. (dureza =  $H_1$ ; elasticidade = largura na curva  $A_2$ ; adesividade = área de força negativa no primeiro ciclo de compressão; coesividade =  $(A_2 / A_1)$ ; gomosidade =  $(A_2 / A_1) \cdot H_1$ )

### 3. Resultados e discussão

A composição média dos queijos Prato elaborados por diferentes coagulantes, e cozimento da massa por aquecimento direto e indireto são mostrados na Tabela 1.

A análise estatística da composição dos queijos mostrou que os tipos de agente coagulantes utilizados na fabricação dos queijos nos diferentes tratamentos resultaram em diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na sua composição, com exceção da acidez titulável. A forma de aquecimento no cozimento da massa influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) os teores de umidade, proteínas totais, gordura, pH e acidez titulável. Estatisticamente, a interação entre o agente coagulante e a forma de aquecimento da massa, resultou em diferenças significativas na composição dos queijos para os valores de proteínas totais, gordura, sal, relação sal:umidade, gordura em base seca, pH e acidez titulável.

CREAMER & OLSON (9) relatam que fatores de composição como o pH e conteúdo de umidade, e a proteólise influenciam a textura do queijo. Verifica-se na Tabela 1, que os queijos do tratamento com quimosina e aquecimento direto apresentaram os maiores valores de pH, estando um pouco acima do pH esperado para o queijo Prato (14).

Nota-se que, os queijos com protease do *Rhizomucor miehei* e aquecimento indireto apresentaram maior conteúdo de umidade, porém não diferiram significativamente de nenhum tratamento indireto. Esses queijos apresentaram maior teor de nitrogênio não protéico (NNP) não diferindo ( $p \leq 0,05$ ) do microbiano e bovino direto, e menor teor de proteínas, mas não diferiram dos bovinos.

Queijos mais úmidos poderão ter alterações de consistência. JACK & PATERSON (17) relatam que a água tem função plastificante para a movimentação da caseína em relação à gordura. O valor de NNP indica a maior ação proteolítica do coagulante microbiano em relação aos tratamentos com coalho bovino e coagulante quimosina direto e indireto. Os queijos com coalho bovino e coagulante quimosina direto apresentaram menor conteúdo de umidade, mas não foram significativamente diferentes do bovino e quimosina indireto, e microbiano direto. Enquanto, os queijos com quimosina direto apresentaram maior teor de proteínas, mas sem diferença significativa do tratamento bovino direto, microbiano direto e quimosina indireto.

<b>Tabela 1: Composição média (n=6) obtida para os queijos Prato elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i>, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto (após cinco dias de fabricação).</b>				
Componente	Aquecimento	Protease do <i>R.miehei</i>	Coalho bovino	Quimosina
Umidade(%)	Direto	42,85 <sup>a,b</sup>	41,33 <sup>b</sup>	41,24 <sup>b</sup>
	Indireto	44,45 <sup>a</sup>	43,02 <sup>a,b</sup>	42,65 <sup>a,b</sup>
Gordura(%)	Direto	26,37 <sup>a</sup>	26,19 <sup>a</sup>	26,19 <sup>a</sup>
	Indireto	26,17 <sup>a</sup>	23,13 <sup>b</sup>	25,57 <sup>a,b</sup>
PT(%) <sup>1</sup>	Direto	25,70 <sup>a,b</sup>	24,81 <sup>a,b,c</sup>	26,05 <sup>a</sup>
	Indireto	23,84 <sup>c</sup>	24,52 <sup>b,c</sup>	25,52 <sup>a,b</sup>
Cinzas(%)	Direto	3,74 <sup>a,b</sup>	3,72 <sup>a,b</sup>	3,64 <sup>b</sup>
	Indireto	3,72 <sup>a,b</sup>	3,85 <sup>a</sup>	3,58 <sup>b</sup>
GBS(%) <sup>2</sup>	Direto	46,11 <sup>a</sup>	44,63 <sup>a,b</sup>	44,62 <sup>a,b</sup>
	Indireto	47,07 <sup>a</sup>	40,60 <sup>b</sup>	44,62 <sup>a,b</sup>
Sal (%)	Direto	1,06 <sup>b</sup>	1,38 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>
	Indireto	1,24 <sup>a</sup>	1,30 <sup>a</sup>	1,06 <sup>b</sup>
NNP(%) <sup>3</sup>	Direto	0,07 <sup>a,b</sup>	0,06 <sup>a,b,c</sup>	0,05 <sup>c</sup>
	Indireto	0,08 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b,c</sup>	0,05 <sup>b,c</sup>
S/U <sup>4</sup>	Direto	2,46 <sup>c</sup>	3,33 <sup>a</sup>	2,60 <sup>c</sup>
	Indireto	2,81 <sup>b,c</sup>	3,03 <sup>a,b</sup>	2,49 <sup>c</sup>
PH	Direto	5,39 <sup>b</sup>	5,44 <sup>b</sup>	5,62 <sup>a</sup>
	Indireto	5,38 <sup>b</sup>	5,35 <sup>b</sup>	5,34 <sup>b</sup>
Acidez( %Ác.láctico)	Direto	0,35 <sup>c</sup>	0,40 <sup>b,c</sup>	0,40 <sup>b,c</sup>
	Indireto	0,52 <sup>a</sup>	0,46 <sup>a,b</sup>	0,40 <sup>b,c</sup>

<sup>1</sup>PT= Proteína Total (%NTx6,38); <sup>2</sup>GBS= Gordura em base seca ; <sup>3</sup>NNP= Conteúdo de nitrogênio não protéico ;  
<sup>4</sup>S/U= Relação sal/ umidade.  
a, b, c : Para um mesmo parâmetro, médias seguidas por letra (s) em comum não diferem significativamente entre si a p ≤ 0,05.

A tabela da análise estatística das propriedades de textura dos queijos fabricados com os diferentes coagulantes e aquecimento direto e indireto da massa é mostrada na Tabela 2.

**Tabela 2 : Análise de variância das propriedades de textura dos queijos Prato fabricados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e coagulante quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto durante os 60 dias de maturação.**

		Fatores							
		Coagulante [1]	Aq.Massa [2]	Tempo [3]	Interação 1*2	Interação 1*3	Interação 2*3	Interação 1*2*3	Erro
	GL	2	1	4	2	8	4	8	270
Dureza	QM	1259760,10	12811,87	304020,47	2107514,80	100725,52	200523,53	139376,14	53933,73
	p	0,0000*	0,6264	0,0002*	0,0000*	0,0652	0,0058*	0,0098*	
Elasticidade	QM	4,7775	10,8300	6,0083	27,2725	1,1640	3,4133	2,6590	0,5872
	p	0,0004*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0488*	0,0002*	0,0000*	
Adesividade	QM	14,5730	3,0998	55,2108	15,4518	2,4408	1,8320	2,1847	0,8361
	p	0,0000*	0,0552	0,0000*	0,0000*	0,0039*	0,0703	0,0091*	
Coesividade	QM	0,0345	0,0294	0,0715	0,0926	0,0129	0,0067	0,0154	0,0056
	p	0,0025*	0,0232*	0,0000*	0,0000*	0,0217*	0,3121	0,0064*	
Gomosidade	QM	308298,31	56791,92	367363,38	1124840,60	48705,07	85158,35	114853,20	28476,13
	p	0,0000*	0,1590	0,0000*	0,0000*	0,0959	0,0193*	0,0002*	

GL= grau de liberdade; p= probabilidade; QM= quadrado médio. \* Estatisticamente significante  $p < 0,05$

Observa-se que o tipo de coagulante e o tempo de maturação influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) todos os atributos de textura TPA. O aquecimento da massa resultou em diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a elasticidade TPA e a coesividade TPA. A interação dos fatores, tipo de coagulante, aquecimento da massa e tempo de maturação influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) as propriedades de textura. Essa interação indica a dependência dessas variáveis e, portanto, devem ser analisadas em conjunto.

A influência do tipo de coagulante e do tipo de aquecimento no cozimento da massa foi analisada nas propriedades de textura dos queijos fabricados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina obtida por fermentação, os resultados são mostrados na Tabela 3.

<b>Tabela 3: Médias (n=50) obtidas para as propriedades de textura dos queijos Prato elaborados com protease do <i>Rhizomucor miehei</i>, coalho bovino e quimosina, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto.</b>				
Propriedades de Textura	Aquecimento	Protease do		
		<i>R.miehei</i>	Coalho bovino	Quimosina
Dureza TPA (mN)	Direto	782,8 <sup>c,d</sup>	1.167,3 <sup>a</sup>	717,5 <sup>d</sup>
	Indireto	827,8 <sup>c,d</sup>	875,4 <sup>b,c</sup>	1.003,7 <sup>b</sup>
Elasticidade TPA (mm)	Direto	15,97 <sup>a</sup>	15,29 <sup>b</sup>	14,52 <sup>c</sup>
	Indireto	15,42 <sup>b</sup>	15,47 <sup>b</sup>	16,03 <sup>a</sup>
Adesividade TPA (mN.mm)/2	Direto	1,48 <sup>c,d</sup>	2,25 <sup>a,b</sup>	1,90 <sup>b,c</sup>
	Indireto	2,45 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>	1,30 <sup>d</sup>
Coesividade TPA	Direto	0,75 <sup>a</sup>	0,67 <sup>c</sup>	0,69 <sup>b,c</sup>
	Indireto	0,70 <sup>b,c</sup>	0,72 <sup>a,b</sup>	0,75 <sup>a</sup>
Gomosidade TPA (mN)	Direto	606,87 <sup>b</sup>	781,32 <sup>a</sup>	495,40 <sup>c</sup>
	Indireto	585,24 <sup>b,c</sup>	625,61 <sup>b</sup>	755,29 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> = Para um mesmo parâmetro, médias seguidas de letra (s) em comum não diferem significativamente entre si

Pode ser observado na Tabela 3 que os queijos fabricados com coalho bovino e aquecimento direto foram mais firmes diferindo de todos os demais a  $p \leq 0,05$ . Os queijos do tratamento bovino direto e quimosina indireto apresentaram maior gomosidade TPA diferindo significativamente de todos os tratamentos. Os queijos do tratamento quimosina indireto e microbiano direto foram mais elásticos de todos os queijos. Maior coesividade TPA foi encontrada nos queijos feitos com quimosina e aquecimento indireto e com protease do *R.miehei* e aquecimento direto, a exceção do tratamento bovino indireto. Os queijos fabricados com protease do *R.miehei* e aquecimento indireto e bovino indireto apresentaram maior adesividade TPA, porém não diferiram significativamente do tratamento bovino direto a  $p \leq 0,05$ .

Os queijos do tratamento bovino e aquecimento direto apresentaram os maiores valores de dureza TPA (Tabela 3). O conteúdo de proteína do queijo está relacionado a sua firmeza, e seu aumento leva a obtenção de uma textura mais firme (1). Entretanto, nos queijos mais duros o teor de proteína não foi elevado, e esses queijos apresentaram baixo teor de umidade. DE JONG (10) verificou que o aumento da firmeza dos queijos está relacionado às variações de pH, dos teores de sal e umidade durante a maturação.

A Fig. 2 mostra a evolução das propriedades de textura dos queijos Prato durante os 60 dias de maturação. Pode ser observado na Fig. 2a, que a dureza dos queijos tendem a diminuir com o tempo de maturação.

A dureza TPA do queijo representa o pico de força de 50% de compressão registrado na primeira compressão. Essa medida representa a força requerida para comprimir o queijo até a posição de se fragmentar (18).

A dureza tende a diminuir com o tempo de cura em razão da hidrólise enzimática da caseína, em particular da  $\alpha_{S1}$ - caseína. A hidrólise da  $\alpha_{S1}$ - caseína pela atividade residual do coagulante resulta em peptídeos, alguns dos quais podem ser solúveis e contribuem para as alterações na matriz protéica durante a maturação.

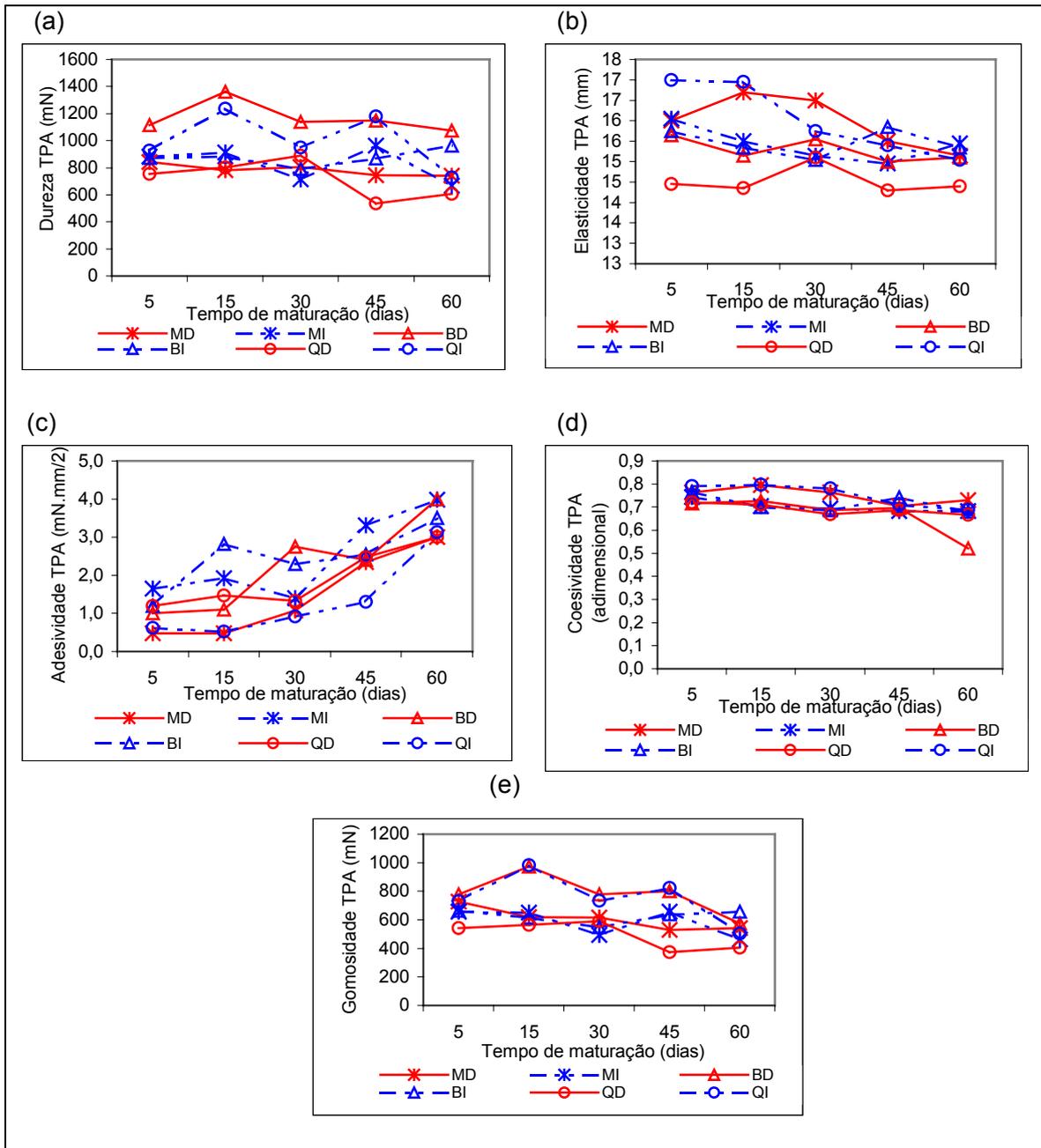


Fig. 2: Evolução da dureza TPA (a), elasticidade TPA (b), adesividade TPA (c), coesividade TPA (d) e Gomosidade TPA (e) dos queijos Prato fabricados com protease do *R.miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto, com o tempo de maturação. (MD = microbiano direto; MI = microbiano indireto; BD= bovino direto; BI= bovino indireto; QD= quimosina direto; QI= quimosina indireto).

Pode ser observado na Tabela 2, que a dureza TPA foi significativamente ( $p < 0,05$ ) dependente do coagulante e do tempo de maturação, mas independente do aquecimento da massa. Uma relação pode ser estabelecida entre o tipo de coagulante e a proteólise, em especial da  $\alpha_{S1}$ -caseína com a consistência dos queijos.

A firmeza dos queijos é diretamente relacionada à quantidade de  $\alpha_{S1}$ -caseína hidrolisada. Os queijos com coalho bovino, e com quimosina independente do tipo de aquecimento apresentaram valores menores de nitrogênio não protéico (Tabela 1) comparativamente ao coagulante microbiano. Evidenciando menor atividade proteolítica e queijos de textura mais firme.

A hidrólise da  $\alpha_{S1}$ -caseína pelo coagulante microbiano é similar ao bovino e quimosina, nos estágios iniciais da maturação, com características de textura semelhantes (19). Entretanto, longos períodos de cura com coagulante microbiano, podem levar a uma consistência menos firme nos queijos.

Na Fig. 2b verifica-se que a elasticidade TPA tende a diminuir com o tempo de maturação. Os valores de pH influenciam esta característica de textura. A elasticidade dos queijos é dependente do pH e da proporção de fosfato de cálcio coloidal removido durante o processo de fabricação (19). Os queijos do tratamento com quimosina direto foram menos elásticos em relação aos queijos dos demais tratamentos ao nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Observa-se na Tabela 1 que esses queijos apresentaram o maior valor de pH (pH 5,6) após 5 dias de fabricação que todos os demais tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

LAWRENCE et al. (19) verificaram que nesse pH a quantidade de cálcio removida no soro é ao redor de 55% do total, e que a estrutura gerada relaciona-se com o tamanho das partículas de caseína. Em pH acima de 5,2, o tamanho das partículas de caseína é da ordem de 10 nm, em pH mais ácido é da ordem de 4 nm. CREAMER & OLSON (9) demonstraram que os queijos com pH elevado apresentaram uma estrutura plástica, e quando em pH baixo leva a uma estrutura granular.

Os queijos elaborados com protease do *Rhizomucor miehei* e aquecimento indireto e bovino indireto foram mais adesivos (Tabela 3) comparativamente aos queijos dos demais tratamentos, à exceção do tratamento bovino direto. A adesividade TPA tende a aumentar com o tempo de maturação (Fig.2c). Esses queijos apresentaram maior teor de umidade e nitrogênio não protéico (NNP) que os demais, só que as diferenças não foram significativas ( $p \leq 0,05$ ). Essas características indicam a atividade proteolítica do coagulante sobre a  $\alpha_{S1}$ - caseína, resultando numa textura menos firme e adesiva.

Os queijos do tratamento microbiano direto e quimosina indireto, à exceção do tratamento bovino indireto foram verificados os maiores valores de coesividade TPA em relação aos demais tratamentos. Nota-se na Fig. 2d, que à medida que aumenta o tempo de maturação há tendência de perda da coesividade.

CREAMER & OLSON (9) observaram que os queijos mais velhos apresentam menor coesividade TPA e tendem a ser mais fraturáveis. Parte em consequência da perda da elasticidade natural, e parte resulta da proteólise ocorrida nos queijos. Verifica-se que, os queijos com coalho bovino e aquecimento direto apresentaram maior dureza TPA e menor coesividade TPA.

A gomosidade TPA relaciona a quantidade de energia necessária para desintegrar um alimento semi-sólido até a ponto de ser engolido. Observa-se na Fig.2e que os queijos dos diferentes tratamentos apresentam tendência de perda de gomosidade com o tempo de maturação. Nota-se um comportamento similar entre a dureza TPA e a gomosidade TPA. Os queijos mais firmes tendem a ter maior gomosidade.

A Fig. 3 mostra os eletroforetogramas dos queijos elaborados com protease do *Rhizomucor miehei*, coalho bovino e quimosina obtida por fermentação, com cozimento da massa por aquecimento direto e indireto aos 5, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação. Os resultados mostram que ocorreu o desdobramento gradual e crescente da  $\alpha_{S1}$ - caseína em  $\alpha_{S1}$ - I – caseína com o tempo de maturação para os queijos dos diversos tratamentos, evidenciando a ação residual do coagulante.

Segundo VISSER (27), a  $\alpha_{S1}$ -I-caseína constitui um componente de degradação e possui mobilidade eletroforética ligeiramente maior que a  $\alpha_{S1}$ -caseína. A análise dos eletroforetogramas mostra evidências de comportamento bastante similar entre a quimosina e o coalho bovino e maior atividade proteolítica da protease do *R. miehei*. Entretanto, não foi possível observar diferenças nos perfis eletroforéticos devido ao tipo de aquecimento no cozimento da massa. Analisando-se os perfis eletroforéticos de todos os tratamentos, observou-se o aparecimento de  $\gamma$ -caseínas, com aumento da intensidade das bandas com o tempo, indicando uma possível ação da plasmina sobre a  $\beta$ -caseína durante o período de maturação. A proteólise ocorrida foi importante para o desenvolvimento da textura nos queijos.

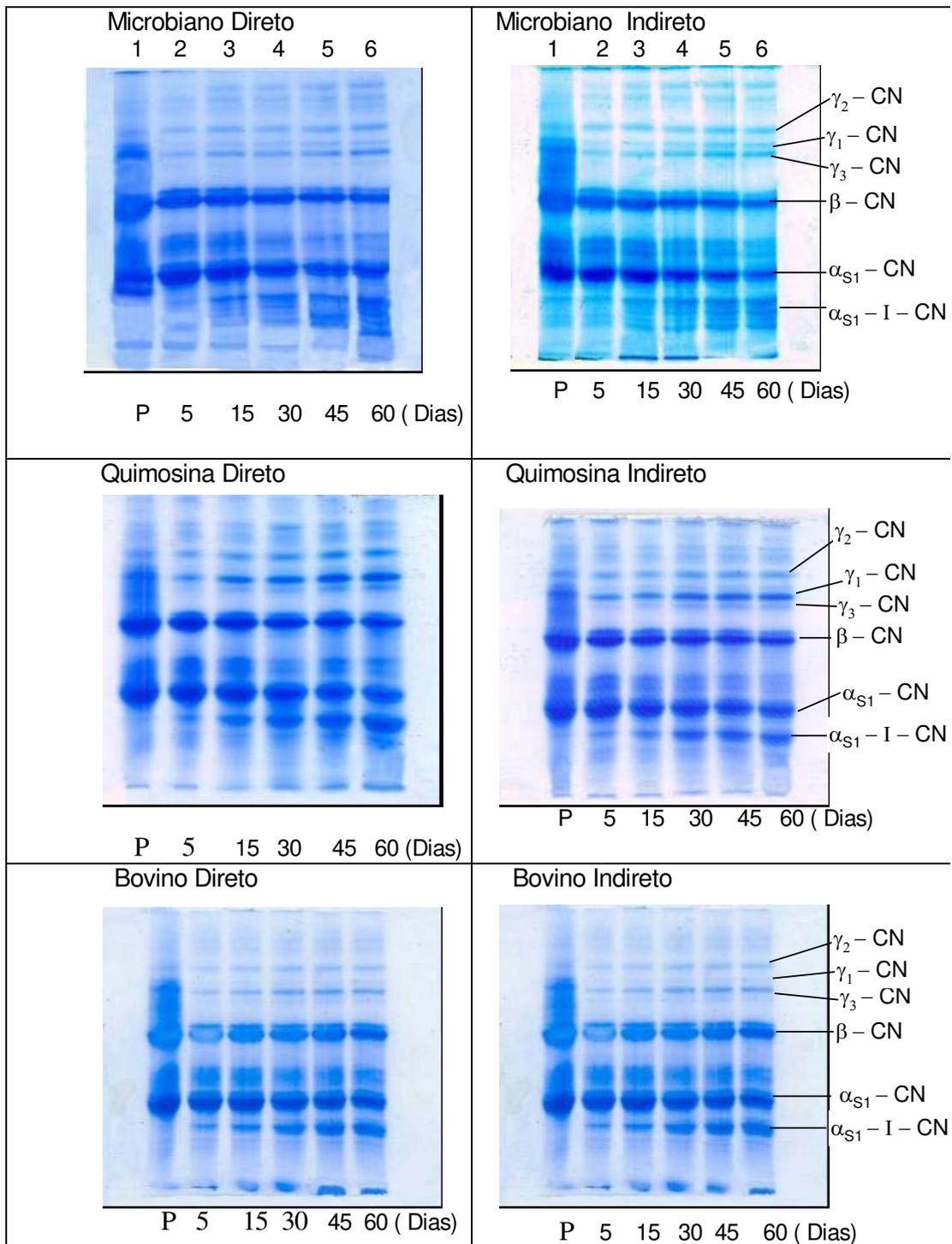


Fig. 3. Eletroforetograma do queijo Prato fabricado com protease do *R. miehei*, coalho bovino e quimosina, por aquecimento direto e indireto. Banda 1: caseinato de sódio (padrão). Bandas 2, 3, 4, 5, 6: amostras com 5, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação.

#### 4. Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que os atributos de textura TPA analisados foram influenciados pelo tipo de coagulante e o tempo de maturação. O aquecimento da massa influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) a elasticidade TPA e a coesividade TPA. A interação dos fatores tipo de coagulante, forma de aquecimento e o tempo maturação foi significativa ( $p < 0,05$ ) para as propriedades de textura TPA.

Os queijos fabricados com coalho bovino e aquecimento direto apresentaram maior dureza TPA em relação aos queijos dos demais tratamentos. Queijos elaborados com quimosina e aquecimento direto mostraram menor elasticidade TPA. A adesividade TPA foi maior para os queijos dos tratamentos bovino indireto e microbiano indireto. A coesividade TPA foi similar para os queijos do tratamento quimosina indireto e microbiano direto.

O perfil eletroforético dos queijos com protease do *R.miehei* evidenciou a atividade proteolítica desse coagulante em relação ao coalho bovino e a quimosina obtida por fermentação.

#### 5. Referências

- (1) ADDA, J., GRIPON, J.C., VASSAL, L. : Food Chemistry. **9** 115-129 (1982).
- (2) ANDREWS, A. J.: Dairy Research. **50** 45-55. (1983)
- (3) ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 16<sup>th</sup>. Ed. Arlington. (1995).
- (4) BARBANO, D.M., LYNCH, J.M., FLEEMING, J.R.: J. A.O.A.C. 74 (2) 281- 288 (1991).
- (5) BLAKESLEY, R.W., BOEZI, J.A. :Anal. Biochem. **82** (2) 580-582 (1977).
- (6) BOURNE, M.C.: Food Technol. **32** (7) 62-66,72 (1978)
- (7) BOURNE, M.C.: J. Food Science. **33** 223-226 (1968)
- (8) BYNUM, D.G., BARBANO, D.M. :J. Dairy Science. **68** (1) 1-10 (1985).

- (9) CREAMER, L. K., OLSON, N.F.: J. Food Sci. **47** (2) 631:646 (1982).
- (10) DE JONG, L.: Neth. Milk Dairy J. **30** 242-253 (1976).
- (11) FARKYE, N. Contribution of milk – clotting enzymes and plasmin to cheese ripening. In: Chemistry of structure – function relationships in cheese. Ed. Edyth L. Malin and M.H. Tunick, Plenum Press. N.Y, N.Y. p.195-207.1995.
- (12) FOX, P.F.: Proceedings of 25<sup>th</sup> International Dairy Federation.p.11-38 (1998)
- (13) FRIEDMAN, H.H., WHITNEY, J.E., SZCZESNIAK, A .S.: J. Food Sci. **28** (1) 390-396 (1963).
- (14) FURTADO,M. M., LOURENÇO NETO, J.P.M. Tecnologia de Queijos. Ed. Dipemar. São Paulo, SP. (1994).
- (15) GUINEE, T. P., WILKINSON, M. G.: J. Society of Dairy Technol. **45** (4) 94 – 104 (1992).
- (16) HORT,J., GRYS, G.L., WOODMAN, J.: J. Sensory Studies. **12** 255-266 (1997).
- (17) JACK, F.R., PATERSON, A.: Trends in Food Sci. & Technol. **3** (7)160-164 (1992).
- (18) LANE, C.N., FOX, P.F., JOHNSTON, D.E., McSWEENEY, P.L.H.: Int. Dairy Journal. **7** 453 -464 (1997).
- (19) LAWRENCE, R.C., CREAMER, L. K., GILLES, J.: J. Dairy Science. **70** (8) 1748 -1760 (1987).
- (20) MELACHOURIS, N.: Journal Dairy Science. **52** (4) 456-459 (1969).
- (21) RICHARD,G.H. Standard Methods for Examination of Dairy Products. American Publ., Helth Assoc, Washington.(1985).
- (22) SOUZA,M.J., ARDÖ. Y., McSWEENEY, P.L.H.: Int. Dairy Journal. **11** 327-345 (2001).
- (23) SZCZESNIAK, A . S. : Food Quality and Preference. **13** 215-225 (2002).
- (24) SZCZESNIAK, A . S. : J. Food Quality. **14** (1) 75-85 (1991).
- (25) SZCZESNIAK, A . S. ; BRANDT,M.A .; FRIEDMAN.H.H. : J. Food Science. **28** 397 - 403 (1963)
- (26) SMEWING,J.: Engenharia de Alimentos. **31** 30-34 (2000).
- (27) VISSER, S. Bulletin of The International Dairy Federation. **332** 20 – 24(1998).

(28) WALSTRA, P., NOOMEN, A., GEURTS, T. J. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 2.Ed. Aspen Publishers Inc. Maryland. p 39-82. (1999).