

**MARIA BETÂNIA AMORIM E AMORIM**

**EFEITO DA MICROFILTRAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DE QUEIJOS  
MINAS PADRÃO PRODUZIDOS COM DIFERENTES CULTURAS LÁTICAS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

A524e  
2014  
Amorim, Maria Betânia Amorim e, 1988-  
Efeito da microfiltração nas características de queijos Minas padrão produzidos com diferentes culturas lácticas / Maria Betânia Amorim e Amorim. - Viçosa, MG, 2014.  
xv, 76f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.68-76.

1. Queijo. 2. Microfiltração. 3. Bactérias lácticas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 637.353

**MARIA BETÂNIA AMORIM E AMORIM**

**EFEITO DA MICROFILTRAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS DE QUEIJOS  
MINAS PADRÃO PRODUZIDOS COM DIFERENTES CULTURAS LÁTICAS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*

APROVADA: 12 de dezembro de 2014.

---

Naaman Francisco Nogueira Silva

---

Luís Augusto Nero

---

Michele da Silva Pinto  
(Coorientador)

---

Ítalo Tuler Perrone  
(Coorientador)

---

Antônio Fernandes de Carvalho  
(Orientador)

Dedico aos meus pais José Celso e Ângela  
Cristina e aos meus irmãos Paulo César e  
Estefânia.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro a esta pesquisa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho, pela orientação e ensinamentos.

Aos professores Ana Clarissa dos Santos Pires e Ítalo Tuler Perrone, pelos ensinamentos e exemplo de trabalho.

Ao professor Luís Augusto Nero, pela participação na banca.

Aos demais professores que passaram pela minha formação, pelos valiosos ensinamentos.

Ao Naaman e Michele, pela ajuda, conselhos e boa convivência.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelas contribuições e carinho em especial, Pi, Dimas, Osvaldo, Carlinhos e Piu.

Aos Laticínios Escola e todos os funcionários (em especial, Cidinha, Adão, André, Luíza, Iura, Juliano, Silvério, José Carlos e Maria Helena), pelo apoio, disponibilidade e contribuição na realização do trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Leite e Derivados, pelos bons momentos e pela ajuda imprescindível na execução deste trabalho, em especial Vinicyus, Renan, Guilherme, Rafael, Gabriela Sales, Beatriz, Gabriela Kishimoto, Larissa e Mayra.

A Juliana, pela grande ajuda na análise estatística.

Ao Carlinhos do Departamento de Solos e Daniela da EPAMIG que prestaram valiosa contribuição na realização nas análises de minerais e proteína.

Aos meus pais José Celso e Ângela Cristina, pelo amor, dedicação e exemplo de vida. Foram a maior inspiração para realização desse trabalho!

Ao Paulo César, pelo amor, amizade, apoio e a Estefânia pelo amor, carinho, exemplo de simpatia e alegria de viver.

A Vanessa Reis, pela amizade e carinho.

A Geruza Dias, pelos ensinamentos e apoio.

A Mara, Carini e Mayra, pela boa companhia e apoio.

Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

MARIA BETÂNIA AMORIM E AMORIM, filha de José Celso Salgado Amorim e Ângela Cristina Ribeiro de Amorim, nasceu em Abre Campo, em 23 de maio de 1988.

Em janeiro de 2012, graduou-se em Ciência e Tecnologia em Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Em março de 2012, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Tecnologia e Inovação de Leite e Derivados.

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1. Queijo Minas Padrão.....	4
3.2. Separação por Membranas .....	5
3.2.1. Histórico.....	5
3.2.2. Métodos de filtração e caracterização das membranas.....	6
3.2.3. Classificação.....	8
3.2.4. Aplicação da microfiltração na indústria de laticínios .....	9
3.2.4.1 Aplicação da microfiltração na indústria de queijo.....	9
3.3. Bactérias lácticas starter e não starter em queijo .....	12
3.3.1. Cultura starter .....	12
3.3.2. Bactérias lácticas não starter (NSLAB).....	14
3.4. Fase Aquosa de Queijo.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1. Fabricação do Queijo Minas Padrão .....	18
4.2. Extração da fase aquosa dos queijos .....	21
4.3. Análises de composição centesimal e físico-químicas.....	21
4.3.1. Determinação de pH.....	22
4.3.2. Determinação de densidade.....	22
4.3.3. Determinação de acidez.....	22
4.3.4. Determinação de umidade e sólidos totais .....	22
4.3.5. Determinação de resíduo mineral fixo .....	23
4.3.6. Determinação de atividade de água.....	23
4.3.7. Determinação de gordura .....	23
4.3.8. Determinação de gordura no extrato seco .....	23
4.3.9. Determinação de proteína.....	24

4.3.10. Determinação de nitrogênio não caseínico.....	24
4.3.11. Determinação de nitrogênio não proteico .....	24
4.3.12. Extensão de maturação.....	24
4.3.13. Profundidade de maturação.....	25
4.3.14. Determinação de cloreto de sódio .....	25
4.3.15. Determinação de Cálcio .....	25
4.3.16. Concentração das frações $\alpha$ e $\beta$ -caseína ao longo da maturação.....	26
4.3.17. Análise do perfil de textura (TPA).....	26
4.3.18. Análise do rendimento de fabricação.....	27
4.4. Análises microbiológicas .....	28
4.4.1. Análises microbiológicas do leite.....	28
4.4.2. Análises microbiológicas no queijo .....	29
4.5. Avaliação Sensorial.....	30
4.6. Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1. Composição físico-química do leite utilizado na fabricação do queijo.....	33
5.2. Composição físico-química dos queijos em D + 1.....	33
5.3. Composição físico-química do soro.....	34
5.4. Análise de rendimento.....	35
5.5. Características físico-químicas do queijo Minas padrão e de sua fase aquosa durante o período de maturação .....	36
5.5.1. Atividade de água ( $A_w$ ) .....	36
5.5.2. Umidade e Extrato Seco.....	38
5.5.3. Potencial hidrogeniônico – (pH) .....	40
5.5.4. Índice de Extensão de Proteólise.....	43
5.5.5. Índice de Profundidade de Proteólise.....	44
5.5.6. Proteína, Nitrogênio Solúvel em pH 4,6 e Nitrogênio Solúvel em TCA 12 % da fase aquosa do queijo Minas padrão .....	46
5.5.7. Determinação do perfil proteico das frações $\alpha$ , $\beta$ -caseína dos queijos.....	50
5.6. Evolução de cálcio no queijo e na fase aquosa ao longo do período de maturação .....	54
5.7. Perfil de Textura do queijo ao longo do período de maturação .....	57
5.8. Avaliação microbiológica do leite e do queijo Minas padrão .....	61
5.8.1. Qualidade microbiológica das amostras de leite cru, tratadas termicamente e microfiltradas .....	61
5.8.2. Qualidade Microbiológica dos Queijos .....	63

5.9. Análise Sensorial.....	64
6. CONCLUSÃO .....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fluxograma de fabricação do queijo Minas padrão.....	19
<b>Figura 2</b> – Método de avaliação de rendimento do queijo Minas padrão.....	36
<b>Figura 3</b> – Acompanhamento da atividade de água dos queijos ao longo da maturação.....	37
<b>Figura 4</b> – Acompanhamento da Aw da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação.....	38
<b>Figura 5</b> – Acompanhamento do teor de umidade dos queijos ao longo da maturação.....	39
<b>Figura 6</b> – Acompanhamento do ES da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação.....	40
<b>Figura 7</b> – Acompanhamento do pH dos queijos ao longo da maturação.....	41
<b>Figura 8</b> – Acompanhamento do pH da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação.....	42
<b>Figura 9</b> – Acompanhamento do IEP dos queijos ao longo da maturação.....	43
<b>Figura 10</b> – Acompanhamento do IPP dos queijos ao longo da maturação.....	45
<b>Figura 11</b> – Acompanhamento do teor de proteína da fase aquosa dos queijos ao longo da maturação.....	47
<b>Figura 12</b> – Acompanhamento do teor de NS pH 4,6 da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação.....	48
<b>Figura 13</b> – Acompanhamento do teor de NS TCA 12 % da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação.....	49
<b>Figura 14</b> – Acompanhamento da concentração de beta-caseína dos queijos ao longo da maturação.....	51
<b>Figura 15</b> – Acompanhamento da concentração de alfa-caseína dos queijos ao longo da maturação.....	53
<b>Figura 16</b> – Acompanhamento da % de Ca da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação.....	55
<b>Figura 17</b> – Acompanhamento do perfil de dureza (a), fraturabilidade (b), mastigabilidade (c) e gomosidade (d) dos queijos ao longo da maturação.....	58

<b>Figura 18</b> – Acompanhamento do perfil de coesividade dos queijos ao longo da maturação.....	59
<b>Figura 19</b> – Acompanhamento do perfil de elasticidade dos queijos ao longo da maturação.....	60
<b>Figura 20</b> – Teste sensorial de aceitação dos queijos Minas padrão com 30 dias de maturação.....	64
<b>Figura 21</b> – Teste sensorial de aceitação dos queijos Minas padrão com 60 dias de maturação.....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores médios das análises físico-químicas realizadas no leite empregado na fabricação dos queijos Minas padrão.....	33
<b>Tabela 2</b> – Valores médios das análises físico-químicas dos queijos Minas padrão em D + 1.....	34
<b>Tabela 3</b> – Valores médios das análises físico-químicas dos soros obtidos das fabricações dos diferentes tratamentos.....	35
<b>Tabela 4</b> – Valores médios do teor de cálcio (g/100g) do queijo Minas padrão.....	54
<b>Tabela 5</b> – Resultados referentes aos parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de leite destinadas a fabricação do queijo Minas padrão, expressos em UFC·mL <sup>-1</sup> .....	62
<b>Tabela 6</b> – Resultados referentes aos parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de queijo Minas padrão, expressos em UFC·g <sup>-1</sup> .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABIQ – Associação brasileira das indústrias de queijo
- ANOVA- Análise de variância
- AOAC – Association of official analytical chemists
- Aw – Atividade de água
- ES – Extrato seco
- EST – Extrato seco total
- GES – Gordura no extrato seco
- IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística
- IEP – Índice de Extensão de Proteólise
- IPP – Índice de Profundidade de Proteólise
- MF – Microfiltração
- MFT – Microfiltração tangencial
- MMV – Maubois, Mocquot e Vassal
- NSLAB – Bactérias lácticas não starter
- NF – Nanofiltração
- N - Newton
- OR- Osmose reversa
- pH – Potencial hidrogeniônico
- RIISPOA – Regulamento de inspeção industrial de produtos de origem animal
- RMF – Resíduo mineral fixo
- RTIQ – Regulamento técnico de identidade e qualidade
- SAS – Statistical analysis system
- TCA – Ácido tricloroacético
- TPA – Análise do perfil de textura
- UF - Ultrafiltração
- UFC – Unidade formadora de colônia

## RESUMO

AMORIM, Maria Betânia Amorim e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2014. **Efeito da microfiltração nas características de queijos Minas padrão produzidos com diferentes culturas lácticas.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadores: Ítalo Tuler Perrone, Michele da Silva Pinto and Ana Clarissa dos Santos Pires.

O desenvolvimento de tecnologias que melhorem a qualidade dos produtos e aumentem a produtividade e a competitividade é necessário em um mercado de constante evolução, como o mercado de queijos. Nesse contexto a tecnologia de microfiltração vem ganhando espaço devido, principalmente, a sua eficiência na eliminação de microorganismos sem necessitar de tratamentos térmicos. O presente trabalho teve como objetivos a elaboração do queijo Minas padrão por meio do emprego da microfiltração do leite e a avaliação da adição de cultura acidificante composta de *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e aromatizante composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* e *Leuconostoc* sp.. O leite foi microfiltrado em membrana cerâmica com tamanho de poro médio de 1,4  $\mu\text{m}$ . O experimento constou de quatro tratamentos: queijo Minas padrão feito com leite pasteurizado adicionado de cultura acidificante (P); queijo Minas padrão feito com leite pasteurizado adicionado de cultura aromatizante (PA); queijo Minas padrão feito com leite microfiltrado adicionado de cultura acidificante (M) e queijo Minas padrão feito com leite microfiltrado adicionado de cultura aromatizante (MA). Uma vez que na fase aquosa acumulam-se produtos hidrossolúveis resultantes do metabolismo bacteriano de reações enzimáticas, avaliaram-se também as características da fase aquosa do queijo e a concentração de cálcio. Análises físico-químicas foram feitas nos queijos e na fase aquosa em cinco estágios de maturação, 1, 30, 45, 60 e 75 dias. Realizou-se teste de aceitação aos 30 e 60 dias de maturação dos queijos. Não houve diferença significativa na composição centesimal do queijo após a fabricação e no rendimento de fabricação, indicando que a microfiltração é uma alternativa à pasteurização, no qual se evita o tratamento térmico sem, contudo, alterar as propriedades iniciais e de rendimento do queijo Minas padrão. Os resultados das análises de atividade de água, extrato seco e pH nos queijos e em sua fase aquosa diferiram ( $P \leq 0,05$ ) quanto ao tempo de maturação e não diferiam ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos. Em relação à proteólise, os tratamentos PA e MA apresentaram maior proteólise em relação aos tratamentos P e M, indicando maior

atuação da cultura aromática na proteólise dos queijos. Quanto ao perfil de textura, foi observada diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) ao longo do tempo de maturação para todos os tratamentos, sendo que no início da maturação, os tratamentos P e M apresentaram maior perfil de dureza, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade devido, principalmente, a menor proteólise dos mesmos. Em relação ao teor de cálcio na fase aquosa, foi observada que apenas o tratamento PA apresentou aumento significativo ( $P \leq 0,05$ ) no teor de cálcio, que foi correlacionado com uma maior acidificação do queijo no início da maturação. A operação de microfiltração foi mais eficiente na eliminação de micro-organismos mesófilos aeróbios do leite em relação à pasteurização, reduzindo 3,82 ciclos logarítmicos, enquanto a pasteurização reduziu 2,19 ciclos logarítmicos. Todos os queijos apresentaram ausência de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *S. aureus*. A contagem de coliforme 30 °C e *E.coli* manteve-se dentro dos limites máximos da legislação vigente. Na análise sensorial não houve diferença entre os tratamentos para nenhum dos atributos avaliados, nos tempos 30 e 60. A tecnologia de microfiltração mostrou-se uma alternativa à pasteurização e o uso de culturas aromáticas no queijo Minas padrão apresentou-se viável, principalmente por aumentar, significativamente, a proteólise do queijo.

## ABSTRACT

AMORIM, Maria Betânia Amorim e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2014. **Effect of microfiltration on the characteristics of Minas padrão cheese manufactured with diferente types of lactic acid bacteria.** Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-Advisers: Ítalo Tuler Perrone, Michele da Silva Pinto and Ana Clarissa dos Santos Pires.

The development of new technologies that improves the product quality, increases productivity and competition are essentials within a market that is constantly changing and growing, like the cheese industry. In this context, microfiltration technology is gaining space, mostly, because its efficiency on the elimination of micro-organisms, without needing any heating treatment. The aim of this work was to produce Minas Padrão Cheese using microfiltration technology and to evaluate the use of acidifying starter cultures, such as *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and aromatic cultures, such as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis biovardiacetylactis* and *Leuconostoc* sp. The milk was microfiltrated using a ceramic membrane of 1,4 µm average diameter pore. In the design of this experiment, there were four treatments: Minas Padrão Cheese made with pasteurized milk and acidifying culture (P); Minas Padrão Cheese made with pasteurized milk and aromatic culture (PA); Minas Padrão Cheese made with microfiltrated milk and acidifying culture (M) and Minas Padrão Cheese made with microfiltrated milk and aromatic culture (MA). Since the soluble products from the bacterial metabolism of enzymatic reactions are found in the aqueous phase, the physical-chemical properties of the aqueous phase and calcium concentration were evaluated. Physical-chemical and microbiological analysis were carried out on the milk and on the cheeses. Physical-chemical analyses in the cheese and on the aqueous phase were accomplished in five maturation stages: 1, 30, 45, 60 and 75 days. Acceptance sensory tests were performed with 30 and 60 days of maturation. There was no significant difference in the cheese composition and in the process efficiency, showing that microfiltration is an alternative to pasteurization, in which heat treatment is avoid, without the cheese properties and process efficiency being affected. Water activity, dry extract and pH of the cheeses and in the aqueous phase were different ( $p \leq 0,05$ ) in terms of maturation time and were not

different ( $p > 0,05$ ) between treatments. PA and MA treatments presented superior proteolyses compared to treatments P and M, showing that there was a larger performance of the aromatic culture on the cheese proteolysis. Texture profile analyses showed significant difference ( $p \leq 0,05$ ) along maturation for all treatments. In the beginning, treatments P and M showed larger hardness, fracturability, gumminess and chewiness, due to the lower proteolysis of them. As the calcium content on the aqueous phase, only treatment PA showed significant increase ( $p \leq 0,05$ ), which was related with the major acidification of the cheese in the beginning of the maturation. The microfiltration operation was more efficient on the elimination of aerobic mesophilic micro-organisms of the milk compared to pasteurization, reducing 3,82 log cycles, while pasteurization reduced 2,19 log cycles. None *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. and *S. aureus* were found. Coliform 30 ° C and *E. coli* counts remained within the limits of current legislation. No significant difference was found on the sensory test between the treatments for any attributes tested. Microfiltration showed to be an alternative technology to pasteurization and the use of aromatic cultures in Minas Padrão cheese viable, mostly for its potential to increase, significantly, cheese proteolysis.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil produziu 33,12 bilhões de litros de leite em 2012 (IBGE, 2012). Deste volume, parte significativa é utilizada na produção de queijos, o que coloca o Brasil em terceiro lugar no ranking mundial da produção de queijo de leite de vaca, depois da União Europeia e Estados Unidos (IDF, 2013). Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ) foram produzidos 874.240 toneladas de queijo com Inspeção Federal em 2012 (ABIQ, 2013), sendo o estado de Minas Gerais responsável por aproximadamente 40% da produção nacional. A indústria de queijo constitui um setor importante na captação de leite, contribui para o desenvolvimento de um grande número de propriedades rurais e se apresenta como uma estratégia de valorização de recursos locais.

O queijo Minas padrão é um produto tipicamente brasileiro com origem em Minas Gerais. Sua tecnologia inicialmente preservada no Estado foi difundida por todo o país, mas tem no estado mineiro maior produção e consumo. Segundo o artigo 614 do RIISPOA (1952), trata-se de um queijo de massa crua, com características sensoriais “próprios, ácidos, agradáveis e não picantes”. Pela legislação o período de maturação mínimo é de 20 dias, contudo as características sensoriais consideradas ótimas são dependentes da microbiota do queijo e do tempo.

Variações do produto, em âmbito nacional, não só devido à diferença da qualidade e composição da matéria prima, mas também devido à implementação de diferentes tecnologias de fabricação, que vêm promovendo a descaracterização do queijo Minas padrão. Tal situação é um problema para a identidade do produto que ainda não tem um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade.

O mercado lácteo está em constante mudança e as pressões econômicas internas e externas na indústria de laticínios são crescentes em razão da situação econômica global. Desta forma, as indústrias de produtos lácteos têm buscado recursos tecnológicos que melhorem a qualidade dos produtos e aumentem a produtividade e a competitividade. Dentro deste contexto, o uso da tecnologia de separação por membranas permite otimizar processos, desenvolver produtos e melhorar a qualidade nutricional, sensorial e funcional de produtos lácteos. Dentre essas operações, tem-se a microfiltração que na indústria de queijos tem sido usada principalmente para a

melhoria da qualidade da matéria prima e para a padronização do teor de caseína. A microfiltração é uma técnica de separação por membrana que, dependendo do tamanho de poro médio utilizado, pode remover micelas de caseínas, glóbulos de gordura, micro-organismos, células somáticas e partículas.

Nos últimos anos, os estudos em ciência e tecnologia de queijos têm quantificado a composição da fase aquosa do queijo, visto a importância desta nas propriedades tecno-funcionais e na multiplicação de micro-organismos do fermento láctico e da microbiota autóctone que intervêm durante a maturação dos queijos. Por ser a fase contínua do queijo, acumula os produtos hidrossolúveis resultantes do metabolismo bacteriano e reações enzimáticas, responsáveis pelas características sensoriais. Desta forma, acredita-se que uma caracterização físico-química da fase aquosa nas diferentes fases da maturação constitui uma metodologia importante para compreender as mudanças ocorridas no queijo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Inovar na elaboração de queijo Minas padrão por meio do emprego da microfiltração do leite e duas culturas láticas.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 1.** Avaliar e comparar as características físico-químicas, durante a vida de prateleira do queijo Minas padrão fabricado com leite microfiltrado em membrana de 1,4  $\mu\text{m}$ , com aquelas do queijo fabricado com leite pasteurizado (tratamento convencional/controle);
- 2.** Avaliar o efeito nas características físico-químicas da adição de duas culturas láticas no queijo Minas padrão elaborado a partir de leite microfiltrado e pasteurizado;
- 3.** Verificar a influência da utilização do leite microfiltrado e diferentes bactérias láticas na fabricação do queijo Minas padrão quanto à distribuição de cálcio na fração aquosa do queijo;
- 4.** Avaliar o perfil de textura do queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e leite pasteurizado usando diferentes bactérias láticas;
- 5.** Avaliar a aceitabilidade sensorial do queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e leite pasteurizado usando diferentes bactérias láticas.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Queijo Minas Padrão

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ) a produção de queijos no ano de 2012, com Inspeção Federal foi de 874.240 toneladas (ABIQ, 2013), sendo o estado de Minas Gerais responsável por aproximadamente 40% da produção nacional. Em 2011, foram produzidos 9.300 toneladas de queijo Minas padrão, o que representa um crescimento de 5% em relação ao ano de 2010 (ABIQ, 2012).

O queijo Minas padrão teve sua origem no Estado de Minas Gerais em um momento no qual o estado enfrentava problemas legais para comercialização dos queijos então produzidos. Surgiu por meio do desenvolvimento tecnológico para atribuir padrão às muitas variedades de queijos artesanais de expressão regional existentes no Estado, que eram produzidos por inúmeros pequenos produtores estabelecidos, principalmente, na zona rural, onde pequenas variações tecnológicas davam características divergentes a queijos denominados “queijo Minas” (Melo et al., 2009).

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produto de Origem Animal – RIISPOA, o Queijo Minas padrão é o produto obtido de leite integral ou padronizado, pasteurizado, de massa crua, prensada mecanicamente, devidamente maturado durante 20 dias. Deve apresentar o formato cilíndrico, de faces planas e bordas retas. Apresenta crosta fina e são comercializados com massa entre 1,0 kg a 1,2 kg, consistência semidura, macia, de untura manteigosa; textura com buracos mecânicos e em cabeça de alfinete, pouco numerosos; cor branco-creme, homogênea; odor e sabor próprios, ácidos, agradáveis e não picantes (Brasil, 1952).

A tecnologia de queijos no Brasil evolui em relação às culturas lácticas e coagulantes utilizados durante a fabricação e pequenas alterações no processamento do queijo, impactando amplamente nas suas características (Antunes & Saito, 2011; Furtado, 1990). Por ausência de um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) específico para o queijo Minas padrão é possível encontrar variações em queijos no mercado.

## **3.2. Separação por Membranas**

As operações de separação por membranas têm encontrado um campo vasto de aplicações nas indústrias químicas, farmacêutica e nas indústrias agroalimentares. São utilizadas para produção de água potável a partir da água do mar, mas também para o fracionamento, concentração e purificação de soluções moleculares (Brans et al., 2004).

Dentre as indústrias de alimentos, a de laticínios apresenta maior aplicação das tecnologias de membrana, tais como a microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose reversa (OR) (Carvalho e Maubois, 2010), sendo que a fabricação de queijo e o processamento de soro representam os principais campos de aplicação dessas tecnologias (Mistry e Maubois, 2004; Rosenberg, 1995; Maubois, 1991).

As operações de separação por membranas, são utilizadas para o fracionamento de misturas, soluções e suspensões abrangendo substâncias de tamanho e natureza química diferentes (Baldasso, 2008). Essas operações têm como objetivo fracionar, concentrar ou purificar um líquido, de forma a obter duas soluções de composição distintas, e baseiam-se na permeabilidade seletiva de um ou mais componentes através de membrana. As moléculas de tamanho inferior ao do poro passam através da membrana, enquanto as de tamanho superior ficam fisicamente retidas ou podem ser quimicamente retidas por forças repulsivas da superfície da membrana. A alimentação separa-se, portanto, em duas correntes: o fluido que atravessa a membrana, chamado de filtrado ou permeado e o que permanece ao lado da alimentação, que contém solutos ou sólidos suspensos, denominado de concentrado ou retentado (Lira et al., 2009).

O crescimento desta tecnologia é devido a algumas vantagens do método, tais como, a economia de energia, visto que a maioria destes ocorre sem mudança de fase, a seletividade da membrana, a separação de compostos termolábeis, pois eles operam à temperatura ambiente e a simplicidade de operação e de escalonamento por se apresentarem como sistemas modulares (Habert, et al., 2006).

### **3.2.1. Histórico**

O uso de membrana como ferramenta em operações de separação tem seu primeiro registro datado de 1748, quando o francês Abbé Nollet estudou a permeação de água através de um diafragma feito de uma bexiga de porco. Em seu experimento, Nollet emergiu em água, um copo com destilado de vinho vedado com a membrana de

origem animal e observou que após certo tempo, a bexiga se dilatava, chegando mesmo a se romper, algumas vezes. Com isso, verificaram-se as características de permeabilidade e seletividade de uma membrana (Habert, et al., 2006). Em 1906, Bechold trabalhou com uma técnica para obtenção de membranas microporosas usando nitrato de celulose. Posteriormente a técnica foi aperfeiçoada por Elford, Zsigmondy, Bachmann e Ferry e, em 1930, estas membranas se tornaram as primeiras a serem produzidas em escala comercial, utilizadas em microfiltração e diálise, mas, não evoluíram para uma escala industrial mais sólida devido, principalmente, aos baixos fluxos de permeados resultantes das elevadas espessuras das membranas disponíveis (Pouliot, 2008; Habert, et al., 2006).

No final da década de 50 foram feitos testes para dessalinização da água. Estes testes apresentaram alta retenção de sais, apesar do fluxo de permeado indesejado. Na década seguinte, Sidney Loeb e Srinivasa Sourirajan aperfeiçoaram uma técnica para preparo da membrana, desenvolvendo membranas para diversas aplicações, porém o fluxo ainda não era significativo (Pouliot, 2008). Nas décadas seguintes, as técnicas com membranas tiveram um avanço significativo, passando a ter caráter industrial. Para tornar as operações de separação com membranas mais viáveis que as operações de separação existentes, estudos foram feitos para melhoria da seletividade e a redução da resistência ao transporte das espécies permeantes pela membrana (Habert et al., 2006).

Na indústria de queijo, o uso das operações de separação por membranas teve início em 1960 com a invenção do processo MMV, assim chamado devido as iniciais dos seus inventores Maubois, Mocquot e Vassal. Esse processo abriu novos caminhos para avanços na fabricação de queijos, incluindo melhorias na eficiência da planta, aumento de rendimento do queijo e a possibilidade de desenvolver novas variedades de queijos por ser um processo contínuo. Com a introdução e sucesso do processo MMV, as aplicações das tecnologias de membranas na indústria de queijo têm-se expandido claramente, sendo hoje aplicada na fabricação de diversos tipos de queijos com diversas finalidades, tais como, remoção de células somáticas e bactérias do leite e enriquecimento do leite com caseína micelar (Mistry e Maubois, 2004).

### **3.2.2. Métodos de filtração e caracterização das membranas**

Nos sistemas das Operações de Separação por Membranas, basicamente, duas configurações de escoamento são utilizados: o modo convencional (dead-end) e o modo

tangencial (cross-flow). No primeiro, a solução de alimentação escoava perpendicularmente à superfície da membrana, promovendo a formação de uma camada semelhante a uma torta, devido ao acúmulo das partículas retidas. No modo tangencial, a alimentação escoava ao longo da superfície da membrana e o permeado atravessava transversalmente a mesma, gerando o acúmulo de apenas parte das partículas retidas, pois as partículas depositadas sobre a membrana, ou retentado, são constantemente arrastadas pela própria corrente tangencial da alimentação. Como ocorre menor acúmulo de material retido sobre a superfície da membrana, esta apresenta menor tendência à polarização por concentração e ao entupimento com resíduos orgânicos e minerais (fouling) (Baldasso, 2008; Saxena et al., 2009; Habert et al., 2006).

Uma variedade de materiais é usada na fabricação de membranas, em função da sua aplicação e das propriedades desejadas e, dependendo do material, estas são classificadas em membranas orgânicas e inorgânicas. As membranas orgânicas são produzidas a partir de materiais poliméricos, como polipropileno, polietileno, policarbonato, polissulfona, poliamida e polietersulfona. Esses tipos de membrana dominam o mercado devido a sua diversidade quanto a diferentes tipos de polímeros existentes e quanto à disponibilidade no mercado, além de apresentarem um campo de aplicação amplo. Já as membranas inorgânicas são compostas de uma fina camada de material inorgânico sobre um suporte cerâmico ou metálico. Os materiais para as membranas inorgânicas incluem vidro, metal sinterizado, materiais cerâmicos e ainda os poliméricos inorgânicos. Dentre os materiais mais utilizados para fabricação de membranas cerâmicas podem-se citar a alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), o zircônio ( $\text{ZrO}_2$ ) e o titânio ( $\text{TiO}_2$ ). Esse tipo de membrana é produzido há mais de 20 anos, mas só recentemente começaram a disputar o mercado com as membranas poliméricas (Baldasso, 2008; Habert, 2006).

As membranas cerâmicas possuem propriedades desejáveis quando comparadas às membranas poliméricas, possuindo maior estabilidade física, química, térmica e microbiológica, o que aumenta a sua vida útil (Brans et al., 2004); no entanto, possuem alto custo, pouca flexibilidade na configuração e baixa área superficial em relação ao volume da membrana (Goulas e Grandison, 2008; Habert, 2006).

### 3.2.3. Classificação

As operações de separação por membranas podem ser classificadas quanto ao tipo de membrana utilizada na separação, quanto ao princípio de operação, quanto aos fenômenos envolvidos ou com base na força motriz promotora da separação (Petrus, 1997). As operações que têm a diferença de pressão como força motriz são classificadas em MF, UF, NF e OR. (Petrus, 1997). Essas operações são as mais utilizadas nas indústrias de laticínios (Carvalho e Maubois, 2010) e utilizam da microfiltração à osmose reversa, meios filtrantes com poros cada vez menores e com isso, pressões cada vez maiores (Habert et al., 2006).

A MF, como qualquer outro processo de separação por membranas, é uma técnica que permite a concentração diferencial no líquido retido pela membrana, de componentes com tamanho maior que o diâmetro médio do poro da membrana. É a mais antiga das tecnologias de membranas, com numerosas aplicações na esterilização do ar e da água. No entanto, a utilização da microfiltração tangencial (MFT) nos tratamentos de líquidos alimentares é recente, sendo a última tecnologia de membrana a alcançar escala industrial (Saboya, 2002).

O diâmetro médio dos poros de membranas de microfiltração pode variar de 10  $\mu\text{m}$  a 0,1  $\mu\text{m}$ , o que significa que a microfiltração pode ser utilizada para separações específicas de partículas em suspensão (Saboya e Maubois, 2000).

Na operação de UF utilizam-se membranas porosas, cujo diâmetro de poro varia entre 0,01 e 0,1  $\mu\text{m}$  e pressão de 2 a 10 bar (Habert et al., 2006). A UF é a tecnologia de membranas mais utilizada na indústria de queijo, e seu uso se divide em três categorias: padronização do teor de proteína do leite, que está sendo cada vez mais utilizado nas indústrias queijeiras devido às vantagens que esta padronização conduz, dentre elas, melhor produtividade, redução do volume de coalho e um ligeiro aumento no rendimento; uso de concentrados com fator médio de concentração, principalmente, com o objetivo de aumentar consideravelmente o rendimento e por fim, uso de líquido pré-queijo que consiste em concentrar o leite na UF até obter um concentrado com a composição da coalhada drenada (Mistry e Maubois, 2004).

A NF também é uma operação que possui gradiente de pressão como força motriz e utiliza membranas com poros de tamanho médio de um nanômetro. Nesta operação, a lactose e todos os outros componentes do leite são retidos, o que permite a permeação de íons monovalentes solúveis e água (Carvalho e Maubois, 2010).

Já as membranas usadas na OR retêm solutos de tamanhos inferiores a um nanômetro e possuem uma massa molar de corte de aproximadamente 100 Da, sendo relativamente densas, praticamente sem poros. A operação envolve pressões, em média, cinco a dez vezes superiores às utilizadas na ultrafiltração, sendo empregada em indústrias de laticínios para concentrar o leite ou soro de leite por eliminação de água (Rosenberg, 1995).

### **3.2.4. Aplicação da microfiltração na indústria de laticínios**

O leite contém partículas cuja distribuição de tamanho é relativamente bem definida por faixa de tamanho. Por ordem decrescente de tamanho têm-se as células somáticas (15 – 6  $\mu\text{m}$ ), glóbulos de gordura (15 – 0,2  $\mu\text{m}$ ), bactérias (6 – 0,2  $\mu\text{m}$ ) e micelas de caseínas (0,08 – 0,45  $\mu\text{m}$ ) (Pierre et al., 1998). Portanto, a MF do leite permite a retenção desses componentes. As pressões empregadas como força motriz são pequenas e dificilmente ultrapassam 3 bar, já que utilizam membranas com tamanho médio de poros maiores em relação aos demais operações (Habert et al., 2006).

Diversas são as aplicações da MF na indústria de laticínios, sendo as principais: remoção de bactérias e esporos, enriquecimento de caseína micelar para fabricação de queijos, remoção de células somáticas do leite cru, microfiltração de salmouras e fracionamento de proteínas do leite (Carvalho e Maubois, 2010; Dias, 2011; Saboya e Maubois, 2000; Neocleous et al., 2002). A maior aplicação da MF na indústria de laticínios consiste na remoção de micro-organismos do leite desnatado, resultando numa matéria-prima comercialmente estéril, que posteriormente pode ser destinada ao consumo in natura, ou ainda a fabricação de queijos, leites fermentados ou produtos lácticos de longa estocagem, como pós ou derivados proteicos (Fauquant et al., 1988; Saboya; Maubois, 2000).

#### **3.2.4.1 Aplicação da microfiltração na indústria de queijo**

O uso de leite microfiltrado na fabricação de queijos tem sido estudado e comparado àqueles fabricados com leites pasteurizado e cru. Já existem estudos sobre o emprego de leite microfiltrado na fabricação de vários tipos de queijos (McSweeney et

al., 1993; Bouton e Grappin, 1995; Beuvier et al., 1997; Rodriguez et al., 1999; Maubois et al., 2000; Skeie et al., 2000; Awad et al., 2010; Dias, 2011).

Inicialmente, o leite microfiltrado foi sugerido para a elaboração de queijos que necessitam de longo período de maturação, pois com a remoção de esporos, que normalmente resistem ao tratamento térmico, o problema de estufamento tardio seria reduzido ou eliminado, sem necessidade da adição de nitrato (Meershon, 1989; Saboya, 2002). Foi também proposto como uma tecnologia alternativa para assegurar aos consumidores de queijos fabricados com leite cru, total inocuidade de alimentos, uma vez que, a microfiltração reduz a concentração de bactérias e esporos bacterianos no leite, podendo, portanto, ser utilizada em substituição ao tratamento térmico. Apesar de promover a inocuidade dos alimentos o tratamento térmico pode induzir modificações irreversíveis dos componentes do leite, alterar o equilíbrio físico-químico e também afetar negativamente a qualidade sensorial e capacidade de fabricação de queijos (Brans et al, 2004; Saboya, 2002; Mistry e Maubois, 2004).

Uma redução logarítmica de 6,5, 5,4 e 4,1 de mesófilos aeróbicos, coliformes totais e *Clostridium* sp., respectivamente, foi obtida em queijos com olhaduras produzidos a partir de leite microfiltrado em membrana cerâmica com tamanho médio de poro de 1,4  $\mu\text{m}$  (Dias, 2011). Awad et al. (2010) observaram que a contagem bacteriana foi reduzida de 150.000 UFC/mL no leite desnatado para 250 UFC/mL e 1 UFC/mL no leite pasteurizado e microfiltrado, respectivamente, utilizando também membrana cerâmica com tamanho médio de poro de 1,4  $\mu\text{m}$ .

Com o uso de leite MF, tem-se uma problemática de como fazer queijo de boa qualidade com um leite ultra-limpo. Isso conduz a outra área de pesquisa e permite a determinação do papel de cada micro-organismo no processo de maturação. O estudo do ecossistema microbiano no queijo e o das interações existentes entre as bactérias autóctones e as bactérias do fermento láctico permite uma melhor escolha de linhagens quando destinadas à fabricação de queijos, em função do local de origem (Saboya, 2002; Mistry e Maubois, 2004; Awad et al., 2010).

MsSweeney et al., (1993), a fim de avaliar a importância dos NSLAB (bactérias lácticas não starter) na maturação do queijo Cheddar, fabricaram queijos a partir de leite cru, leite pasteurizado (72 °C, 15 segundos) e leite microfiltrado (unidade da Alfa-Laval, membrana com tamanho médio de poro de 1,4  $\mu\text{m}$ ) padronizado com creme pasteurizado (72 °C, 30 segundos). Na avaliação sensorial, microbiológica, e bioquímica dos queijos maturados a 10 °C, não foi observado diferenças entre os

queijos fabricados com leite MF e pasteurizado, mas, verificou-se diferença desses dois queijos com os queijos fabricados com leite cru. Nestes, foi observado características de sabor e aroma mais atípicos, maiores concentrações de aminoácidos livres, ácido glutâmico livre e ácidos graxos livres durante a maturação. A profundidade de proteólise nesses queijos foi maior, resultante da maior atividade de peptidases, presumivelmente proveniente de NSLAB. Esses autores concluíram que a microbiota endógena do leite afeta a qualidade do queijo Cheddar fabricado com leite cru.

Beuvier et al., (1997) avaliaram o uso de leite cru, microfiltrado ( membrana 1,4  $\mu\text{m}$ , unidade Alfa-Laval) padronizado com creme pasteurizado (72 °C, 30 segundos), leite pasteurizado (72 °C, 30 segundos) ou pasteurizado misturado ao retentado de microfiltração, na fabricação de queijos tipo Suíço, com o objetivo de estudar a influência das bactérias nativas do leite e da pasteurização na qualidade desse queijo. Esses pesquisadores concluíram que ao final da maturação, os queijos fabricados com leite cru e com o retentado de microfiltração mostraram produção de aroma e sabor mais intensos, quando comparados aos queijos fabricados com leite MF e pasteurizado. No final da maturação, os queijos fabricados com leite cru e retentado de MF tiveram um pH mais alto que os queijos com leite MF e pasteurizado. A concentração de  $\gamma$ -caseína foi maior nos queijos de leite pasteurizado, refletindo maior atividade da plasmina nesses queijos. A adição da microbiota do retentado ao leite pasteurizado restaurou quase todas as características bioquímicas e sensoriais dos queijos fabricados com leite cru avaliadas nesse estudo.

Awad et al., (2010), com o objetivo de produzir queijo Domiati com qualidade microbiológica, textura e sabor similar aos queijos feitos com leite cru produziram este queijo a partir de leite pasteurizado (74 °C, 15 segundos) e de leite microfiltrado desnatado, ambos padronizados com creme pasteurizado (78 °C, 15 segundos) utilizando diferentes misturas e quantidades de culturas. Os queijos feitos com leite MF um dia após a fabricação (D + 1), apresentaram contagem bacteriana total inferior, menor teor de umidade e pH mais elevado quando comparado ao queijo feito com leite pasteurizado. Ao longo do tempo de maturação houve menor proteólise e menores quantidades de aminoácidos livres nos queijos MF em relação ao queijo feito com leite pasteurizado, o que levou a menor pontuação na intensidade de sabor nos queijos MF na avaliação sensorial. Nesta, também foi observado que os queijos MF receberam maiores notas para corpo e textura em relação aos queijos feitos com leite pasteurizado. Os resultados mostraram que é possível fazer queijos Domiati com alta qualidade

microbiológica e características similares aos queijos feitos com leite cru utilizando leite MF, desde que seja utilizada uma combinação de culturas adjuntas.

### **3.3. Bactérias lácticas starter e não starter em queijo**

A microbiota da maioria dos queijos pode ser dividida em dois grupos: bactérias lácticas starter e bactérias lácticas não starter (NSLAB) ou cultura secundária. As bactérias lácticas starter estão envolvidas na produção de ácido durante a fabricação do queijo e contribuem para o processo de maturação. As NSLAB podem até contribuir para a produção de ácido durante a fabricação do queijo, mas, têm um papel significativo durante a maturação, no desenvolvimento de sabor e aroma e nas características originais de cada queijo (Beresford et al., 2001).

#### **3.3.1. Cultura starter**

A cultura starter tem como função primária produzir ácido láctico a partir da lactose durante a fabricação do queijo. Segundo Beresford et al. (2001), a cultura starter é definida como isolado que produz ácido suficiente para reduzir o pH do leite para valores menores ou iguais a 5,3 em até 6 horas a 30-37 °C. Mas, as bactérias starters também contribuem para a maturação dos queijos onde suas enzimas estão envolvidas na proteólise e conversão de aminoácidos em compostos aromáticos (Fox e Wallace, 1997).

Segundo Beresford et al. (2004), as bactérias starters fornecem uma contribuição mais significativa para biomassa microbiana em queijos jovens, geralmente atingindo densidade de  $10^8$  UFC/g dentro de um dia de fabricação. Esta biomassa representa considerável potencial biocatalítico para reações de maturação de queijos. No entanto, a maioria das enzimas das bactérias starters são intracelulares o que leva ao não acesso imediato na matriz do queijo. Durante a maturação de queijos os starters liberam suas enzimas no processo de autólise.

As bactérias starters são utilizadas na fabricação de queijos e possuem importante papel no desenvolvimento de ácido e na sinérese durante a fabricação do queijo (Robinson, 2002). Elas são adicionadas em alimentos para multiplicar e rapidamente aumentar o número de micro-organismos desejáveis, reduzindo o tempo de fermentação e inibindo o desenvolvimento de patógenos e bactérias deteriorantes (Fellows, 2006). As bactérias starters encontradas na maioria das vezes são membros

dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* (Beresford et al., 2001).

O gênero *Lactococcus* é composto por sete espécies, *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. chungangensis* e *L. fujiensis*, sendo que a espécie *L. lactis* apresenta três subespécies (*cremoris*, *lactis* e *hordniae*) e uma biovariedade formadora de diacetil (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*) (Wright, 2012).

As espécies que compõem o gênero *Lactococcus* são Gram positivas, catalase negativa, homofermentativas, microaerofílicas, têm capacidade de multiplicar a 10 °C, em pH ótimo de 6,0-6,5, mas não a 45 °C. Em temperatura ambiente de 20-30 °C levam de 10-20 horas para fermentar o leite cru (Teuber & Geis, 2006; Casalta et al., 2008). A espécie *L. lactis* se destaca pela sua importância tecnológica, onde ambas as subespécies *lactis* e *cremoris* são utilizadas como culturas starter na produção de vários tipos de queijos na indústria de laticínios, e são responsáveis pela qualidade, segurança microbiológica e vida de prateleira destes produtos (Mayo et al., 2010).

O gênero *Lactococcus* possui um sistema proteolítico altamente rico, com enzimas capazes de hidrolisar completamente peptídeos derivados da caseína em aminoácidos, que são os precursores dos compostos de aroma (Chapman; Sharpe, 1990; Monnet et al., 1993). Esse sistema é constituído por uma protease ligada à parede celular, que tem como substrato maior a  $\beta$ -caseína e por várias peptidases intracelulares: três aminopeptidases, uma dipeptidase, uma tripeptidase, uma X-prolil dipeptidil aminopeptidase, uma prolidase e no mínimo três endopeptidases (Monnet et al, 1993).

As funções metabólicas do *Lactococcus* são importantes na formação de sabor e aroma de queijos macios. Em queijo fresco, como o queijo cottage, o composto diacetil é altamente desejado. O diacetil é produto da fermentação do citrato no leite pelos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Para realçar o sabor e aroma do diacetil, o leite ou o creme na produção de queijos como cottage, podem ser enriquecidos com citrato (Robinson, 2002).

Um dos maiores gêneros pertencentes ao grupo das bactérias lácticas é *Lactobacillus* (Axelsson, 2004). As espécies utilizadas como starters *Lb. delbruekii*, *Lb. helveticus* e *Lb. acidophilus* são homofermentativos obrigatórios, multiplicam melhor em condições microaeróbicas, são termo tolerante, desenvolvem no leite em temperatura ótima de 43 a 46 °C, são ácido tolerantes e produzem alta acidez em leite (Robinson, 2002; Beresford, 2004).

Segundo Fox, (1993), *Streptococcus thermophilus* é considerado o segundo grupo starter mais importante, tecnologicamente, após *Lactococcus*. Possuem a temperatura ótima de desenvolvimento entre 35 e 42 °C (Robinson, 2002). Em condições de estresse *Streptococcus thermophilus* possuem baixa atividade proteolítica, mas possuem atividade de uréase normal. Sendo assim, eles podem ativamente hidrolisar a uréia presente no leite com formação de NH<sub>3</sub> e CO<sub>2</sub>. A habilidade do *Streptococcus thermophilus* em fornecer CO<sub>2</sub> e aminoácidos constitui em um importante papel para a multiplicação simbiótica especialmente com *Lactobacillus* (Vedamuthu, 1994).

As espécies de *Leuconostoc* que estão associadas com cultura lática starter são *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc lactis*. *Leuconostoc* isolados de produtos lácteos são morfologicamente pequenos, apresentam células esféricas e longas. Eles são mais tolerantes ao ácido que *Lactococcus* e possuem sistema enzimático para fermentar o citrato (Axelsson, 2004).

*Le. mesenteroides* subsp. *cremoris* é um micro-organismo bastante sensível em seu processo de multiplicação e em seu metabolismo. Produz lentamente quantidades muito pequenas de ácido láctico no leite (cerca de 0,2 %). São cocos mesófilos e produzem quase que somente o ácido láctico na sua forma isomérica D(-). Seu desenvolvimento inicial depende da presença de outra cultura para abaixar o pH em torno de 5 a 6, valor mínimo requerido para iniciar o crescimento da população (Furtado, 2002).

*Leuconostoc* manifesta elevada atividade de hidrogenase alcoólica. A enzima álcool dehidrogenase catalisa a redução do acetaldeído para álcool etílico, desse modo reduzindo o sabor e aroma indesejável de “frutas” devido ao excesso de acetaldeído. Assim, *Leuconostoc* são preferidos em misturas starter para queijos macios porque suas atividades conduzem ao suave sabor de diacetil (Robinson, 2002).

### **3.3.2. Bactérias lácticas não starter (NSLAB)**

NSLAB representa uma proporção significativa da população microbiana de, todas as variedades de queijo maturado. Exceto para *Leuconostoc*, NSLAB não são intencionalmente adicionados como parte da cultura acidificante inicial, mas, como cultura que multiplicam durante a maturação, que podem estar presente intencionalmente ou não. Os principais gêneros envolvidos são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Enterococcus* (Beresford et al., 2004).

O gênero *Lactobacillus* constitui a maioria da população de NSLAB na maioria das variedades de queijo durante a maturação (Beresford et al., 2001). Eles multiplicam em uma faixa de temperatura de 2 a 53 °C e são ácido-tolerante com um pH ideal para o desenvolvimento de 5,5 a 6,2 (Beresford et al., 2004). *Lactobacillus* NSLAB encontrados regularmente nos queijos são heterofermentativos facultativos (Holt et al., 1994).

O gênero *Lactobacillus* estava presente em 19 de 35 queijos europeus e foi um dos principais componentes da microbiota do queijo artesanal da Serra da Estrela (Cogan et al., 1997). Dolci et al. (2010), estudaram a dinâmica da população, desde a fabricação até a maturação, do queijo Caltelmagno. No primeiro mês de maturação houve o predomínio dos gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus* sendo encontradas as espécies *S. thermophilus*, *S. agalactiae* e *L. lactis*. Já no final da maturação houve um predomínio do gênero *Lactobacillus*, principalmente das espécies *Lb. plantarum* e *Lb. casei*.

O gênero *Pediococcus* tem sido utilizado como cultura adicionada para melhorar o sabor do queijo Cheddar e Feta, mas esse gênero também pode predominar a microbiota não starter do queijo. As estirpes *Pe. acidilactici* e *Pe. pentosaceus* são as isoladas com maior frequência a partir de queijo (Beresford et al., 2004).

*Enterococcus* são bactérias classificadas dentro da definição geral das bactérias do ácido láctico por serem Gram positivas e catalase negativa. São frequentemente isolados de queijos artesanais produzidos com leite cru. Produzem compostos que atuam no sabor e aroma, como diacetil e acetoína (Girafa, 1997). As espécies isoladas frequentemente são *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans* (Beresford, 2004).

*Enterococcus* ocorrem de forma generalizada no ambiente, mas são associados principalmente com o trato digestório e, por isso, a sua presença nos produtos alimentícios é vista como um indicador de falta de higiene. No entanto, *Enterococcus* têm uma história de uso seguro em laticínios e, adicionalmente, os produtos podem exibir características probióticas ou produzir bacteriocinas (Franz et al., 1999).

### **3.4. Fase Aquosa de Queijo**

Queijo é composto de uma rede de paracaseinato, elementos dispersos (células, cristais e ar) e um líquido intersticial, no qual chamamos de fase aquosa, contendo vários compostos dissolvidos, dentre eles, minerais (Gaucheron et al, 1999). A fase aquosa é a fase na qual estão presentes os micro-organismos e na qual se acumulam

produtos hidrossolúveis resultantes do metabolismo bacteriano de reações enzimáticas (Adda, 1987).

As primeiras tentativas para estudar a composição da fase aquosa do queijo envolvendo sua extração física utilizando alta pressão foi feita por Barthel et al. (1928), Sandberg et al. (1930), McDowall e Dolby, (1936). Tais autores estavam preocupados que a extração utilizando água poderia alterar as propriedades físico-químicas do queijo, produzindo, portanto, resultados errôneos. Esses autores utilizaram esse método de extração para avaliar principalmente na fase aquosa o teor de nitrogênio, lactose, teores de ácido láctico, obtendo assim, resposta para o fenômeno de maturação do queijo. Mais tarde, essa técnica foi utilizada como meio para acompanhar a composição de minerais da fase aquosa do queijo (Monib, 1962; Morris et al, 1988, Lucey e Fox, 1993, Lucey et al 1993; Salvat-Brunaud et al, 1995; Thierry et al, 1998; Boutrou et al, 1999, Lucey et al., 2004). Segundo Lucey et al. (2004), a extração da fase aquosa pelo método de alta pressão é o método ideal para estudar o equilíbrio de minerais no queijo, pois não há diluição ou solubilização dos componentes do queijo.

A aplicação da extração por pressão a diferentes tipos de queijos de massa dura permitiu demonstrar a atividade do coalho no queijo (Barthel et al., 1928b) e o aumento dos teores de nitrogênio solúvel no decorrer da maturação (Sandberg et al., 1930). Os teores de nitrogênio da fase aquosa extraídas de queijos como Emmental, Edam, Roquefort, Limburgo e Stilton foram avaliados, bem como analisados a evolução dos teores em lactose e ácido láctico de queijo Cheddar e NaCl, Nitrogênio, Ca e P de queijo Edam durante a maturação (Sandberg et al., 1930; Monib, 1962).

Thierry et al., (1998) avaliaram a dinâmica da população bacteriana e a evolução da composição da fase aquosa de queijos congelados e não congelados. Os autores observaram uma redução de 8 % no conteúdo de cálcio dos queijos congelados, um aumento no teor de sólidos da fase aquosa durante a maturação, assim como um aumento de pH tanto da fase aquosa quanto no queijo, sendo que o pH da fase aquosa foi ligeiramente mais elevado que o do queijo. Segundo os autores, a maioria da troca de minerais entre a rede de paracaseína e a fase aquosa foi feita no período de acidificação, antes da salga. Foi observada pouca variação no teor de cálcio na fase aquosa durante o período de maturação do queijo. Os autores afirmam que a extração da fase aquosa por prensagem tem várias vantagens para acompanhar as alterações bioquímicas no queijo, permitindo avaliar as mudanças minerais entre a rede de paracaseína e a fase aquosa durante a maturação do queijo.

Em outro trabalho realizado por Thierry (1999), 82 compostos voláteis foram identificados tanto na fase aquosa quanto na fase lipídica do queijo em pelo menos um estágio de maturação, incluindo 18 aldeídos, 13 álcoois primários e 4 secundários, 16 ésteres, 14 cetonas e compostos sulfurados, 12 hidrocarbonetos e 2 compostos clorados. Mais compostos foram recuperados a partir da fase aquosa e da gordura do que nas amostras de queijo analisadas.

Gaucheron et al., (1999), para estudarem o comportamento de sal em um gel modelo (similar a queijo) durante a salga e armazenagem sob atmosfera amoniacal, utilizaram o método de extração de fase aquosa do gel para determinação de sais. Segundo os autores a metodologia de extração tem a vantagem de preservar o equilíbrio de minerais e obter uma quantidade suficiente de fase aquosa sem necessitar de fazer diluição.

Boutrou et al., (1999) avaliaram as mudanças na composição da fase aquosa de queijo Camembert ao longo da maturação. Foi observado que a quantidade de fase aquosa extraída diminuiu ao longo do tempo de maturação do queijo, assim como um aumento de pH e sólidos totais na fase aquosa do queijo. Já no queijo, foi observado um aumento do pH na superfície e uma redução do pH no centro. O teor de cálcio na fase aquosa aumentou no início da maturação devido a ação de bactérias lácticas na fermentação da lactose e conseqüentemente redução do pH, mas, no final da maturação foi observado uma redução no teor de cálcio devido principalmente ao aumento do pH na superfície do queijo e conseqüentemente precipitação de cálcio.

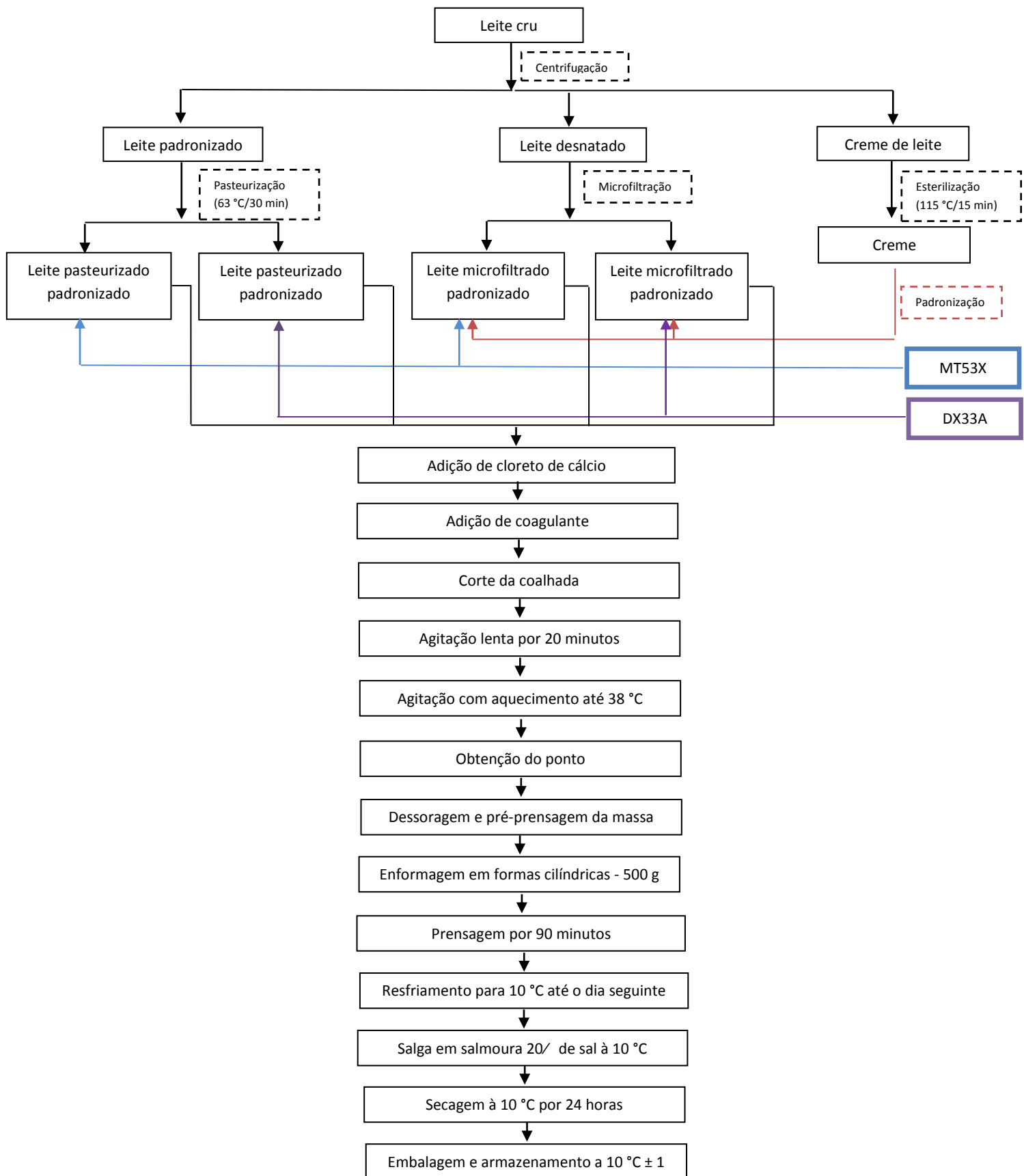
Lucey et al., (2004) ao estudar a evolução de Ca solúvel e insolúvel em fase aquosa de queijo Cheddar e no queijo Cheddar, respectivamente, ao longo de 12 semanas de maturação, observou que o conteúdo de cálcio insolúvel diminuiu de 69,72 % para 57,87 %, o que segundo os autores indicou que durante a maturação do queijo há conversão de Ca insolúvel para Ca solúvel e essa conversão está diretamente relacionada com mudanças de textura no queijo ao longo da maturação, juntamente com os efeitos conhecidos de proteólise.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

As atividades deste projeto foram conduzidas no Laboratório de Pesquisa em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados INOVALEITE, do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), no laboratório de Absorção Atômica do Departamento de Solos e no Laticínios Escola, da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e no Laboratório de Genética da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora.

### **4.1. Fabricação do Queijo Minas Padrão**

Na Figura 1 é apresentado o fluxograma geral de fabricação do queijo Minas padrão, de acordo com Furtado (2005), cada tratamento (tanque de fabricação) foi conduzido com 150 litros de leite.



**Figura 1.** Fluxograma de fabricação do queijo Minas padrão. MT53X = Cultivo bacteriano composto por *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; DX33A = Cultivo bacteriano composto por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* e *Leuconostoc* sp.

O leite foi coletado no estábulo no dia da produção dos queijos e transportado até o laticínio Escola por um caminhão isotérmico. Ao chegar ao laticínio, uma amostra de leite foi coletada (Leite cru) para análises posteriores. O leite foi transferido para um tanque de estocagem passando pela etapa de filtração. Na sequência, o leite foi centrifugado obtendo-se leite padronizado com o teor de gordura em torno 3,5%, leite desnatado e creme de leite. Parte do leite foi direcionada para pasteurização lenta (65 °C por 30 min), e o restante foi destinado à microfiltração. Na microfiltração, utilizou-se membrana cerâmica tubular “Membralox®” com poro de tamanho médio 1,4 µm. O leite a 50 °C foi filtrado tangencialmente a uma velocidade de permeação de 7,2 m·s<sup>-1</sup>, transportado para os tanques de camisa dupla em latões previamente esterilizados e padronizado para 3,5% de gordura com adição de creme de leite tratado termicamente em autoclave (115 °C por 15 min) e resfriado para 40 °C (Figura 1).

Dois tratamentos, um com leite pasteurizado e outro com leite microfiltrado, foram conduzidos com bactérias lácticas acidificantes *S. thermophilus* (50%), *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (50%) (cultivo MT53X – DSM Food Specialties). E os outros dois tratamentos foram conduzidos com bactérias lácticas aromatizantes *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (50%), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* e *Leuconostoc* sp. (50%) (cultivo DX33A – DSM Food Specialties). As culturas foram diluídas em leite desnatado reconstituído (LDR) estéril e armazenadas a temperatura de -20 °C. As quantidades de culturas adicionadas no leite para fabricação do queijo foram de acordo com o especificado pelo fabricante.

Na fabricação do queijo Minas padrão (Figura 1), a cultura foi adicionada em 150 litros de leite a uma temperatura de 35 °C, sendo respeitados 30 minutos de pré-maturação. Em seguida procedeu-se à coagulação do leite, a uma temperatura de 33 °C ± 1 °C, com adição de 75 mL de uma solução 40 % (m/v) de cloreto de cálcio (Produtos Macalé LTDA) e 9 mL coalho líquido (Maxiren®, DSM Food Specialties). Após 30 minutos de coagulação, a coalhada foi cortada lentamente em cubos médios (1,0 cm a 1,5 cm de aresta), iniciando a primeira mexedura com duração de 20 minutos, seguida da segunda mexedura com aquecimento lento da massa com vapor indireto até 38 °C. O processo de mexedura se estendeu até o ponto, que foi medido pela ligeira consistência dos grãos. O soro foi drenado (sendo todo coletado para posterior amostragem) e a massa pré-prensada, com duas vezes o seu peso estimado, no próprio tanque de fabricação, por 15 min. No passo seguinte, o bloco de massa foi cortado e colocado em

formas cilíndricas de 500 g, equipadas com dessoradores. Os queijos foram prensados por 30 minutos com peso equivalente a 10 vezes o peso do queijo e, em seguida, foram virados nas formas e recolocados na prensa, trocando-se a posição dos queijos que ficaram na parte superior para a inferior para nova prensagem por mais 60 minutos com o mesmo peso. Ao final, os queijos foram virados e levados para a câmara fria à 10 °C, onde permaneceram até o dia seguinte no qual foram levados para a salga em salmoura a 20 % (m/v) de sal em temperatura de 10 °C por 8 horas. Posteriormente, os queijos foram deixados na secagem a 10 °C e a 70 % de umidade relativa até o dia seguinte, quando foram embalados em embalagens plásticas termoencolhíveis a vácuo. Os queijos foram armazenados em BOD a 10 °C, para a realização das análises nos tempos previstos.

#### **4.2. Extração da fase aquosa dos queijos**

A fase aquosa do queijo Minas padrão foi extraída nos tempos 1, 30, 45, 60 e 75 dias de maturação, de acordo com a metodologia descrita por Salvat-Brunaud (1995). Os queijos foram ralados e 1.800 g misturados a 3.600 g de areia com granulometria entre 150 a 250 µm. A mistura foi colocada em uma tela de filtro descartável (Smith and Nephew extruded Films LTDA) e em seguida em um molde de inox perfurado que permite o escoamento da fase aquosa. Esse molde foi então colocado em uma placa de aço inoxidável e prensado durante 180 minutos usando uma prensa hidráulica (ABF technology, França). Após extração da fase aquosa esta foi centrifugada a 3000 g e o sobrenadante analisado quanto a atividade de água, pH, teor de extrato seco e cinzas, sendo o restante armazenado à -20 °C, seguida de degelo em câmara fria (4 °C), no momento das demais análise.

#### **4.3. Análises de composição centesimal e físico-químicas**

Para cada produção foi analisado no leite cru, nos leites padronizados (microfiltrado e pasteurizado) e no soro o potencial hidrogeniônico (pH), densidade, gordura, acidez, extrato seco, proteína e resíduo mineral fixo. A fase aquosa dos queijos e os queijos foram analisados quanto ao pH, atividade de água, extrato seco, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 12 % e cálcio. Além dessas análises, foram feitas nos queijos o teor de gordura, gordura no extrato seco, cloreto de sódio, concentração das frações  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\kappa$ -caseína e perfil de textura.

#### 4.3.1. Determinação de pH

A determinação pH foi realizada, de acordo com Wehr e Frank (2004), utilizando medidor de pH Hanna® modelo HI 2221, São Paulo, introduzindo o eletrodo diretamente na amostra.

#### 4.3.2. Determinação de densidade

A determinação de densidade foi realizada por meio do termolacto-densímetro (LANARA, 1981).

#### 4.3.3. Determinação de acidez

A determinação de acidez foi realizada de acordo com o método descrito por Wehr e Frank (2004). Os resultados foram expressos em percentual de ácido láctico ( $m \cdot v^{-1}$ ) segundo a equação:

$$A = \frac{Ci \times fc \times v \times 9}{V} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que A é a acidez expressa em percentual de ácido láctico ( $m \cdot v^{-1}$ ); Ci a concentração da solução de hidróxido de sódio ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); fc é o fator de correção da solução de hidróxido de sódio; v é o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra e V o volume da amostra.

#### 4.3.4. Determinação de umidade e sólidos totais

A determinação de umidade dos queijos foi realizada pelo método gravimétrico em estufa a  $102 \pm 2$  °C (FIL-IDF 4:2004). O resíduo obtido após evaporação representa os sólidos totais da amostra. O resultado foi obtido a partir da formula abaixo:

$$\% \text{ Umidade} = 100 - \% \text{ Sólidos totais} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\% \text{ Sólidos totais} = \frac{100 \times m_1}{m_2} \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo:

$m_1$  a perda da massa, em gramas e  $m_2$  a massa da amostra, em gramas.

#### 4.3.5. Determinação de resíduo mineral fixo

Para determinação do resíduo mineral fixo, a amostra foi submetida à incineração à 550 °C (Wehr e Frank, 2004). O resíduo mineral fixo foi calculado por meio da fórmula:

$$RMF = \frac{Pf-T}{Pi-T} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que RMF é o percentual de resíduo mineral fixo (cinzas) expresso em ( $m \cdot m^{-1}$ ); Pf é o resultado da última pesagem da amostra; Pi é o resultado da pesagem inicial, após adição da amostra e T a tara do cadinho de porcelana.

#### 4.3.6. Determinação de atividade de água

A determinação da atividade de água foi realizada a 25 °C utilizando-se medidor digital Aqualab (Decagon 3TE, Decagon Devices Inc., USA).

#### 4.3.7. Determinação de gordura

O teor de gordura foi determinado utilizando o método de Gerber, a leitura foi realizada diretamente na escala do butirômetro e o resultado expresso em percentual ( $m \cdot v^{-1}$  para leite e soro ou  $m \cdot m^{-1}$  para queijo) (Wehr e Frank, 2004).

#### 4.3.8. Determinação de gordura no extrato seco

O teor de gordura no extrato seco foi determinado indiretamente por meio da fórmula abaixo (Pereira et al., 2001)

$$\% GES = \frac{\%GD}{\%ES} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Sendo:

GES a gordura no extrato seco; GD a gordura e ES o extrato seco.

#### **4.3.9. Determinação de proteína**

O teor de proteína foi determinado a partir da análise do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. A concentração de proteína foi calculada pela multiplicação do teor de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,38 (IDF/FIL 20-1:2001).

#### **4.3.10. Determinação de nitrogênio não caseínico**

As amostras de queijo previamente solubilizadas em citrato de sódio  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , foram precipitadas em pH 4,6 com ácido clorídrico  $1,41 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e filtradas em papel de filtro Whatman n°42. O nitrogênio contido na solução foi quantificado pelo método de Kjeldahl (FIL 20B:1993), sendo convertido para concentração equivalente de proteína pelo fator 6,25.

#### **4.3.11. Determinação de nitrogênio não proteico**

As amostras de queijo previamente solubilizadas em citrato de sódio  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , foram precipitadas em solução final (12%) com ácido tricloroacético (TCA) e filtradas em papel de filtro Whatman n° 42, coletando-se uma solução límpida com peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos. O nitrogênio contido na solução foi quantificado pelo método de Kjeldahl (FIL 20B:1993), sendo convertido para concentração equivalente de proteína pelo fator 6,19.

#### **4.3.12. Extensão de maturação**

A extensão de maturação foi calculada indiretamente por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e nitrogênio total (NT), multiplicando o resultado por 100 (Wolfschoon-Pombo, 1989).

$$EM = \frac{(NS_{pH4,6})}{NT} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

#### 4.3.13. Profundidade de maturação

A profundidade de maturação (PM) foi quantificada de forma indireta por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA 12%) e nitrogênio total (NT), multiplicando-se o resultado por 100 (Wolfschoon-Pombo, 1989).

$$PM = \frac{(NSTCA\ 12\%)}{NT} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

#### 4.3.14. Determinação de cloreto de sódio

O Cloreto de sódio foi determinado pelo método das cinzas (Wehr e Frank, 2004). O resultado foi obtido a partir da formula abaixo:

$$\%NaCl = \frac{V \times f \times N \times 0,0585}{m} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

Sendo:

V o volume da solução de nitrato de prata  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  gasto na titulação, em mL; f o fator de correção da solução de nitrato de prata  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; m a massa da amostra, em gramas; N a normalidade da solução de nitrato de prata  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e 0,0585 representa miliequivalente-grama do cloreto de sódio.

#### 4.3.15. Determinação de Cálcio

No preparo das amostras, em um Erlenmyer de 125 ml foi adicionado um grama de queijo ou fase aquosa e 10 mL de ácido nitro-perclórico (1:3 de ácido perclórico e ácido nítrico). Essa mistura foi digerida em uma chapa aquecedora em duas etapas, a primeira a uma temperatura de  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos e a segunda a uma temperatura de  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  até observar a saída de fumos brancos de ácido perclórico. A amostra digerida foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL e submetidas à espectrofotometria de absorção atômica. O espectrofotômetro de absorção atômica (Agilent Technologies®, modelo 240FSAA), equipado com chama de acetileno e uma lâmpada de catodo-oco de Cálcio, foi calibrado com padrões de cálcio preparado a partir da solução de referência Cálcio (marca Merch®) antes da leitura das amostras.

#### **4.3.16. Concentração das frações $\alpha$ e $\beta$ -caseína ao longo da maturação**

O perfil protéico dos queijos foi determinado pela técnica de eletroforese microfluídica, utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Germany) e Kit específico para a determinação proteica (Protein 80 LabChip Kit) (Costa et al., 2010).

As condições de trabalho utilizadas foram: a solução tampão (pH = 3,0) usada para dissolver as proteínas presentes na solução era constituída de 7,0 M de ureia e 20 mM de bis-tris-propano. Logo após a dissolução das proteínas, foi utilizada a solução tampão (pH = 3,0), usada para separar as proteínas presentes na solução, constituída de 6,0 M de ácido cítrico e 0,05 % (m/v) de hidropilmetil celulose. Imediatamente depois do uso, 2-mercaptoetanol (5 $\mu$ L: 1 $\mu$ L) foi adicionado à solução tampão das amostras. As amostras das soluções protéicas foram diluídas na proporção de 1:4 com a solução tampão das amostras e deixadas em repouso, por 2 horas, antes de serem preparadas para serem colocadas no chip. Frações de  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína,  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina (Sigma-Aldrich/St Louis, MO, EUA) foram utilizadas como padrões. Os reagentes foram preparados de acordo com as instruções do protocolo do fabricante, cujo kit contém Gel Dye Mix, solução de descoloração, solução de desnaturação e um ladder. As amostras para a eletroforese foram preparadas em tubos de 0,5 mL, tendo uma alíquota da solução de ladder (6  $\mu$ L) sido colocada em um tubo separado. Foram combinados 4  $\mu$ L da amostra de proteína diluída com 2  $\mu$ L de solução de desnaturação do kit Protein 80, em tubos de 0,5 mL. Após este procedimento, as amostras (4  $\mu$ L) foram desnaturadas (aquecidas), a 100 °C, por 5 minutos, juntamente com o ladder (6  $\mu$ L). Depois do aquecimento, as amostras e o ladder foram refrigeradas em banho de gelo e os tubos foram centrifugados para assegurar que a amostra de líquido permanecesse no fundo. Antes, as amostras foram diluídas com 84  $\mu$ L de água, agitadas e colocadas nos poços do chip. Todos os chips foram carregados com dez amostras, em três repetições cada um.

#### **4.3.17. Análise do perfil de textura (TPA)**

Determinação do perfil de textura do queijo Minas padrão foi realizadas no Laboratório de Embalagens – DTA/UFV. Foi utilizado o Instron Universal Testing Machine, modelo 3367 (Instron Ltd., Norwood, Massachusetts, EUA). As condições de trabalho foram pré-teste, teste e pós-teste com velocidade de 1 mm/s, com distância de

compressão de 40 mm da parte superior da amostra. Uma sonda cilíndrica de 55 mm foi usada juntamente com uma célula de carga de 1 kN, movida perpendicularmente através das amostras de queijos cilíndricos (20 mm de diâmetro e 20 mm de altura) que foram colhidas do centro do queijo. As resistências exercidas pelas amostras foram automaticamente registradas e a firmeza, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade em Newton (N), elasticidade (mm) e coesividade foram calculadas pelo software Blue Hill 2.0 (Instron – Norwood, Massachusetts, EUA), utilizando dados de força (N) versus tempo (s) obtidos durante os ensaios.

#### 4.3.18. Análise do rendimento de fabricação

Os resultados obtidos das análises físico-químicas dos leites, soros de queijo e queijos e da pesagem da produção final após um dia de fabricação (antes da salga) foram utilizados para o cálculo das variáveis de rendimento de fabricação segundo metodologia descrita por Furtado (2005):

- Percentual de cifra de transição de gordura no soro foi determinado pelo método técnico, aplicando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Perda Gord. Soro} = \frac{(Kgl - P)Gs}{\left(\frac{Kgl}{Dl}\right)Gl \times Ds \times 100} \quad (\text{Eq. 9})$$

onde,

Ds é a densidade (15 °C) do soro; Dl é a densidade (15 °C) do leite; kgl representa os quilogramas de leite; Gl é a % gordura do leite; Gs é a % gordura do soro e P representa a produção de queijos (kg).

- Percentual de cifra de transição de proteína no soro foi determinado pelo método técnico, aplicando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Perda Prot. Soro} = \frac{(Kgl - P)Ps}{\left(\frac{Kgl}{Dl}\right)Pl \times Ds \times 100} \quad (\text{Eq. 10})$$

onde,

Ds é a densidade (15 °C) do soro; Dl é a densidade (15 °C) do leite; kgl representa os quilos de leite; Pl é a % proteína do leite; Ps é a % proteína do soro e P representa a produção de queijos (kg).

- Aproveitamento de sólidos no queijo em relação a cada litro de leite trabalhado ou coeficiente GL ( $\text{g ST}\cdot\text{L}^{-1}$ ), foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$g \text{ ST/L} = \frac{ST \times P \times 10}{V} \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde,

ST é a porcentagem de sólidos totais do queijo; P representa a produção de queijos (kg) e V é o volume de leite (L)

- Rendimento em litros de leite por quilo de queijo ajustado (L/kg A) foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$L/\text{KgA} = \frac{V(100-UP)}{P \times ST} \quad (\text{Eq. 12})$$

Onde,

V é o volume de leite (L); UP representa a porcentagem de umidade comum pretendida fixada em 49 % (m/m) para o queijo Minas padrão; ST é porcentagem de extrato seco dos queijos.

#### **4.4. Análises microbiológicas**

##### **4.4.1. Análises microbiológicas do leite**

Foram realizadas análises microbiológicas no leite cru, leite microfiltrado padronizado adicionado de cultura acidificante ou aromatizante e leite pasteurizado padronizado adicionado de cultura acidificante ou aromatizante.

Para preparo de cada amostra, foi transferido 1 mL da mesma para 9 mL de solução salina ( $\text{NaCl } 0,85\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ ) e foram preparadas diluições seriadas de forma a obter enumeração entre 15 e 150 unidade formadora de colônias (UFC) por placa de

Petrifilm ou 25 e 250 UFC por placa de Petri. Volumes de 1,0 mL de cada diluição selecionada foram inoculados nas placas de Petrifilm e essas foram incubadas a uma temperatura e tempo de acordo com o micro-organismo analisado. Os resultados foram obtidos pela multiplicação do número de UFC observadas pelo inverso da diluição utilizada e expressos em UFC por mililitro ( $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

#### **4.4.1.1. Enumeração de mesófilos aeróbios e anaeróbio facultativos**

Para a enumeração de mesófilos aeróbicos foram utilizadas placas Petrifilm para mesófilos aeróbicos (Petrifilm<sup>TM</sup> AC) de acordo com Wehr e Frank (2004). Após a inoculação as placas foram incubadas a  $32 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 48 horas.

#### **4.4.1.2. Enumeração de coliforme e Escherichia coli**

Volumes de 1,0 mL de leite, de cada diluição, foram inoculados em placas Petrifilm para coliformes e E. coli (Petrifilm<sup>TM</sup> EC) de acordo com Wehr e Frank (2004). As placas foram incubadas a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 - 48 horas. A leitura das placas foi realizada após 24 e 48 horas de incubação, para enumeração de coliformes totais e E. coli, respectivamente.

#### **4.4.1.3 Enumeração de psicotróficos**

Volumes de 0,1 mL de leite, de cada diluição, foram inoculados em placas de Petri estéreis contendo o Ágar Padrão para Contagem (PCA, Himedia ®) solidificado e espalhadas com alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a  $7 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 dias (Wehr e Frank, 2004).

#### **4.4.2. Análises microbiológicas no queijo**

Foram realizadas análises para enumeração de indicadores higiênicos nos queijos um dia após a fabricação. Para o preparo do homogenato, 25 g de queijo, pesados assepticamente, foram diluídos em 225 mL de solução salina peptonada 0,1 % esterilizada e posteriormente homogeneizada em um Stomacher, por 60 segundos. Foram realizadas diluições seriadas a fim de obter enumeração entre 15 e 150 colônias por placa de Petrifilm.

#### **4.4.2.1. Enumeração de Coliformes e Escherichia coli**

Volumes de 1,0 mL de cada diluição foram inoculados em placas Petrifilm para coliformes e E. coli (Petrifilm™ EC) de acordo com Wehr e Frank (2004). As placas foram incubadas a  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 24 - 48 horas. A leitura das placas foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação, para enumeração de coliformes totais e E. coli, respectivamente.

#### **4.4.2.2. Enumeração de Staphylococcus aureus**

Volumes de 1 mL de cada diluição foram inoculados em placas Petrifilm para S. aureus (Petrifilm™ Staph Express), de acordo com AOAC (2001). As placas foram incubadas a  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por  $48 \pm 2$  horas. Após a leitura da placa com enumeração das colônias típicas (colônias violeta), foi adicionado disco de Dnase por um período de 1 a 3 horas, onde foi observada a formação de halo confirmando a presença do micro-organismo, segundo o fabricante.

#### **4.4.2.3. Presença de Salmonella sp.**

Análises conduzidas conforme constante na Instrução Normativa número 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

#### **4.4.2.4. Presença de Listeria monocytogenes**

Análises conduzidas conforme constante na Instrução Normativa número 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

### **4.5. Avaliação Sensorial**

O teste de aceitação foi realizado no laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal de Viçosa, em cabines individuais, usando luz branca.

A avaliação sensorial foi feita em duas épocas, uma estando os queijos com 30 dias de maturação e outra com os queijos de 60 dias de maturação. Em ambas as etapas, os queijos foram avaliados quanto à aceitação, por 50 provadores selecionados pelo hábito de consumo de queijo, em relação aos atributos impressão global, textura, aroma e sabor.

Foram apresentadas aos provadores, as amostras contendo aproximadamente 15 gramas de queijo de cada tratamento à temperatura de aproximadamente 15 °C, devidamente codificadas com três dígitos e servidas de modo aleatório. Um copo de água filtrada e um biscoito de água e sal foram fornecidos aos provadores para diminuir a interferência entre as amostras.

Cada provador recebeu uma ficha de avaliação para cada amostra e foi solicitado que indicasse na escala hedônica de 9 pontos o seu julgamento em relação a aceitação do produto, sendo atribuída nota 9 para gostei extremamente e 1 para desgostei extremamente (Minín, 2006).

Os resultados foram submetidos à ANOVA em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System) versão 9.2, licenciado para Universidade Federal de Viçosa. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

#### **4.6. Delineamento Experimental e Análise Estatística**

O experimento foi realizado em quatro repetições, seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com os seguintes tratamentos: queijo Minas padrão produzido a partir de leite pasteurizado adicionado de bactéria láctica acidificante (P) ou adicionado de bactéria láctica aromatizante (PA) e queijo Minas padrão produzido a partir de leite microfiltrado adicionado de bactéria láctica acidificante (M) ou adicionado de bactéria láctica aromatizante (MA).

O leite utilizado nas produções dos queijos e o soro, provenientes das fabricações foram analisados quanto à gordura, EST, proteína, cinzas, densidade, acidez e pH. Os queijos logo após a fabricação (D+1) foram avaliados quanto a umidade, gordura, GES, NaCl, cinzas, proteína e pH. Todos esses resultados, juntamente com os resultados de rendimento de produção, foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e pela comparação de médias pelo teste de Tukey.

No queijo, a análise da evolução dos atributos acidez, atividade de água, índice de extensão de proteólise, índice de profundidade de proteólise, degradação das moléculas de caseína, cálcio e perfil de textura foram avaliados utilizando um modelo de parcelas subdivididas, com quatro tratamentos aplicados nas parcelas, com quatro repetições; e as avaliações ao longo dos tempos 1, 30, 45, 60 e 75 dias de maturação constituíram as subparcelas, que foram estudadas mediante análise de regressão.

A fase aquosa dos queijos, para cada tratamento, foi extraída nos tempos 1, 30, 45, 60 e 75 dias de maturação sendo analisado o pH, a atividade de água, o extrato seco, o resíduo mineral fixo, cálcio, o nitrogênio total, o nitrogênio solúvel em pH 4,6 e o nitrogênio solúvel em TCA 12 %. Tais atributos foram avaliados utilizando um modelo de parcelas subdivididas, com os quatro tratamentos aplicados nas parcelas, com quatro repetições e as avaliações ao longo dos tempos constituíram as subparcelas que foram estudadas mediante análise de regressão.

Para as variáveis que apresentaram efeito significativo da interação (tratamento e tempo) foi feito o desdobramento, no qual se avaliou os diferentes tratamentos para cada tempo de estocagem e a tendência, via regressão, em função do tempo de estocagem, para cada tratamento.

O comportamento dos dados estudados ao longo da maturação do queijo Minas padrão foram modelados estatisticamente pelas equações apresentados em cada Figura, sendo cada modelo ajustado considerando a não significância ( $p > 0,05$ ) para a falta de ajuste e a significância ( $p < 0,05$ ) para os coeficientes de regressão. Desta forma, os dados se ajustaram às equações de forma empírica.

Todos os dados foram analisados por meio do programa estatístico Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2006) versão 9.2, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Composição físico-química do leite utilizado na fabricação do queijo

Os resultados da composição físico-química média do leite utilizado nas fabricações dos queijos Minas padrão dos quatro tratamentos encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1** – Valores médios das análises físico-químicas realizadas no leite empregado na fabricação dos queijos Minas padrão

Análises	Amostras							
	LP		LPA		LM		LMA	
Gordura (% m/v)	3,74	a	3,80	a	3,70	a	3,62	a
EST (% m/v)	11,84	a	11,94	a	11,47	a	11,64	a
Proteína (% m/v)	3,26	a	3,24	a	3,21	a	3,17	a
Cinzas (% m/v)	0,71	a	0,71	a	0,70	a	0,69	a
Densidade (% g/mL)	1,0309	a	1,0314	a	1,0306	a	1,0308	a
Acidez* (% m/v)	0,16	a	0,16	a	0,16	a	0,16	a
pH	6,64	a	6,66	a	6,70	a	6,69	a

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

LP = Leite pasteurizado destinado à fabricação de queijo Minas padrão com cultura acidificante; LPA = Leite pasteurizado destinado a fabricação de queijo Minas padrão com cultura aromatizante; LM = Leite microfiltrado destinado a fabricação de queijo Minas padrão com cultura acidificante; LMA = Leite microfiltrado destinado a fabricação de queijo Minas padrão com cultura aromatizante; EST = Extrato Seco Total; \* = % de compostos ácidos expressos como ácido láctico.

Como pode-se observar na Tabela 1, o leite utilizado para a fabricação dos queijos Minas padrão dos diferentes tratamentos apresentaram composição físico-química muito semelhante, não apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) para nenhuma das variáveis analisadas, significando que os tratamentos utilizados não influenciaram na variação destes componentes. Este resultado deve-se, também, ao uso do leite do mesmo tanque de estocagem de leite cru.

### 5.2. Composição físico-química dos queijos em D + 1

Os resultados das análises físico-químicas dos queijos Minas padrão dos quatro tratamentos encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2** – Valores médios das análises físico-químicas dos queijos Minas padrão em D + 1

Variáveis	Tratamentos							
	P		PA		M		MA	
Gordura (% m/m)	29,30	a	29,20	a	28,40	a	30,00	a
Umidade (% m/m)	45,50	a	46,20	a	46,80	a	45,50	a
Proteína (% m/m)	20,60	a	20,00	a	19,10	a	19,90	a
GES	54,00	a	54,00	a	53,00	a	55,00	a
NaCl (% m/m)	0,99	a	1,06	a	1,12	a	0,95	a
Cinzas (% m/m)	3,50	a	3,30	a	3,50	a	3,34	a
pH	5,23	a	5,22	a	5,15	a	5,16	a

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante; GES = Gordura no Extrato Seco.

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para nenhuma das variáveis estudadas na composição do queijo Minas padrão (Tabela 2). Essa similaridade na composição dos queijos indica que o processo de fabricação e o método empírico de detecção do ponto pela consistência da coalhada foram precisos e reproduzíveis nas diferentes fabricações.

De acordo com os resultados da Tabela 2, o queijo Minas padrão pode ser classificado, conforme o Regulamento de Identidade e Qualidade de Queijos (Brasil, 1996) como um queijo de média (entre 36,0 % m/m e 45,9 % m/m) a alta umidade (entre 46,0 % m/m e 54,9 % m/m) e gordo (entre 45,0 % e 59,9 % de GES). Os queijos atualmente encontrados no mercado divergem dos valores de composição físico-química encontrados neste trabalho principalmente devido a não existência de critérios legais. Segundo Brumano et al. (2011), ao avaliar resultados físico-químicos de queijos Minas padrão comercializado ao longo de doze anos, foi observado que a umidade dos queijos variaram de 43,4 % a 57,4 % (m/m) e a GES variou de 43,9 % a 70,4 %.

### 5.3. Composição físico-química do soro

Os resultados das análises físico-químicas dos soros obtidos das fabricações dos queijos Minas padrão dos diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3** – Valores médios das análises físico-químicas dos soros obtidos das fabricações dos diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos							
	SP		SPA		SM		SMA	
Gordura (% m/v)	0,35	a	0,32	a	0,31	a	0,32	a
EST (% m/v)	6,53	a	6,50	a	6,44	a	6,39	a
Proteína (% m/v)	0,89	a	0,88	a	0,92	a	0,92	a
Cinzas (% m/v)	0,51	a	0,52	a	0,50	a	0,51	a
Densidade (% g/mL)	1,0274	a	1,0270	a	1,0278	a	1,0274	a
Acidez* (% m/v)	0,10	a	0,11	a	0,11	a	0,11	a
pH	6,52	a	6,51	a	6,52	a	6,53	a

Nas linhas, letras iguais indicam valores semelhantes, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

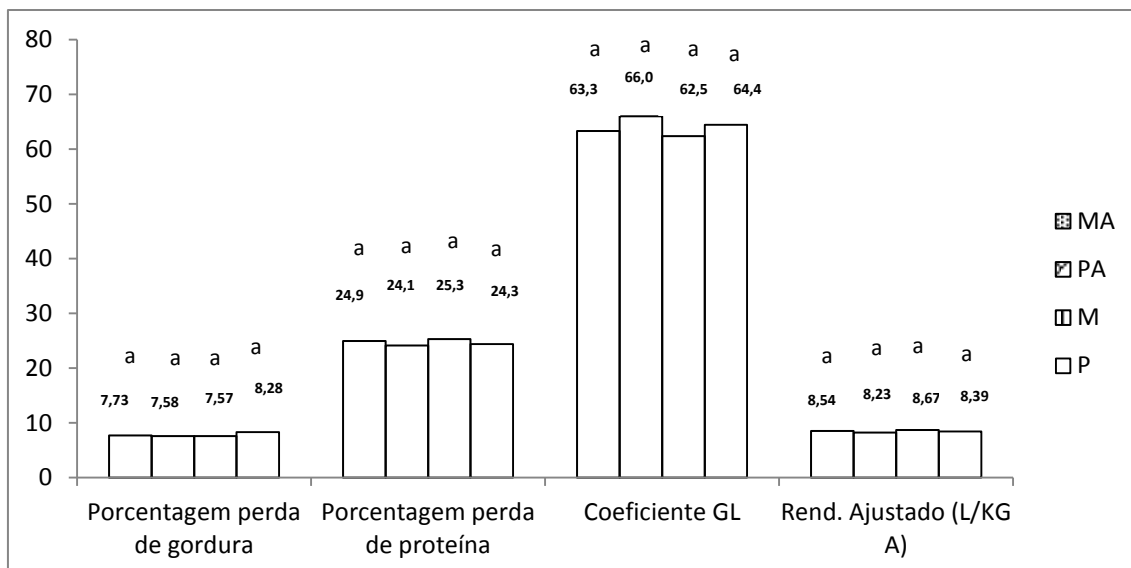
SP = Soro obtido da fabricação de queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; SPA = Soro obtido da fabricação de queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; SM = Soro obtido da fabricação de queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; SMA = Soro obtido da fabricação de queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante; EST = Extrato Seco Total; \* = % de compostos ácidos expressos como ácido láctico.

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para nenhuma das variáveis estudadas na composição do soro proveniente da fabricação do queijo Minas padrão.

Os valores obtidos para a composição físico-química do soro do queijo Minas padrão são semelhantes aos valores encontrados por Teixeira e Fonseca (2008) ao avaliarem o perfil físico-químico de soro de queijo Minas padrão produzido em diversas regiões do estado de Minas Gerais. Esses autores relataram valores médios de pH de 6,3, acidez de 0,13 % (m/v), EST de 6,28 % (m/v), proteína de 0,80 % (m/v) e densidade de 1,0249 (g/mL).

#### 5.4. Análise de rendimento

Na Figura 2 são mostrados os resultados dos diferentes métodos de avaliação de rendimento, utilizados no experimento para o queijo Minas padrão.



**Figura 2** – Métodos de avaliação de rendimento do queijo Minas padrão. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante. Letras iguais indicam médias semelhantes a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para nenhuma das variáveis de rendimento estudadas.

Não foi observado diferença nas variáveis, indicando que a princípio, a microfiltração é uma tecnologia alternativa, na qual se evita o tratamento térmico sem, contudo, alterar as propriedades iniciais e de rendimento do queijo Minas padrão.

Será abordado, nos próximos tópicos, o estudo físico-químico do queijo Minas padrão e de sua fase aquosa ao longo de 75 dias de maturação, a 10 °C.

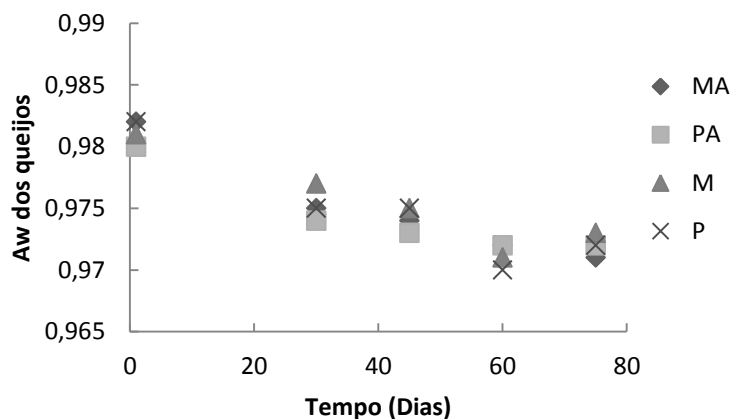
## 5.5. Características físico-químicas do queijo Minas padrão e de sua fase aquosa durante o período de maturação

### 5.5.1. Atividade de água ( $A_w$ )

A Figura 3 apresenta a evolução da  $A_w$  ao longo do tempo de armazenamento em função dos diferentes tratamentos utilizados para o queijo Minas padrão.

Houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao valor de  $A_w$  para o tempo de armazenamento. Pelo estudo de regressão, a variável atividade de água apresentou tendência linear de redução ao longo do tempo, conforme o modelo e gráfico apresentados na Figura 3. A interação entre tratamento e período de armazenamento e

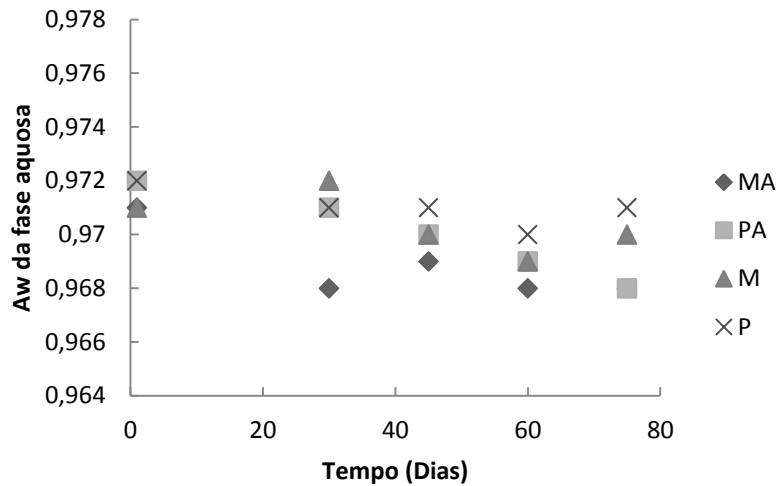
para tratamento, segundo a análise de variância, não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ).



**Figura 3** – Acompanhamento da Aw dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante. Modelo  $y = 0,98098 - 0,0002364 \text{ tempo}$  ;  $R^2=0,96$

A Aw de um queijo tende a baixar à medida que avança sua maturação, devido à perda de água por evaporação e a hidrólise de proteínas para peptídeos e aminoácidos e triglicerídeos para glicerol e ácidos graxos. A hidrólise de cada ligação peptídica ou éster requer uma molécula de água (Beresford et al., 2001). No seguinte trabalho, os fatores determinantes para a redução da Aw no queijo foi a hidrólise de proteína e triglicerídeos, uma vez que os queijos foram embalados logo após a salga evitando assim a redução da Aw por evaporação.

A Aw da fase aquosa extraída dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação pode ser observada na Figura 4. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstraram que houve influência de cada tratamento e do tempo de maturação ( $p\leq 0,05$ ) na fase aquosa dos queijos em relação à Aw. Pelo estudo da regressão, nenhum dos modelos testados explica a variação da Aw ao longo do tempo de maturação. A interação entre tratamento e tempo de maturação segundo análise de variância foi não significativa ( $p>0,05$ ).



**Figura 4** – Acompanhamento da Aw da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante

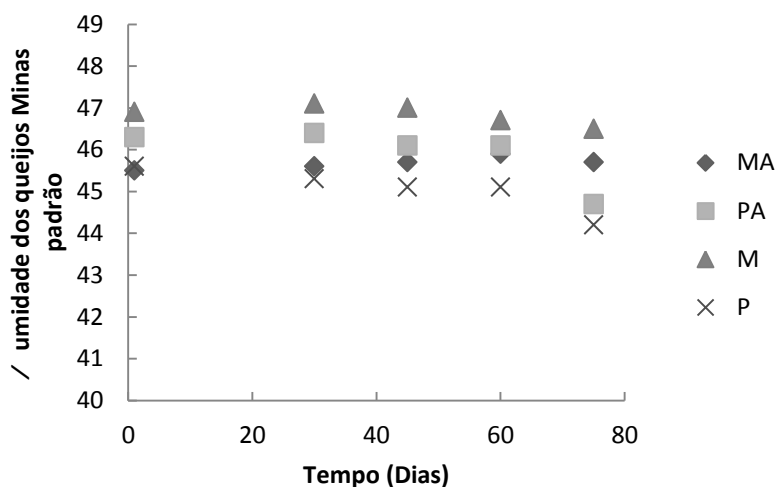
Assim como no queijo, houve redução no valor de Aw da fase aquosa, para todos os tratamentos (Figura 4). Mas diferentemente do observado no queijo, a Aw da fase aquosa dos tratamentos MA e PA apresentaram maior redução em relação aos tratamentos M e P. Tal fato deve-se a maior proteólise, nos queijos MA e PA em relação aos queijos M e P. Ou seja, nos tratamentos MA e PA, houve maior liberação de eletrólitos, compostos ionizados e outros elementos que se ligam com a água.

A determinação dos valores de Aw de um queijo é importante uma vez que os mesmos têm implicação direta nas reações enzimáticas e no desenvolvimento microbiano, assim como os valores de pH e umidade (Beresford et al., 2001).

### 5.5.2. Umidade e Extrato Seco

Na avaliação durante o tempo de armazenamento, a análise de variância indicou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao valor de % umidade para o tempo de armazenamento (Figura 5). Pelo estudo de regressão, apesar da falta de ajuste ter sido não significativa para os modelos linear e quadrático, os parâmetros da regressão foram não significativos e o  $R^2$  foi muito baixo indicando que os modelos testados não explicam a variação do teor de umidade em função do tempo. A interação entre

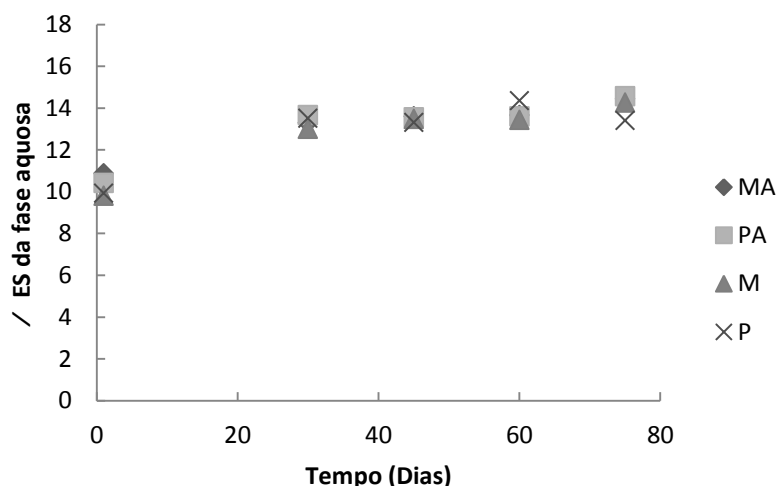
tratamento e tempo de maturação e para tratamento, segundo a análise de variância, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 5** – Acompanhamento do teor de umidade dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante

O comportamento significativo na redução da % de umidade no queijo ao longo do tempo não era esperado, visto que os queijos foram embalados em embalagens plásticas termoencolhíveis a vácuo, possuindo assim, pouca permeabilidade ao vapor de água, ao oxigênio e ao  $\text{CO}_2$ .

O extrato seco (ES) da fase aquosa extraída dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação pode ser observado na Figura 6. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstram que houve influência do tempo de maturação ( $p \leq 0,05$ ) na fase aquosa dos queijos em relação ao ES. Pelo estudo de regressão, a variável ES apresentou tendência linear de aumento ao longo do tempo, conforme o modelo e gráfico apresentados na Figura 6. O tratamento e a interação entre tratamento e tempo de maturação segundo análise de variância não foram significativos ( $p > 0,05$ ).



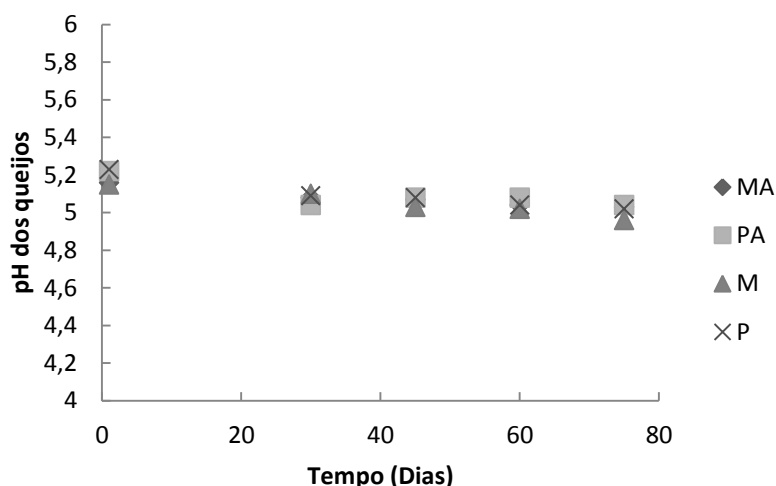
**Figura 6** – Acompanhamento do ES da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante. Modelo  $y = 10,35583 + 0,11343 \text{ tempo}$ ;  $R^2 = 0,93$

O aumento na porcentagem de extrato seco está vinculado, principalmente, à proteólise, devido à solubilização de compostos nitrogenados (Thierry et al., 1998; Salvat-Brunaud et al., 1995).

### 5.5.3. Potencial hidrogeniônico – (pH)

A Figura 7 mostra a evolução do pH ao longo do tempo de armazenamento em função dos diferentes tratamentos utilizados para o queijo Minas padrão.

Na avaliação durante o tempo de armazenamento, a análise de variância indicou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao valor de pH para o tempo de armazenamento. Pelo estudo de regressão, a variável pH apresentou tendência linear de redução ao longo do tempo, conforme o modelo e gráfico apresentados na Figura 7. A interação entre tratamento e período e para tratamento, segundo a análise de variância, não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7** – Acompanhamento do pH dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante. Modelo  $y = 5,17355 - 0,00229 \text{ tempo}$ ;  $R^2 = 0,87$

Reduzir a escala do gráfico

Observa-se que nos 30 primeiros dias de maturação, o valor de pH médio dos quatro tratamentos foi reduzido de 5,19 para 5,08. A partir dos 30 dias de maturação, verifica-se uma pequena redução de 5,08 para 5,01.

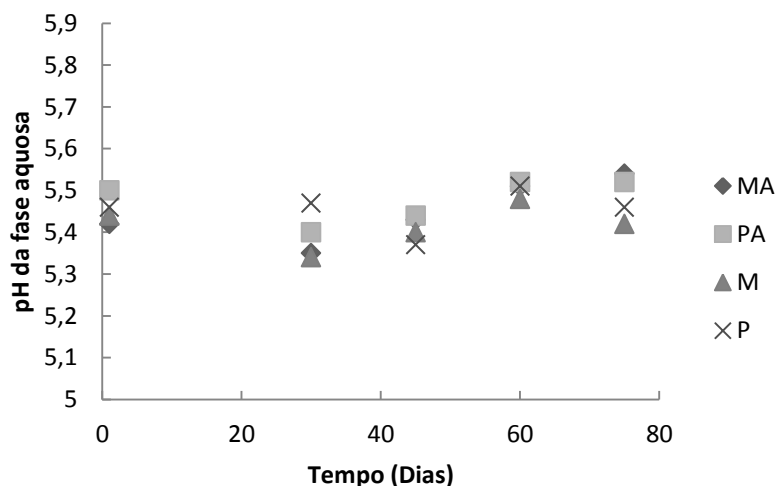
O pH dos queijos normalmente apresenta comportamento inverso ao teor de lactose na massa que, dependendo da variedade, é consumida em, aproximadamente, duas semanas. Em queijos com alto teor de lactose, o pH continua decrescendo durante a maturação (Fox et al., 2000).

Os valores médios de pH encontrados neste experimento foram similares aos encontrados por Paula (2010), que avaliou o efeito de dióxido de carbono e água carbonatada em queijo Minas padrão. O autor encontrou um valor médio de pH de 5,14 no tempo D + 1 e 5,09 no tempo D + 30.

Londoño (1998) ao avaliar a composição físico-química de sete marcas de queijo Minas padrão, encontrou valores médios de pH menores aos observados neste experimento. O autor obteve valores médios de pH variando de 4,91, nos tempos 3 a 5 dias, a 4,85, nos tempos 28 a 32 dias.

O pH da fase aquosa extraída dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação pode ser observado na Figura 8. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstraram que houve influência do tempo de maturação ( $p \leq 0,05$ ) na fase aquosa dos queijos em relação ao pH. Pelo estudo de regressão, apesar da falta de ajuste ter sido não significativa para os modelos linear e quadrático, os parâmetros da

regressão foram não significativos e o  $R^2$  foi muito baixo indicando que os modelos testados não explicam a variação do pH em função do tempo. O tratamento e a interação entre tratamento e tempo de maturação, segundo análise de variância, foi não significativa ( $p>0,05$ ).



**Figura 8** – Acompanhamento do pH da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante

Na Figura 8, verifica-se que o pH da fase aquosa pouco variou ao longo do tempo de maturação. Pode-se observar que os valores de pH da fase aquosa do queijo foram superiores ao do pH do queijo. Tal diferença deve-se, a diluição de compostos de caráter ácido (Salvat-Brunaud et al., 1995) e a maior precisão dos resultados, visto que foi utilizado na análise o mesmo pHmetro, cujo o eletrodo é próprio para solução. A análise efetuada no queijo foi feita inserindo o eletrodo diretamente no queijo, que pode resultar em valores menos confiáveis em relação aos resultados da fase aquosa, onde o eletrodo foi colocado diretamente em meio líquido.

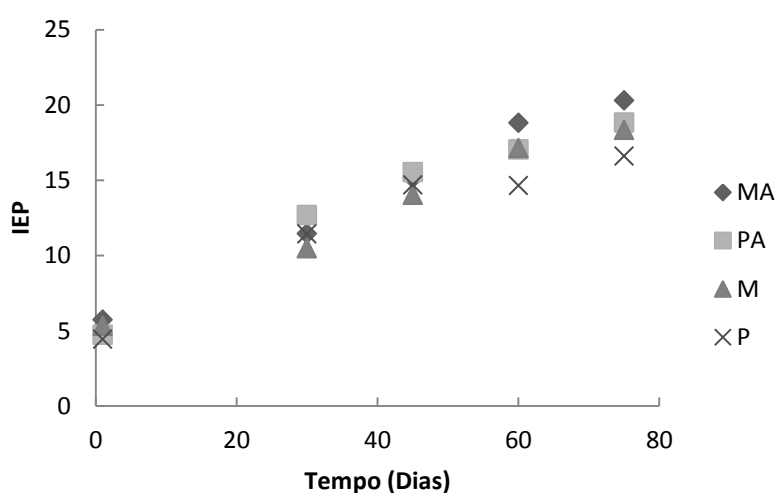
A variação de pH observada na fase aquosa está diretamente ligada ao equilíbrio entre o desenvolvimento de proteólise e produção de compostos como amônia, a partir da degradação de aminoácidos, que possuem caráter alcalino, contribuindo, portanto, para o aumento de pH e presença eventual da lactose residual que combinada a baixa temperatura na maturação possibilita que resíduos da lactose permaneçam por várias semanas sendo esta degradada lentamente, por ação de bactérias do fermento ou por NSLAB e neste caso redução de pH (Furtado, 2005). Fermentações de outros substratos

que não a lactose gera outros ácidos nos queijos, por exemplo, a fermentação do lactato de cálcio leva a formação de ácido propiônico e de ácido acético, que podem reduzir o pH (Furtado, 2005).

Dias (2011), ao avaliar o uso da tecnologia de microfiltração e diferentes culturas em queijo com olhaduras, também observou, ao analisar a fase aquosa dos queijos, um aumento de pH de aproximadamente 5,40 para 5,86 ao longo do tempo de maturação. A autora observou que nos tratamentos onde foi adicionado culturas NSLAB, o pH da fase aquosa foi maior ao longo de todo o período de maturação, o que segundo a autora, deve-se a contribuição dessas culturas no desenvolvimento da proteólise. A autora também observou esse aumento de pH nos queijos, sendo que os valores de pH da fase aquosa e dos queijos encontravam-se muito próximos. Lucey et al (2004) afirmam que os valores de pH do queijo e da fase aquosa são os mesmos, já Salvat-Brunaud et al. (1995) observou valores maiores no pH da fase aquosa que foi explicado pela dissolução dos compostos de caráter ácido.

#### 5.5.4. Índice de Extensão de Proteólise

O índice de extensão de proteólise (IEP) dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação pode ser observado na Figura 9. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstram que houve influência de cada tratamento, do tempo de maturação e da interação entre tratamento e o tempo de maturação ( $p \leq 0,05$ ), em relação à IEP.



**Figura 9** – Acompanhamento do IEP dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante

Modelos: MA:  $y = 5,72468 + 0,06564 \text{ tempo} + 0,0564 \text{ tempo}^2$ ;  $R^2 = 0,98$   
PA:  $y = 4,7836 - 0,31043 \text{ tempo} - 0,00167 \text{ tempo}^2$ ;  $R^2 = 0,99$   
M:  $y = 5,41041 + 0,18225 \text{ tempo}$ ;  $R^2 = 0,96$   
P:  $y = 4,45219 + 0,29129 \text{ tempo} - 0,00178 \text{ tempo}^2$ ;  $R^2 = 0,99$

Avaliando cada tratamento em função do tempo de maturação, verifica-se que para o queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado com adição de cultura aromatizante (MA) (Figura 9), o modelo que melhor ajustou foi o de 2º grau, sendo que este tratamento apresentou na maioria dos tempos estudados um maior IEP, variando de 5,72 % no tempo D + 1, a 20,29 % no tempo D + 75. Em relação ao queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado com adição de cultura aromatizante (PA), o modelo que melhor se ajustou também foi o de 2º grau, sendo que o IEP para este tratamento variou de 4,74 % em D + 1 a 18,84 % em D + 75. Já em relação ao queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado com adição de cultura acidificante (M) o modelo que melhor ajustou foi o de 1º grau, no qual apresentou um valor em D + 1 de IEP de 5,32 % e em D + 75, 18,35 %. O queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado com adição de cultura acidificante (P) obteve melhor ajuste no modelo de 2º grau, apresentando uma variação de IEP de 4,43 % em D + 1 a 16,59 % em D + 75.

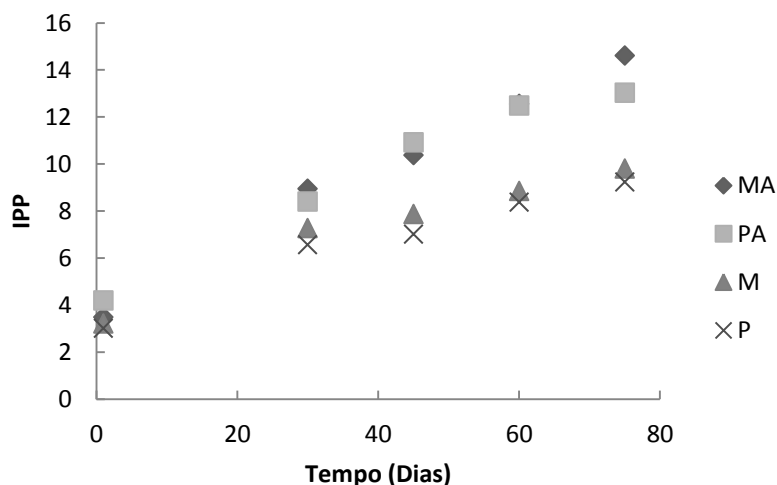
Observa-se, portanto, um aumento do IEP para todos os tratamentos, destacando que ao final da maturação os tratamentos que continham cultura aromatizante tiveram valores mais elevados, indicando, assim, a atuação de enzimas proteolíticas da cultura láctica, que neste índice não é tão expressiva quanto a das enzimas do coalho residual e da plasmina. Estas atuam na degradação da matriz proteica, principalmente na fração  $\alpha_{s1}$ -caseína, formando substâncias nitrogenadas solúveis, sendo as principais: peptídeos de alto massa molar, peptídeos de cadeia curta e aminoácidos (Upadhyay et al., 2004)

Os valores médios para IEP neste experimento foram similares aos observados por Londoño (1998) que obteve valores médios de índices de extensão variando de 7,92 %, nos tempos 3 a 5 dias, a 15,28 %, nos tempos 28 a 32 dias ao avaliar as características físico-químicas de sete marcas de queijo Minas Padrão.

### 5.5.5. Índice de Profundidade de Proteólise

O Índice de Profundidade de Proteólise (IPP) dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação pode ser observado na Figura 10. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstram que houve influência de cada tratamento, do tempo de

maturação e da interação entre tratamento e o tempo de maturação ( $p \leq 0,05$ ), em relação à IPP.



**Figura 10** – Acompanhamento do IPP dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante.

Modelos: MA:  $y = 3,87304 + 0,14581 \text{ tempo}$  ;  $R^2 = 0,97$

PA:  $y = 4,63554 + 0,12314 \text{ tempo}$  ;  $R^2 = 0,96$

M:  $y = 3,31451 + 0,14162 \text{ tempo}$  ;  $R^2 = 0,98$

P:  $y = 3,42399 + 0,08145 \text{ tempo}$  ;  $R^2 = 0,96$

Avaliando cada tratamento em função do tempo de maturação, verifica-se que o modelo de 1º grau foi o que melhor se ajustou à todos os tratamentos. O queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado com adição de cultura aromatizante (MA) (Figura 10), apresentou na maioria dos tempos estudados um maior IPP, variando de 3,49 % no tempo D + 1, a 14,61 % no tempo D + 75. Em relação ao queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado com adição de cultura aromatizante (PA), o IPP variou de 4,20 % em D + 1 a 13,03 % em D + 75. Já em relação ao queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado com adição de cultura acidificante (M) um valor em D + 1 de IPP de 3,22 % e em D + 75, 9,81 % foi encontrado. O queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado com adição de cultura acidificante (P), apresentou uma variação de IEP de 3,02 % em D + 1 a 9,24 % em D + 75.

O IPP abrange as substâncias nitrogenadas de baixo massa molar acumuladas durante o processo de maturação, sendo elas, peptídeos de cadeia curta e aminoácidos, formados principalmente pela ação de peptidases dos micro-organismos presentes, sobre os peptídeos formados (Choisy et al, 1997; Wolfschoon-Pombo, 1983). Esse conceito explica a obtenção de um maior IPP para os tratamentos MA e PA, que continham em

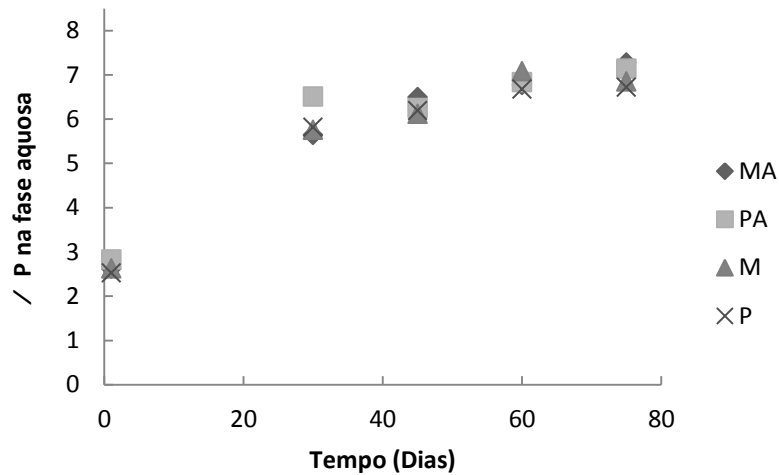
sua composição as bactérias aromatizantes *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (50%), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* e *Leuconostoc* sp. (50%). Já os tratamentos M e P continuam na sua composição bactérias acidificantes, composta por *S. thermophilus* (50%), *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (50%). A composição do cultivo aromatizante proporcionou maior variedade e quantidades de aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases que são responsáveis pela degradação da matriz proteica. As bactérias lácticas starters são a principal fonte de peptidases em queijo que são responsáveis pela hidrólise de peptídeos produzidos a partir das caseínas pela ação da quimosina ou plasmina, liberando aminoácidos (Upadhyay et al., 2004).

Os valores médios encontrados para IPP neste experimento foram similares aos observados por Londoño (1998) que obteve valores médios de índices de profundidade variando de 5,92 %, nos tempos 3 a 5 dias, a 10,59 %, nos tempos 28 a 32 dias ao avaliar o padrão físico-químico de sete marcas de queijo Minas padrão.

Os valores médios de IPP encontrados neste experimento para os tratamentos M e P também foram similares aos encontrados por Paula (2010), que avaliou o uso de dióxido de carbono e água carbonatada em queijo Minas padrão. O autor utilizou na produção do queijo Minas padrão, cujo processo de fabricação foi similar ao utilizado neste experimento, um fermento láctico mesofílico composto por: *L. lactis* ssp. *Lactis* e *L. lactis* ssp. *cremoris*. Foi encontrada pelo autor uma média de IPP nos tempos 1, 30, 60 e 90 dias de 2,49 %, 5,26 %, 8,19 % e 9,63 %, respectivamente.

#### **5.5.6. Proteína, Nitrogênio Solúvel em pH 4,6 e Nitrogênio Solúvel em TCA 12 % da fase aquosa do queijo Minas padrão**

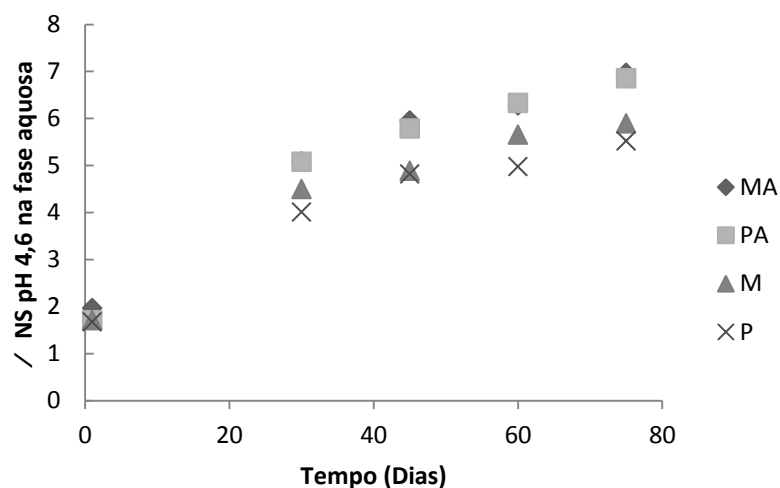
O teor de proteína (P) foi calculado multiplicando o teor de nitrogênio total pelo fator 6,38, da fase aquosa extraída dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação pode ser observado na Figura 11. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstraram que houve influência do tempo de maturação ( $p \leq 0,05$ ) na fase aquosa dos queijos em relação a variável P. Pelo estudo de regressão, a variável P apresentou tendência linear de aumento ao longo do tempo, conforme o modelo e gráfico apresentados na Figura 11. O tratamento e a interação entre tratamento e tempo de maturação segundo análise de variância não foram significativos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11** – Acompanhamento do teor de proteína da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante. Modelo  $y = 2,71218 + 0,12567 \text{ tempo}$ ;  $R^2 = 0,98$

O aumento do teor de P na fase aquosa (Figura 11) reflete a degradação da matriz protéica, com formação de fragmentos de caseína.

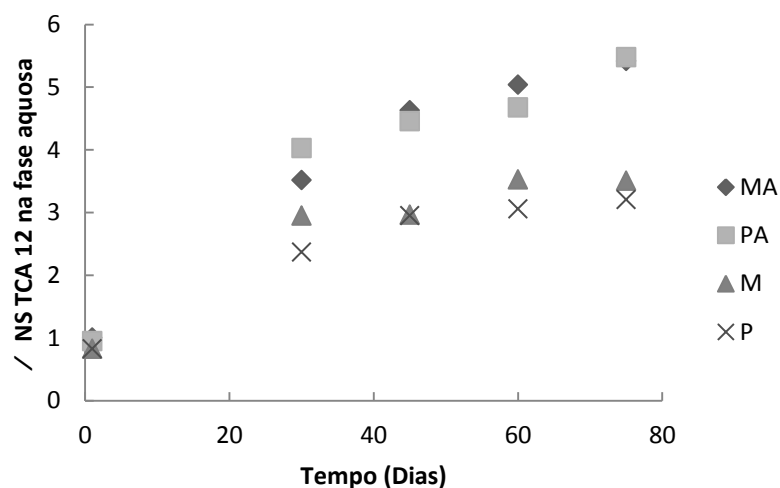
O teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) da fase aquosa extraída dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação pode ser observado na Figura 12. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstraram que houve influência do tempo de maturação e de cada tratamento ( $p \leq 0,05$ ) na fase aquosa dos queijos em relação ao parâmetro NS pH 4,6. Pelo estudo de regressão, nenhum dos modelos testados explicam a variação do NS pH 4,6 ao longo do tempo de maturação do queijo Minas padrão. A interação entre tratamento e tempo de maturação segundo análise de variância não foi significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 12** – Acompanhamento do teor de NS pH 4,6 da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante

Observando a Figura 12 e comparando-a com a Figura 11 (acompanhamento do teor de proteína total da fase aquosa) verifica-se que no início da maturação o teor de NS pH 4,6 corresponde a quase 70 % do teor de proteína total da fase aquosa, e essa relação chega a quase 100 % no final da maturação, para os tratamentos MA e PA. Já para os tratamentos M e P o teor de NS pH 4,6 corresponde a quase 65 % do teor de proteína total da fase aquosa, e essa relação chega a quase 82 % no final da maturação.

O teor de nitrogênio solúvel em TCA 12 % (NS TCA 12 %) da fase aquosa dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação pode ser observado na Figura 13. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstram que houve influência de cada tratamento, do tempo de maturação e da interação entre tratamento e o tempo de maturação ( $p \leq 0,05$ ), em relação à NS TCA 12 % na fase aquosa. Avaliando cada tratamento em função do tempo de maturação, verificou-se que para todos eles o modelo que melhor ajustou foi o de 1º grau (Figura 13).



**Figura 13** – Acompanhamento do teor de NS TCA 12 % da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante.

Modelos: MA:  $y = 0,99687 + 0,10600 \text{ tempo}$ ;  $R^2 = 0,99$

PA:  $y = 1,04036 + 0,10991 \text{ tempo}$ ;  $R^2 = 0,97$

M:  $y = 0,87201 + 0,07887 \text{ tempo}$ ;  $R^2 = 0,97$

P:  $y = 0,82588 + 0,06626 \text{ tempo}$ ;  $R^2 = 0,99$

Observando os resultados de NS TCA 12 % e comparando-os com os resultados de proteína total da fase aquosa (Figura 11) verifica-se que no início da maturação o teor de NS TCA 12 % corresponde a aproximadamente 37 % do teor de proteína total da fase aquosa, e essa relação chega a aproximadamente 78 % no final da maturação, para os tratamentos MA e PA. Já para os tratamentos M e P o teor de NS TCA 12 % corresponde a aproximadamente 31 % do teor de proteína total da fase aquosa, e essa relação chega a aproximadamente 48 % no final da maturação.

Analisando os resultados de P, NS pH 4,6 e NS TCA 12 %, conclui-se que a maior parte da proteólise leva a formação de NS TCA 12 %, para os tratamentos MA e PA, já para os tratamentos M e P a proteólise é conduzida de forma a obter tanto NS pH 4,6 quanto NS TCA 12 %. Tal fato é explicado pela presença da cultura aromática nos tratamentos MA e PA contribuindo, portanto, para a formação de peptídeos e aminoácidos em maior quantidade quando comparado aos tratamentos M e P, no qual utilizou-se apenas cultura starter acidificante.

Salvat-Brunaud et al., (1995) ao avaliar a fase aquosa de queijo Emmental em quatro estágios de maturação (A: saída da salmoura, B: entrada na câmara quente, C: saída da câmara quente e D: entrando para a comercialização), observou que os

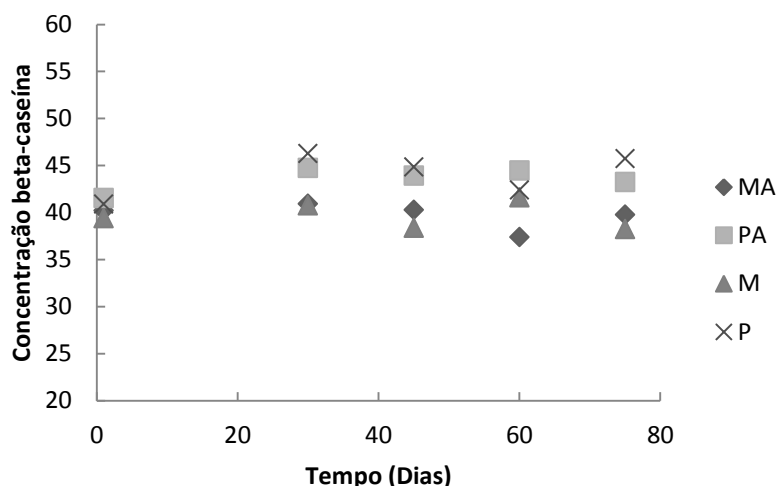
compostos nitrogenados das fases A e B consistiam quase 100 % em NS pH 4,6 e quase 50 % em NS TCA 12 %. Os autores observaram que a relação NS TCA 12 % / P aumentou de 51 % no primeiro estágio de maturação para 74 % no quarto estágio de maturação, concluindo, portanto, que a maior parte da proteólise do queijo Emmental analisado leva a formação de compostos solúveis em TCA 12 %. Ao analisar o teor de aminoácidos foi observado que parte do produto da proteólise são aminoácidos livres, variando de 26 % no primeiro estágio para 56 % no quarto estágio.

Em muitas variedades de queijo, a hidrólise inicial de caseínas é causada pelo coagulante e em menor grau pela plasmina resultando na formação de peptídeos de alta massa molar (insolúveis em água) e de média massa molar (solúveis em água), que são subsequentemente degradados por enzimas do coalho e enzimas de bactérias lácticas starter e secundárias.

A proteinase extracelular associada ao envelope celular de *Lactococcus* contribui para a formação de pequenos peptídeos em queijo, provavelmente pela hidrólise dos peptídeos de maior massa molar produzidos pela ação da enzima do coalho na  $\alpha_{s1}$ -caseína e da plasmina na  $\beta$ -caseína, enquanto que as peptidases intracelulares são liberadas após a lise das células microbianas e são responsáveis pela degradação dos peptídeos de menor massa molar e produção de aminoácidos livres (McSweeney et al. 2001).

#### **5.5.7. Determinação do perfil proteico das frações $\alpha$ , $\beta$ -caseína dos queijos**

A concentração de beta-caseína dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação pode ser observada na Figura 14. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstraram que houve influência significativa de cada tratamento ( $p \leq 0,05$ ). Já em relação ao tempo de maturação e a interação tempo de maturação e tratamento não houve influência significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 14** – Acompanhamento da concentração de beta-caseína dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante

Observa-se que os tratamentos P e PA apresentaram maior concentração de  $\beta$ -caseína em relação aos tratamentos M e MA. Tal fato pode ser atribuído à maior retenção da  $\beta$ -caseína na micela de caseína devido à pasteurização do leite. A refrigeração e pasteurização do leite provoca alteração na composição bioquímica das micelas de caseína. Em temperaturas baixas (inferiores a 10 °C), observa-se significativa solubilização da  $\beta$ -caseína (Dalgleish e Law, 1988), sendo esse, um processo reversível. Durante o tratamento térmico há um retorno da  $\beta$ -caseína para a micela, o que explica um aumento no teor dessa fração nos tratamentos feito com leite pasteurizado.

A hidrólise da  $\beta$ -caseína está diretamente relacionada com a atuação da plasmina e pouco relacionada com as enzimas da cultura láctica e do coalho (O'Mahony et al., 2005), o que explica a não degradação dessa ao longo do período de maturação do queijo Minas padrão.

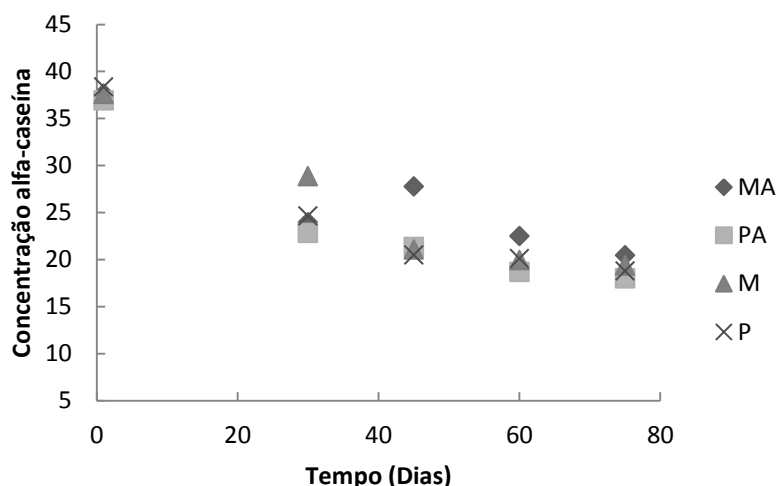
O'Mahony et al. (2005), ao estudarem a evolução da proteólise em queijo Cheddar produzido com diferentes concentrações de inibidores de quimosina, ao longo de 180 dias de maturação, observaram que a concentração de  $\beta$ -caseína não foi alterada pela adição do inibidor da quimosina, indicando que a hidrólise da  $\beta$ -caseína não está relacionada com a enzima quimosina. Ao avaliar os produtos de degradação da  $\beta$ -caseína, foram identificados como principais produtos  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  e  $\gamma_3$ -caseína, que são os

peptídeos liberados da  $\beta$ -caseína pela plasmina. Também foi observado neste trabalho que após 75 dias de maturação 85 % da  $\beta$ -caseína encontrava-se intacta.

Beuvier et al., (1997) ao avaliar o uso de leite cru, microfiltrado ( membrana 1,4  $\mu\text{m}$ , unidade Alfa-Laval), padronizado com creme pasteurizado (72 °C, 30 segundos), leite pasteurizado (72 °C, 30 segundos) ou pasteurizado misturado ao retentado de microfiltração, na fabricação de queijos tipo Suiço, com o objetivo de estudar a influência das bactérias nativas do leite e da pasteurização na qualidade desse queijo observaram que no final da maturação, o queijo com leite cru continha quantidades mais elevadas de  $\beta$ -caseína em relação ao demais queijos, enquanto que a  $\gamma$ -caseína foi encontrada em concentrações mais elevadas em queijos de leite aquecido, refletindo maior atividade da plasmina nesses queijos. A atividade da plasmina no queijo feito com leite microfiltrado foi igual ao do queijo feito com leite cru. Segundo McSeeney et al. (2001) a atividade da plasmina é maior em variedades de queijos que passaram pela etapa de “cozimento” devido nesta etapa, os inibidores de ativadores de plasminogénio serem inativados, resultando no aumento da conversão do plasminogénio precursor da plasmina que, por sua vez, tem maior ação sobre a  $\beta$ -caseína.

As proteases naturais do leite, como a plasmina atuam melhor no intervalo de pH entre 6,5 e 8,0 e participam ativamente no processo de maturação de queijos, sendo a  $\beta$ -caseína a proteína mais sensível a essas enzimas. São responsáveis pela textura do queijo, quebrando as ligações peptídicas e liberando aminoácidos (Pinheiro; Mosquim, 1991).

A concentração de alfa-caseína dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação pode ser observada na Figura 15. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstram que houve influência significativa do tempo de maturação ( $p \leq 0,05$ ). Já em relação ao tratamento e a interação tempo de maturação e tratamento não houve influência significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 15** – Acompanhamento da concentração de alfa-caseína dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante. Modelo:  $y = 37.49018 - 0,48990 \text{ tempo} + 0,00332 \text{ tempo}^2$ ;  $R^2 = 0,94$

Observa-se uma redução significativa na concentração de  $\alpha$ -caseína, principalmente nos primeiros 30 dias de maturação (Figura 15). A não diferença observada na concentração da  $\alpha$ -caseína entre os tratamentos deve-se ao uso da mesma tecnologia de processamento, usando o mesmo leite de partida e principalmente, a mesma enzima coagulante. Apesar de ter usado diferentes culturas lácticas, essas não tem significativa atuação na degradação da  $\alpha$ -caseína, a hidrólise desta, possui alta correlação com a atuação das enzimas do coalho (O'Mahony et al., 2005).

Segundo O'Mahony et al. (2005), em um trabalho com queijo Cheddar no qual utilizaram algumas doses de inibidores da quimosina após a coagulação, observou-se que a concentração de  $\alpha$ -caseína reduziu proporcionalmente à concentração do inibidor da quimosina, ou seja, no queijo controle no qual não foi usado o inibidor da quimosina, foi observado que ao final da maturação havia apenas 12 % de  $\alpha$ -caseína. Já no tratamento contendo maior concentração de inibidor de quimosina, foi observado que restaram no final dos 180 dias de maturação 91 % de  $\alpha$ -caseína intacta, sendo que os 9 % de hidrólise foi devido à atividade enzimática da cultura starter, NSLAB ou plasmina.

## 5.6. Evolução de cálcio no queijo e na fase aquosa ao longo do período de maturação

O teor de cálcio dos queijos Minas padrão pode ser observado na Tabela 4.

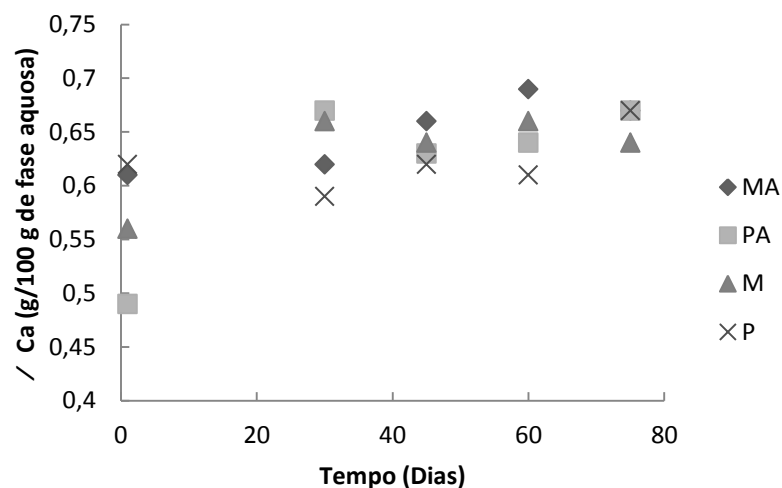
**Tabela 4** - Valores médios do teor de cálcio (g/100g) do queijo Minas padrão

	MA	PA	M	P
<b>g/100 g de Ca no queijo</b>	0,97 a	0,95 a	0,97 a	1,1 a

P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante.

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no teor de cálcio entre os tratamentos. Os valores encontrados para o teor de cálcio total estão maiores em relação ao que Paula (2010) encontrou no seu trabalho, 0,57 % de Ca, ao avaliar o tratamento controle com os adicionados de dióxido de carbono e água carbonatada em queijo Minas padrão. Isto está intimamente ligado aos valores de pH que no presente trabalho apresentou-se maior. Ocorre maior desmineralização do queijo quanto menor for o pH do mesmo, portanto maior quantidade de cálcio pode migrar para o soro do queijo durante o processo de fabricação (Furtado & Lourenço Neto, 1994).

Observa-se na Figura 16, o teor de Ca da fase aquosa extraída dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação. Os resultados obtidos pela análise de variância demonstraram que houve influência do tempo de maturação e da interação tempo de maturação e tratamento ( $p \leq 0,05$ ) na fase aquosa dos queijos em relação à % Ca. Ao realizar o desdobramento de cada tratamento em relação ao tempo de maturação, observou-se que para apenas o tratamento PA o tempo foi significativo e pelo estudo de regressão, a variável % Ca para o tratamento PA apresentou tendência linear de aumento ao longo do tempo, conforme o modelo e gráfico apresentados na Figura 18. Os tratamentos segundo análise de variância não foram significativos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 16** – Acompanhamento da % de Ca da fase aquosa extraída dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante. Modelo: PA:  $y = 0,49314 + 0,01402 t$ ;  $R^2 = 0,98$

Observa-se que para o tratamento PA (Figura 16) houve um aumento significativo no teor de cálcio da fase aquosa, principalmente nos primeiros 30 dias de maturação, onde, o teor de Ca aumentou de 0,49 % para 0,67 %.

O aumento significativo do teor de Ca na fase aquosa do tratamento PA pode ser atribuído à fermentação tardia da lactose pelas bactérias starter e, conseqüentemente, acidificação do meio, o que conduziu a solubilização do Ca associado à rede de caseína para a fase aquosa (Boutrou et al., 1999, Lucey et al. 2004). A redução do pH no tratamento PA nos 30 primeiros dias de maturação, mesmo não apresentando diferença significativa em relação aos demais tratamentos, foi a maior observada (5,22 para 5,04), isso pode explicar uma maior solubilização do cálcio no tratamento PA em relação aos demais tratamentos.

Observa-se que para os demais tratamentos, P, M e MA, a evolução do teor de cálcio na fase aquosa do queijo ao longo do tempo de maturação foi similar a evolução de pH da fase aquosa, ou seja, houve pouca modificação.

Quanto à porcentagem de cálcio presente na fase aquosa do queijo, observa-se que aproximadamente 66 % do cálcio presente no queijo encontram-se nesta fase. Trabalhos semelhantes ainda não foram relatados a literatura com o queijo Minas padrão, mas diversos outros queijos já foram estudados em relação a partição de cálcio.

Boutrou et al. (1999) avaliou o teor de cálcio na fase aquosa de queijo Camembert e observou aumento na concentração de Ca na fase aquosa nos 4 primeiros

dias de maturação, juntamente com a redução de pH, mas posteriormente o teor de Ca na fase aquosa diminuiu, isso foi seguido do aumento do pH na camada externa do queijo Camembert o que possivelmente levou a precipitação de vários sais de Ca, levando a redução de Ca solúvel no centro do queijo.

Morris et al (1988) estudou a fase aquosa de um queijo Cheddar com um mês de maturação e relatou que 43 % do cálcio estava presente na fase aquosa do queijo. Lucey e Fox (1993) relataram que aproximadamente 28 % de Ca estava presente na fase aquosa de queijo cheddar. Guinee et al. (2000<sup>a</sup>) analisaram uma série de amostras de queijo Cheddar comerciais e relataram que a proporção de cálcio solúvel variou de 26 a 44 %. Thierry et al. (1998) relataram que a proporção de cálcio solúvel no queijo Emmental, aproximadamente 30 %, praticamente não mudou durante o tempo de maturação. Guinee et al. (2000) analisaram queijos mussarela comerciais com idade e condições de produção distintos e relatou que a proporção de cálcio solúvel variou de 17 a 25 %. É possível que mudanças na proporção de cálcio solúvel durante a maturação seja devido à diferentes condições de fabricação e maturação (Lucey et al., 2004).

Tal elevação na proporção do cálcio encontrado na fase aquosa frente ao cálcio total pode ser explicada pela elevada acidez do queijo Minas padrão o que favorece a migração do cálcio retido na massa ligado as proteínas para a fase aquosa.

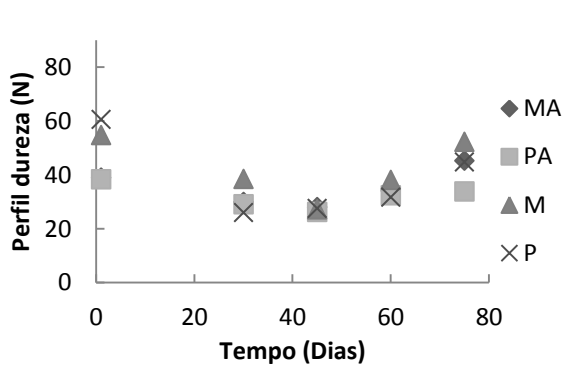
Lucey et al. (2004) ao estudar a evolução de Ca solúvel e insolúvel em fase aquosa e no queijo Cheddar, respectivamente, ao longo de 12 semanas de maturação, observaram que o conteúdo de cálcio insolúvel diminuiu de 69,72 % para 57,87 %, indicando que durante a maturação do queijo há conversão de Ca insolúvel para Ca solúvel. Os autores relatam um aumento de 24% para 42 % de cálcio solúvel durante o período de maturação do queijo Cheddar e um aumento de pH durante a maturação de 5,06 para 5,14 que foi justificado pela solubilização de fosfato de cálcio coloidal.

Segundo Lucey et al. (2004) alterações na quantidade de cálcio insolúvel ocorrem concomitantemente com vários eventos bioquímicos, como proteólise, e ambos provavelmente contribuem para mudanças de textura do queijo durante a maturação. O resultado líquido da redução do teor de cálcio insolúvel deve ser um enfraquecimento da estrutura do queijo, se todos os outros fatores mantêm-se inalterados (Lucey et al. 2004).

### **5.7. Perfil de Textura do queijo ao longo do período de maturação**

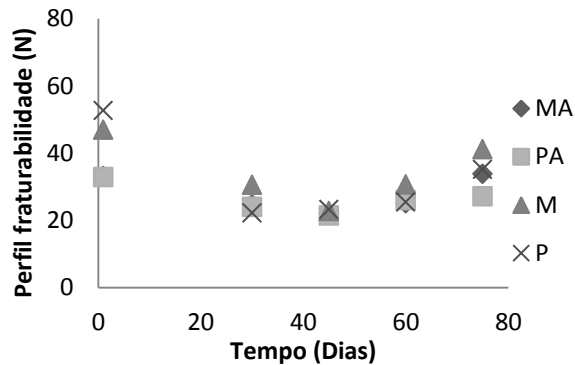
A análise de variância indicou diferença não significativa ( $p > 0,05$ ) para os tratamentos em relação a todas as variáveis estudadas: dureza, fraturabilidade, mastigabilidade, coesividade, gomosidade e elasticidade. Em relação ao tempo de maturação todas as variáveis apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). A interação entre tratamento e tempo de maturação, segundo a análise de variância, apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) para as variáveis dureza, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade, já para as variáveis coesividade e elasticidade, a interação tratamento e período de maturação foi não significativa ( $p > 0,05$ ).

Na Figura 17 é apresentado o perfil de dureza, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade dos queijos ao longo do tempo de maturação. Como tais parâmetros apresentaram o mesmo comportamento ao longo do período de maturação eles foram agrupados em uma mesma figura.



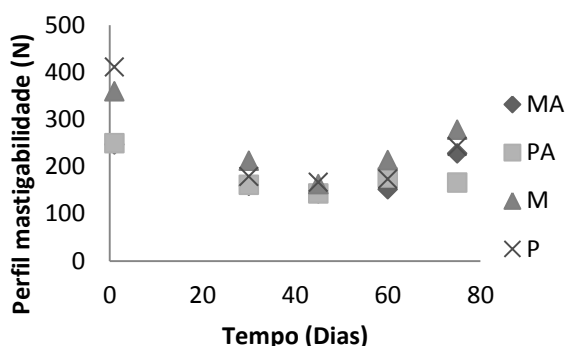
MA:  $y = 39,27303 - 0,66666 t + 0,00985 t^2$ ;  $R^2 = 0,97$   
 PA:  $y = 38,28770 - 0,49477 t + 0,00595 t^2$ ;  $R^2 = 0,88$   
 M:  $y = 55,85723 - 1,21642 t + 0,011539 t^2$ ;  $R^2 = 0,89$   
 P:  $y = 60,07021 - 1,62928 t + 0,01914 t^2$ ;  $R^2 = 0,99$

(a)



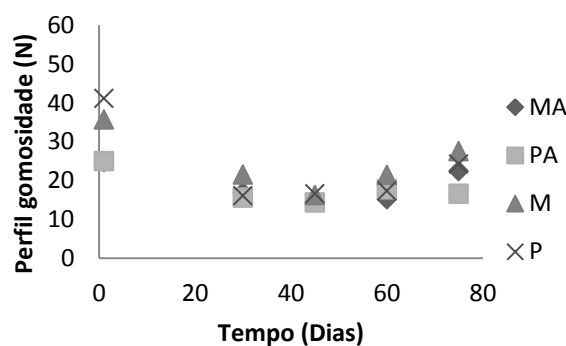
PA:  $y = 32,83657 - 0,45613 t + 0,00520 t^2$ ;  $R^2 = 0,92$   
 M:  $y = 47,61584 - 1,05653 t + 0,01285 t^2$ ;  $R^2 = 0,94$   
 P:  $y = 52,23993 - 1,39376 t + 0,01567 t^2$ ;  $R^2 = 0,98$

(b)



MA:  $y = 249,96513 - 5,34504 t + 0,06590 t^2$ ;  $R^2 = 0,96$   
 PA:  $y = 247,23731 - 3,85124 t + 0,03860 t^2$ ;  $R^2 = 0,90$   
 M:  $y = 361,68592 - 8,35311 t + 0,09640 t^2$ ;  $R^2 = 0,97$   
 P:  $y = 408,79113 - 10,75823 t + 0,11413 t^2$ ;  $R^2 = 0,99$

(c)



MA:  $y = 25,09504 - 0,50429 t + 0,00608 t^2$ ;  $R^2 = 0,93$   
 PA:  $y = 24,66175 - 0,39621 t + 0,00403 t^2$ ;  $R^2 = 0,89$   
 M:  $y = 35,07021 - 1,62928 t + 0,01914 t^2$ ;  $R^2 = 0,99$   
 P:  $y = 40,65180 - 1,11577 t + 0,01204 t^2$ ;  $R^2 = 0,98$

(d)

**Figura 17** – Acompanhamento do perfil dureza (a), fraturabilidade (b), mastigabilidade (c) e gomosidade (d) dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante.

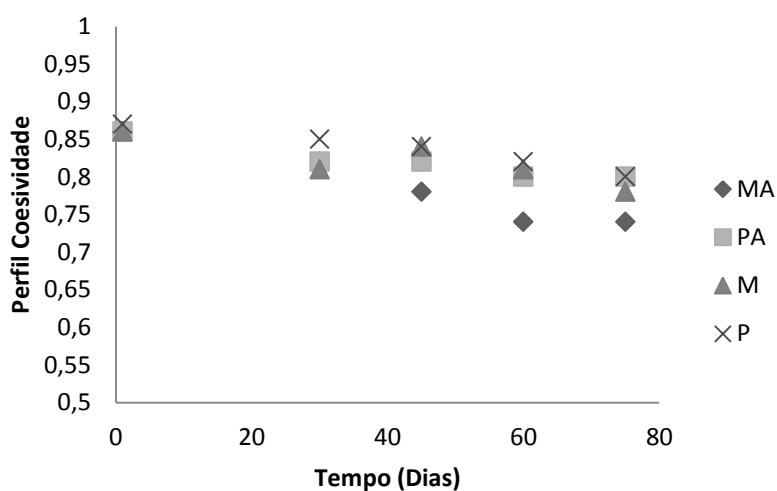
Ao realizar o desdobramento de cada tratamento em relação ao tempo de maturação, para cada parâmetro (dureza, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade), observou-se que para todos os tratamentos o tempo foi significativo. Foi ajustado, pelo estudo da regressão, diferentes modelos, que explicam, para cada tratamento, a variação do perfil de dureza, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade dos queijos ao longo do tempo de maturação (Figura 17).

A dureza é a força necessária para a deformação do alimento; a fraturabilidade é a tendência dos queijos romper; a gomosidade é a energia necessária para desintegrar

um alimento semi-sólido, ou seja, tornar um pedaço de queijo, para um estado pronto para engolir; já a mastigabilidade é o esforço necessário para que o alimento sólido esteja pronto para ser deglutido e resulta do produto entre gomosidade e elasticidade (Fox et al., 2002).

Observa-se que os quatro perfis de textura analisados até o momento, (dureza, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade) os quatro tratamentos tiveram comportamento similar ao longo do tempo de maturação. Para os tratamentos P e M foi necessário maior força para deformar, fraturar ou desintegrar as amostras. Esse resultado pode ser atribuído aos níveis de proteólise dos tratamentos. Os tratamentos P e M tiveram menor grau extensão e profundidade de maturação durante toda a maturação, refletindo no perfil de textura dos mesmos, principalmente no início da maturação. O grau de proteólise primária influencia as propriedades reológicas de queijos (Creamer e Olson, 1982; Fox et al, 2000; Watkinson et al, 2002; Guinee, 2003; O'Mahony et al, 2005).

Na Figura 18 é apresentado o perfil de coesividade ao longo do tempo de maturação dos queijos Minas padrão.



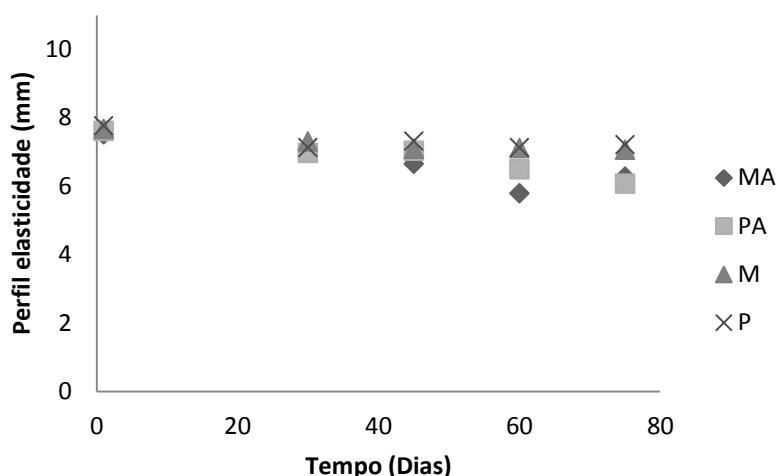
**Figura 18** – Acompanhamento do perfil de coesividade dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante

Os resultados obtidos pela análise de variância demonstraram que houve influência do tempo de maturação ( $p \leq 0,05$ ) dos queijos em relação ao perfil de coesividade. Pelo estudo da regressão, apesar da falta de ajuste ter sido não significativa

para os modelos linear e quadrático, os parâmetros da regressão foram não significativos e o  $R^2$  foi muito baixo indicando que os modelos testados não explicam a variação do perfil de coesividade em função do tempo (Figura 18).

O perfil de coesividade mostra o quanto o material pode ser distendido antes de romper irreversivelmente. É a força dos laços internos que compõem o corpo de produto (Fox et al., 2000). A redução na coesividade dos queijos ao longo da maturação está diretamente relacionado com a proteólise dos mesmos. O hidrólise da matriz protéica influencia nas características reológicas do queijo (Fox et al., 2000) e pode ter contribuído para a redução da coesividade dos mesmos.

Na Figura 19 é apresentado o perfil de elasticidade dos queijos Minas padrão ao longo do tempo de maturação.



**Figura 19** – Acompanhamento do perfil de elasticidade dos queijos ao longo da maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante

Os resultados obtidos pela análise de variância demonstraram que houve influência do tempo de maturação ( $p \leq 0,05$ ) dos queijos em relação ao perfil de elasticidade. Pelo estudo da regressão, apesar da falta de ajuste ter sido não significativa para os modelos linear e quadrático, os parâmetros da regressão foram não significativos e o  $R^2$  foi muito baixo indicando que os modelos testados não explicam a variação do perfil de elasticidade em função do tempo (Figura 19).

A elasticidade é a velocidade com que o material deformado volta à sua condição original, após ser retirada a força deformante. Observa-se que houve uma redução da elasticidade dos queijos ao longo do tempo de maturação. Resultados semelhantes foram encontrados por O'Mahony et al. (2005) para queijo Cheddar. O enfraquecimento da matriz protéica devido à proteólise influenciam nas características reológicas do queijo (Fox et al., 2000) e podem ter contribuído para a perda de elasticidade dos queijos Minas padrão.

Muitos são os fatores que influenciam as propriedades de textura de um alimento, dentre eles, composição e alterações bioquímicas durante a maturação que influencia no grau de hidratação e hidrólise da matriz proteica, que é o elemento estrutural importante que controla a deformação sobre a aplicação de uma tensão (Guinee et al. 2004).

As propriedades físicas do queijo (textura, derretimento e cor) são influenciadas pela composição inicial do leite, processo de fabricação e as condições de maturação. Dois dos fatores mais importantes que influenciam estas propriedades são a condição das micelas de caseína no queijo (por exemplo, interação entre as micelas de caseína e a quantidade de Ca associada com estas micelas) e a extensão de proteólise (Lucey et al., 2004).

Lucey e Fox (1993) propuseram que a concentração total de Ca em queijo não é o melhor indicador da textura do queijo. Eles sugeriram que é a quantidade de Ca ainda dentro da caseína do queijo, que é o Ca insolúvel que é o responsável por modular a textura do queijo. Logicamente esse deslocamento do equilíbrio mineral não é o único responsável pela mudança de textura, este também depende dos efeitos conhecidos de proteólise (Lucey et al., 2004).

No presente trabalho, a modificação do perfil de textura do queijo Minas padrão ao longo do tempo de maturação, foi correlacionado diretamente com a proteólise, uma vez que, não houve alteração na porcentagem de solubilização de cálcio ao longo do tempo de maturação e nem perda de umidade por evaporação.

## **5.8. Avaliação microbiológica do leite e do queijo Minas padrão**

### **5.8.1. Qualidade microbiológica das amostras de leite cru, tratadas termicamente e microfiltradas**

Os dados referentes à enumeração de mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos, coliformes, *E. coli* e psicrotóxicos, realizada no leite pasteurizado

destinado à fabricação de queijo Minas padrão com cultura acidificante ou aromatizante (LP ou LPA), leite microfiltrado destinado à fabricação de queijo Minas padrão com cultura acificante ou aromatizante (LM ou LMA) e leite cru integral (LCI) são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Resultados referentes aos parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de leite destinadas a fabricação do queijo Minas padrão, expressos em UFC·mL<sup>-1</sup>

Tratamentos	Variáveis Estudadas			
	Contagem de mesófilos aeróbios e anaeróbios	Coliformes 30 °C	<i>E. coli</i>	Psicrotróficos
LP	$2,8 \times 10^3$	< 1,0	< 1,0	< 1,0
LPA	$1,6 \times 10^3$	< 1,0	< 1,0	< 1,0
LM	$3,6 \times 10^1$	< 1,0	< 1,0	< 1,0
LMA	$7,0 \times 10^1$	< 1,0	< 1,0	< 1,0
LCI	$3,3 \times 10^5$	$9,0 \times 10^2$	$4,7 \times 10^1$	$7,3 \times 10^3$

LP = Leite pasteurizado destinado à fabricação de queijo Minas padrão com cultura acidificante; LPA = Leite pasteurizado destinado a fabricação de queijo Minas padrão com cultura aromatizante; LM = Leite microfiltrado destinado a fabricação de queijo Minas padrão com cultura acidificante; LMA = Leite microfiltrado destinado a fabricação de queijo Minas padrão com cultura aromatizante; LCI = Leite cru integral

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o mesmo deve ter uma contagem máxima de mesófilos aeróbios de  $3,0 \times 10^5$  UFC·mL na região sudeste do país, valor vigente a partir de primeiro de julho de 2014, desativando o valor anterior de  $6,0 \times 10^5$  UFC·mL. A contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios para leite cru integral, encontrada neste trabalho, (Tabela 5) foi de  $3,3 \times 10^5$  UFC·mL superior ao valor aceitável pela legislação atual, refletindo falhas de higiene na obtenção e manipulação no transporte e a necessidade de ferramentas de qualidade para controlar a contaminação existente, responsável pela baixa qualidade microbiológica atual.

Apesar da alta contagem inicial de mesófilos aeróbios, tanto os tratamentos térmicos como a microfiltração usando membrana de 1,4 µm de tamanho médio do poro, reduziram o número desses micro-organismos. Porém, a tecnologia de microfiltração mostrou-se mais eficiente reduzindo 3,82 ciclos logarítmicos, enquanto a pasteurização reduziu 2,19 ciclos logarítmicos em relação a contagem inicial. É necessário observar que os leites microfiltrados e pasteurizados foram coletados dentro do tanque de fabricação de queijo já padronizados, logo a manipulação desse leite,

como transporte do leite microfiltrado em latões para o tanque de fabricação, pode ter contribuído para aumentar a contagem microbiana.

Uma redução logarítmica de 6,5 e 5,4 de mesófilos aeróbicos e coliformes totais, respectivamente, foi obtida em leite microfiltrado em membrana cerâmica com tamanho médio de poro de 1,4  $\mu\text{m}$  (Dias, 2011). Awad et al. (2010) observou que a contagem bacteriana foi reduzida de 150.000 UFC/mL no leite desnatado para 250 UFC/mL e 1 UFC/mL no leite pasteurizado e microfiltrado, respectivamente, utilizando também membrana cerâmica com tamanho médio de poro de 1,4  $\mu\text{m}$ .

Segundo Carvalho e Maubois (2010), a microfiltração de leite utilizando membrana de 0,8  $\mu\text{m}$  e 1,4  $\mu\text{m}$  pode ser usada para remoção de micro-organismo do leite, sendo uma alternativa interessante ao tratamento térmico, que embora garanta também a segurança dos produtos lácteos, pode promover alterações irreversíveis em alguns componentes dos produtos (proteínas e lactose) e afetar a qualidade sensorial.

### 5.8.2. Qualidade Microbiológica dos Queijos

Os dados referentes à enumeração de mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos, coliformes, *E. coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, e *Staphylococcus aureus* realizada nos queijos queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado (P ou PA) e queijo Minas padrão produzido com microfiltrado (M ou MA) são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** - Resultados referentes aos parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de queijo Minas padrão, expressos em  $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$

Tratamentos	Variáveis Estudadas					
	Contagem de mesófilos aeróbios e anaeróbios	Coliformes 30 °C	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
P	$2,9 \times 10^9$	$3,0 \times 10^3$	< 10	< 10	< 10	< 10
PA	$1,2 \times 10^9$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
M	$4,9 \times 10^9$	$7,2 \times 10^1$	< 10	< 10	< 10	< 10
MA	$2,9 \times 10^9$	$1,5 \times 10^3$	< 10	< 10	< 10	< 10

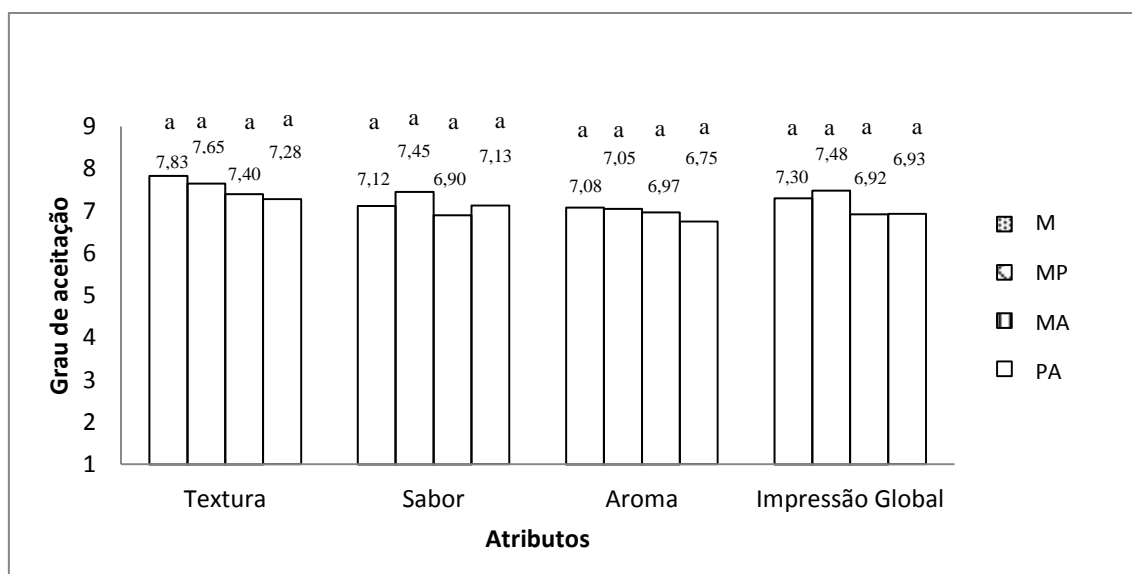
P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante.

Observa-se que a enumeração de mesófilos aeróbios não apresentou muita diferença entre os tratamentos.

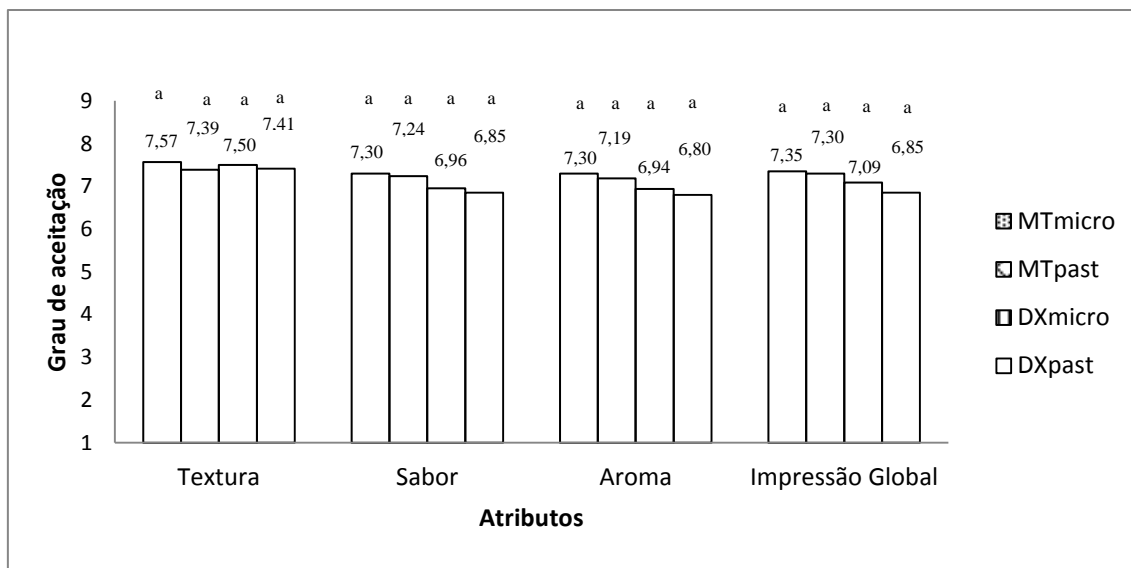
Em relação à enumeração de coliformes foi observado valores expressivos nos tratamentos P e MA, demonstrando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante a fabricação do queijo. Tal fato deve-se, principalmente, a fabricação do queijo ter sido em tanque aberto em uma sala com grande movimentação de pessoas. Os resultados para *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* encontram-se dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação Brasil, 1996).

### 5.9. Análise Sensorial

Os queijos Minas padrão foram avaliados sensorialmente utilizando o teste de aceitação após 30 e 60 dias de maturação. Nas Figuras 20 e 21 são apresentados os resultados, da análise sensorial feita nos queijos com 30 e 60 dias de maturação, respectivamente.



**Figura 20** – Teste sensorial de aceitação dos queijos Minas padrão com 30 dias de maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante. Letras iguais indicam médias semelhantes a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey



**Figura 21**– Teste sensorial de aceitação dos queijos Minas padrão com 60 dias de maturação. P = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura acidificante; PA = Queijo Minas padrão produzido com leite pasteurizado e cultura aromatizante; M = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura acidificante; MA = Queijo Minas padrão produzido com leite microfiltrado e cultura aromatizante. Letras iguais indicam médias semelhantes a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para nenhuma dos atributos avaliados, nos testes conduzidos com os queijos após 30 e 60 dias de maturação.

Observa-se que os resultados para o atributo textura ficou entre gostei moderadamente e gostei muito, sendo muito similar para ambos os tempos de maturação. Da mesma forma, os atributos sabor, aroma e impressão global tiveram nota média similar entre tratamentos e tempos de maturação ficando entre gostei ligeiramente e gostei moderadamente.

Dias (2011) ao avaliar a aceitação sensorial de queijos com olhaduras produzidos com leite microfiltrado e diferentes mix de cultura com 60 dias de maturação, não observou diferença significativa no atributo impressão global, em relação ao atributo sabor o queijo produzido com leite microfiltrado sem adição de cultura NSLAB obteve menor nota, que foi atribuída à falta de NSLAB.

A formação do flavour (sabor e aroma) ocorre essencialmente durante a maturação do queijo. É um processo complexo, onde os vários compostos envolvidos na formação do aroma dos queijos são derivados de três principais vias metabólicas: catabolismo da lactose, catabolismo de lipídeos e catabolismo de proteínas (Yvon e Rijnen, 2001). Os ativadores dessas vias são as enzimas endógenas do leite, as enzimas

coagulantes e principalmente as enzimas do fermento láctico e de outros microorganismos envolvidos na maturação dos queijos (Marchisio et al., 1999).

O sabor e aroma de um queijo maturado é o resultado de um equilíbrio sutil e frágil entre todos os numerosos compostos que eles contêm (Marchisio et al., 1999). Na verdade, o fermento láctico, o método de fabricação do queijo e a flora secundária irão determinar a variedade de um queijo (McSweeney et al., 1997a). Os compostos não-voláteis do flavour como o ácido láctico, NaCl, aminoácidos, peptídeos e ácidos graxos de cadeia longa são os responsáveis pelo sabor do queijo. Já os compostos voláteis que promovem a composição do aroma em queijos, incluem os compostos sulfúricos [  $H_2S$ ,  $CS_2$ ,  $COS$ ,  $CH_3SH$ ,  $H_2C-S-CH_3$  (dimetil sulfido),  $H_2C-S-S-CH_3$  (dimetil disulfido, DMDS)], os ácidos graxos e seus produtos de degradação (lactonas, metil cetonas e álcoois) (Mc Seewney & Fox, 1997b).

## 6. CONCLUSÃO

A tecnologia de microfiltração mostrou-se como uma alternativa, no qual se evita o tratamento térmico sem, contudo, alterar as propriedades iniciais e de rendimento do queijo Minas padrão. Ao longo da maturação, o uso da tecnologia de microfiltração não foi responsável pelas diferenças observadas nos parâmetros de  $A_w$ , pH, extrato seco, índice de extensão e profundidade de maturação, teor de cálcio, perfil de textura e aceitação sensorial, avaliados ao longo da maturação do queijo, indicando, a viabilidade dessa tecnologia.

A tecnologia de microfiltração também mostrou-se eficiente na redução da contagem microbiológica do leite, reduzindo a níveis satisfatórios a contagem de deterioradores e patógenos. Isso viabiliza o uso da tecnologia, como uma melhor alternativa a pasteurização, uma vez que essa reduz a níveis aceitáveis a contagem microbiológica, mas não elimina, principalmente, esporos de bactérias e termodúricos, que podem ao longo da maturação do queijo causar problemas de estufamento tardio e redução da vida de prateleira.

O uso de diferentes bactérias lácticas na produção do queijo propicia o melhor desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais dos mesmos. No presente trabalho, foi observada maior proteólise nos queijos Minas padrão adicionados de cultura aromática, o que no início da maturação, levou a uma menor dureza, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade dos queijos. Isso pode ser melhor avaliado e inserido em um mercado que deseja comercializar os queijos com menor tempo de maturação, o que reflete positivamente no aumento da produtividade da fábrica.

A não diferença observada nas características sensoriais dos queijos Minas padrão adicionado de cultura aromática em relação ao não adicionado, pode ser melhor trabalhado com o aumento na quantidade e proporção das culturas adicionadas, visando melhorar as características sensoriais dos queijos Minas padrão.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. Consumo de queijos em diversos países. Informação pessoal: [abiq@abiq.com.br](mailto:abiq@abiq.com.br). 05/09/2011

ADDA, J. Formation de la flaveur. In: **Le Fromage** (Eck A, Ed). Lavoisier Paris, 1987, p. 330-340.

ANTUNES, L. SAITO, M. M. A evolução das enzimas coagulantes. **Food Ingredients Brazil**, n. 16, p. 38-39, 2011.

AOAC – OFFICIAL METHODS OF AOAC INTERNATIONAL. **Rapid Enumeration of Staphylococcus aureus in Selected Foods**. 2001.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology in: **Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects**. Third Edition, Revised and Expanded. 2004. p. 633

BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 163p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Porto Alegre, RS, 2008.

BARTHEL, C.; SANDERG, E.; HAGLUND, E. Une nouvelle method pour l'étude du procédé de la maturation des fromages. **Lait** p. 285-288 . 1928a.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheeses microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, p. 259-274, 2001.

BARTHEL, C.; SANDERG, E.; HAGLUND, E. Recherches sur la pressure dans les fromages. **Lait** p. 762-768. 1928b.

BERESFORD, T. P.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. **Cheese Chemistry, Physics & Microbiology**. V. 1, 3<sup>o</sup> ed, Ed. Elsevier, p. 287-318, 2004.

BOUTON, Y.; GRAPPIN, R. Comparaison de la qualité de fromages à pâte pressée cuite fabriqués à partir de lait cru ou microfiltré. **Le Lait**, v.75, p. 31-44, 1995.

BEUVIER, E.; BERTHAUD, K.; CEGARRA, S.; DASEN, A.; POCHET, S.; BUCHIN, S.; DUBOZ, G. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. **International Dairy Journal**, v.7, p. 311-323, 1997.

BRASIL. **Diário Oficial da União** – D.O.U. Portaria nº146, de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Brasília, 3977 – 3986, 11 de março de 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto nº 2.244 de 4 de junho de 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 04 de junho de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de setembro de 2003.

BRANS, G.; SCHROËN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v.243, n. 2, p.263-272, 2004.

BRUMANO, L. P.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; COSTA, R. G. B.; SOBRAL, D. **Avaliação de aspectos físico-químicos do queijo Minas padrão comercializado nos últimos 12 anos e suas variações**. Seminário de Iniciação Científica e Tecnologia. EPAMIG. Belo Horizonte, 2011.

CARVALHO, A. F.; MAUBOIS, J. L. Applications of membrane Technologies in the dairy industry. In: COIMBRA, J. S. R.; TEIXEIRA, J. A. (Eds.) **Engineering aspects of milk and dairy products**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 256p.

CASALTA, E.; MONTEL, M. C.; Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactococcus Genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 271-273, 2008.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, L.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOPOULOS, G.; LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E. Characterisation of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, 64, p. 409-421. 1997

DALGLEISH, D. G., LAW, A. J. R. pH-Induced dissociation of bovine casein micelles. Analysis of liberated caseins. **Journal of Dairy Research**, 55, p. 529-538. 1988

DIAS, G. **Microfiltração como alternative na produção de queijos com olhaduras e utilização da fase aquosa para avaliação de suas características físico-químicas**. 2011. 101p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; RANTISIOU, K.; BERTOLINO, M.; COCOLIN, L. Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 71-75, 2010.

FAUQUANT, J.; MAUBOIS, J. L.; PIERRE, A. Microfiltration du lait sur membrane minérale. **La Technique Laitière**, v. 1028, p. 21-23, 1988.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e Práticas**. Tradução Florência Cladera Oliveira – 2. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 602.

FOX, P. F.; WALLACE, J. M. Formation of flavor compounds in cheese. **Advances in Food Microbiology**, 45. p. 17-85. 1997

FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. V. 1, General aspects. London U. K. 1993. Chapman & Hall, 2. Ed. 601 p. 1993

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Aspem Publishers, Inc. Gatherburg, Maryland, 544p. 2000.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de M. **Tecnologia de Queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos**. 1º ed. Ed. Dipemar, São Paulo, p. 118. 1994.

FURTADO, M. M.; MOSQUIM, M.C.A.V.; FERNANDES, A.R.; SISVA, C.A.B; **Produção de queijo Minas curado e meia cura**. Projetos de Empreendedorismo Agroindustriais. Produtos de Origem Animal. Ed. UFV. Viçosa. 2003

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. 2º ed. Ed. Globo, São Paulo, 1990. 295p.

FURTADO, M. M.; **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. Edição Revisada e Ampliada. Comunicação e Editora, São Paulo. p. 200. 2005.

GAUCHERON, F.; GRAET, Y.; MICHEL, F.; BRIARD, V.; PIOT, M. Evolution of various salt concentrations in the moisture and in the outer layer and centre of a model cheese during its brining and storage in an ammoniacal atmosphere. **Lait**. V. 79, p. 553-566. 1999.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 732-738. 1997.

GOULAS, A.; GRANDISON, A. S. Applications of membrane separation. In: BRITZ, T. J.; ROBINSON, R. K. **Advanced dairy science and technology**. 1. Ed. Blackwell Publishing, 2008. 300p.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Série Escola Piloto em Engenharia Química, COPPE/UFRJ. Rio de Janeiro: e-papers, 2006. 180p.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS. BERGEY'S. **Manual of determinative bacteriology**. S. T. 3° ed., Wilians & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. International Edition. 1994.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk: determination of nitrogen content**. Brussels p. 11. 2001 (20-1:2001).

LANARA (Laboratório Nacional de Referência Animal) **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília, 2, 1981.

LIRA, H. L.; SILVA, M. C. D.; VASCONCELOS, M. R. S.; LIRA, H. L.; LOPEZ, A. M. Q. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 33-37, 2009.

LONDONÕ, M. M. D. **Determinação das características de fabricação, padrões físico-químicos, sensoriais e de comercialização do queijo Minas Meia-Cura e comparação com os queijos Minas Padrão e Prato**. Dissertação de Mestrado, Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras. Lavras. MG. 109p. 1998

LUCEY J. A.; FOX, P. F. Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review. **Journal of Dairy Science**. n. 76, p. 1744-1724, 1993.

LUCEY, J. A; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. **Journal of Dairy Science**. n. 86, p. 2725-2743, 2004.

MAUBOIS, J. L. New applications of membrane technology in the dairy industry. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 46, n. 2, p.91-95, 1991.

MAUBOIS, J. L.; CAUDRON, B.; DAVIAU, C.; MADEC, M. N.; PIERRE, A. Membrane technologies: tools for a total control of the cheesemaking process. In: SYMPOSIUM OF CHEESE RIPENING AND TECHNOLOGY, Banff, 2000. **Proceedings**. Banff: International Dairy Federation, 2000. P. 12-16.

MAYO, B. Dairy Lactococci. **Encyclopedia of biotechnology in agriculture and food**, p. 191-194, 2010.

McSWEENEY, P.L.H.; FOX, P. F.; LUCEY, J. A.; JORDAN, K. N.; COGAN, T. M. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v.3, p. 613-634, 1993.

MELO, A. C. M.; ALVES, L. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo Minas padrão comercializado na Cidade de São Luis, MA. **Arq. Inst. Biol.**, v.76, n.4, p.547-551, São Paulo, 2009.

MEERSHON, M. Nitrate free cheese making with Bactocatch. **North European and Food Dairy Journal**, n. 55, p. 108-113, 1989

MINÍN, V. P. R. **Análise sensorial: Estudo com consumidores**. 1 ed. Viçosa, Editora UFV, p. 68. 2006.

MISTRY, V. V.; MAUBOIS, J. L. **Application of membrane separation technology to cheese production in Cheese: chemistry physics and microbiology**. Ed: Pf Fox, PLH, 2004.

MORRIS, M. A.; HOLT, C.; BROOKER, B. E.; BANKS, J. M.; MANSON, W. Inorganic constituents of cheese: analysis of juice from a one-month-old cheddar cheese and the use of light and electron microscopy to characterize the crystalline phases. **Journal Dairy Research** 55, 1988, p. 255-268.

NEOCLEOUS, M.; BARBANO, D. M.; RUDAN, M. A.; Impacto low concentration factor microfiltration on Milk component recovery and Cheddar cheese yield, **Journal Dairy Science**. 85 (2002) 2415-2424.

O'MAHONY, J. A.; LUCEY, J. A.; McSWEENEY, P. L. H. Chymosin-Mediated Proteolysis, Calcium Solubilization, and Texture Development During the Ripening of Cheddar Cheese, **Journal Dairy Science**. 88 (2005) 3101-3114.

PAULA, J. C. J. **Efeito do uso de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na fabricação de queijos Minas frescal e Minas padrão**. (Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2010. p.120.

PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; SILVA, P. H. F. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 2. Ed. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora, p. 190. 2001.

PETRUS, J. C. C. **Preparação, Modificação e Caracterização de Membranas Assimétricas para Clarificação de Suco de Frutas**. 1997. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 1997.

PIERRE, A.; GOUDÉDRANCHE, H.; GAREN, A.; DAUFIN, G. Les separations sur membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire. In: DAUFIN, G.; RENÉ, F., AIMAR, P. (Coord.) **Industrie Laitière**. Paris: Technique et Documentation Lavoisier, 1998. p. 282-371

POULIOT, Y. **Membrane processes in dairy technology – From a simple idea to worldwide panacea**. V. 18. p. 735-740. 2008.

ROBINSON, Richard K. **Dairy Microbiology Handbook: A microbiology of milk and milk products**. Terceira edição. 2002. p. 737.

RODRÍGUEZ, L.; REQUENA, T.; FONTECHA, J.; GOUDÉDRANCHE, H.; JUÁREZ, M. Effect of different membrane separation technologies (ultrafiltration and

microfiltration) on the texture and microstructure of semihard low-fat cheeses. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, n. 47, p. 558-565, 1999.

ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 12-19, 1995.

SABOYA, L.V.; MAILLARD, M. B.; LORTAL, S. **Efficient and easy mechanical disruption of *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* and *Propionibacterium freudenreichii* by a new pilot high-pressure homogenizer**. 2002.

SABOYA, L. V. MAUBOIS, J. L. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. **Lait**, v. 80, p. 541-553, 2000.

SANDBERG, E.; HAGLUND, E.; BARTHEL, C. L'analyse du jus de fromage comme moyen de déterminer le degré de la maturation. **Lait** 10, p. 1-21. 1930.

SALVAT-BRUNAUD, D.; MAUBOIS, J. L.; LE GRAËT, Y.; PIOT, M.; MAILLARD, M. B.; CORRE, C.; THIERRY, A. Extration et analyse de la phase aqueuse de l'emmental à 4 stades d'affinage. **Lait** 75, p. 239-249, 1995.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, M.; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 1-22, 2009.

TEUBER, M., GEIS, A. **The genus *Lactococcus***. Prokaryotes, v. 4, p. 205-228, 2006.

THIERRY, A.; DELPHINE SALVAT-BRUNAUD, MARIE NOELLE, MADEC, MICHEL FRANÇOISE, MAUBOIS, J. L. Affinage de l'emmental: dynamique des populations bactériennes et évolution de la composition de la phase aqueuse. **Lait**. V. 78, p. 521-542. 1998.

THIERRY, A.; MAILLARD, M. B.; LE QUERÉ. Dynamic headspace analysis of Emmental aqueous phase as a method to quantify changes in volatile flavor compounds during ripening. **International Dairy Journal**. V. 9, p. 453-463. 1999.

UPADHYAY, V. K.; McSWEENEY, P. L. H.; MAGBOUL, A. A. A.; FOX, P. F. **Cheese Chemistry, Physics and Microbiology**. V. 1. 3° ed. Ed Elsevier Academic Press. p. 391-434

VEDAMUTHU, E. R. In: Dairy Microbiology Handbook: A microbiology of milk and milk products. **Journal Dairy Science**, 77, p. 2725-2735. 1994.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. Standard methods for the examination of dairy products. In: **American Public Health Association**. 17th ed. Washington. 2004.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; LIMA, A. Extensão e profundidade da proteólise de queijo Minas frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 44, n. 261/266, p. 50-54, 1989.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Revista Boletim do leite**. Rio de Janeiro, v.51, n°661, p. 1-8, 1993

WRIGHTM, A. V. **Genus Lactococcus. Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional aspects**. Fourth edition, Taylor & Francis, 2012.