

ROSANE ELVIRA FERRAZZA NARDES

**CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO ZAMORANO DOP SOB
CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO ACELERADA POR
MODIFICAÇÕES NA TEMPERATURA**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N223c
2002

Nardes, Rosane Elvira Ferrazza, 1958-
Caracterização do queijo Zamorano DOP sob condições
de maturação acelerada por modificações na temperatura /
Rosane Elvira Ferrazza Nardes. – Viçosa : UFV, 2002.
230p. : il.

Orientador: Mauro Mansur Furtado
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa

1. Queijo Zamorano - Aceleração de maturação - Efeito
da temperatura. 2. Queijo Zamorano - Microbiologia. 3.
Queijo Zamorano - Proteólise - Avaliação. 4. Queijo Za-
morano - Reologia. 5. Queijo Zamorano - Avaliação senso-
rial. 6. Queijo de ovelha. I. Universidade Federal de Viçosa
II. Título.

CDD 19.ed. 637.354

CDD 20.ed. 637.354

ROSANE ELVIRA FERRAZZA NARDES

**CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO ZAMORANO DOP SOB
CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO ACELERADA POR
MODIFICAÇÕES NA TEMPERATURA**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de novembro de 2002.

Prof. José Ivo Ribeiro Júnior
(Conselheiro)

Prof^a. Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira
(Conselheira)

Prof. José María Fresno Baro

Prof^a. María Eugenia Tornadijo

Prof. Mauro Mansur Furtado
(Orientador)

Aos meus queridos filhos, sem os quais esta não seria possível:
Francine Ferrazza Nardes e Fernando Ferrazza Nardes.

Ao meu companheiro dos momentos fáceis e difíceis:
Pedro Jorge Morais Menezes.

À minha adorável mãe:
Briolanda de Souza Ferrazza.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela presença viva através de Vosso filho Jesus Cristo, que, pela essência e força infinita, sempre guiou meus passos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela inesgotável fonte de saber.

À Universidade Federal de Pelotas e aos meus companheiros de área do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça, pelo apoio e pela compreensão.

À Universidade de León-Espanha, pela acolhida e pelo apoio.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor José Maria Fresno Baro, por sua dedicação, pela atenção e por acreditar nos meus potenciais de profissional.

Ao professor Mauro Mansur Furtado, pelos ensinamentos, pela compreensão, pela amizade, pelo apoio e pela sólida base de conhecimentos transmitida.

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior, profissional competente, pela sua dedicação, pelo incentivo, pelo apoio e pela compreensão.

À professora Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira, pelo incentivo e apoio.

À professora Maria Eugênia Tornadijo, pelo acompanhamento ao longo do experimento, com dedicação e apoio.

À professora Josefa González Prieto e aos demais professores, funcionários e doutorandos do Departamento de Higiene e Tecnologia dos Alimentos da Universidade de León, Espanha, pela atenção.

Aos amigos Ricardo Arenas, Gerson Rezende, Sergio Ribeiro, Luciana Leal de Oliveira, Darlila Gallina e Cleuza Salomé, pela disponibilidade, pela atenção e pelo carinho a mim demonstrado.

BIOGRAFIA

ROSANE ELVIRA FERRAZZA NARDES, filha de Ilari Ferrazza e Briolanda de Souza Ferrazza, nasceu em Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, em 10 de janeiro de 1958.

Em dezembro de 1979, formou-se em Ciências Naturais pela Faculdade Integrada de Santo Ângelo, Rio Grande do Sul – FISA.

Graduou-se Farmacêutica-Bioquímica, em 1983 pela Universidade Católica de Pelotas, RS.

Graduou-se em Licenciatura Plena pela Universidade Federal de Pelotas, com habilitações em Microbiologia, Parasitologia e Bromatologia, em 1984.

Especialista em Saúde Pública, pela Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP, em 1985.

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela Universidade Federal de Pelotas, em 1990.

Professora E4 do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça, Universidade Federal de Pelotas, desde 1989.

Iniciou, em outubro de 1998, o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. O leite de ovelha.....	4
2.1.1. Composição.....	5
2.1.2. Caseínas.....	6
2.1.3. Gordura	7
2.2. Queijo de leite de ovelha.....	8
2.3. O queijo Zamorano DOP	11
2.4. Microbiota do queijo	13
2.5. A proteólise no queijo	24
2.5.1. As frações nitrogenadas no queijo	25
2.5.2. A degradação das caseínas	27
2.5.3. Aminoácidos no queijo	33
2.6. Maturação acelerada.....	35
2.6.1. Influência da temperatura na maturação acelerada	37
2.7. Características reológicas do queijo.....	39
2.7.1. Conceitos básicos.....	39
2.7.2. Parâmetros da textura.....	40
2.8. Análise sensorial	43
2.8.1. Importância da análise sensorial	43
2.8.2. Parâmetros sensoriais	44
2.8.3. Análise sensorial em queijos.....	46
2.8.4. Análise descritiva (ADQ).....	47
2.8.5. Tendências da análise estatística para análise sensorial	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
 CAPÍTULO 1	
EVOLUÇÃO DA FLORA MICROBIANA DO QUEIJO ZAMORANO DOP SOB CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO ACELERADA.....	
RESUMO	60
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1. Elaboração dos queijos.....	66
2.2. Preparo das amostras.....	66
2.3. Análises microbiológicas	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	71
4. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICE.....	81

CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS E INFLUÊNCIAS FÍSICO-QUÍMICAS, QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DO QUEIJO ZAMORANO DOP SOB MODIFICAÇÕES DE TEMPERATURA DURANTE A MATURAÇÃO

RESUMO	84
1. INTRODUÇÃO	86
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1. Elaboração dos queijos.....	89
2.2. Diagrama experimental	90
2.3. Parâmetros físico-químicos	91
2.3.1. Determinação de pH e acidez titulável	91
2.3.2. Determinação da atividade de água	91
2.4. Parâmetros químicos	91
2.4.1. Determinação da umidade.....	91
2.4.2. Determinação da proteína	91
2.4.3. Determinação de gordura.....	92
2.4.4. Determinação da lactose	92
2.4.5. Determinação de cloretos.....	92
2.5. Parâmetros indicadores de proteólise.....	92
2.5.1. Frações nitrogenadas.....	92
2.5.2. Determinação das caseínas.....	95
2.5.3. Determinação dos aminoácidos livres	95
2.6. Análise estatística.....	99
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	101
3.1. Aspectos físico-químicos e químicos do queijo Zamorano	101
3.1.1. Determinação de pH, acidez e atividade de água	101
3.1.2. Determinações de extrato seco (ES), proteínas, gordura, lactose e umidade (expressa em % de extrato seco total) e cloretos na umidade e no extrato seco total.....	105
3.1.3. Correlações entre os aspectos físico-químicos	113
3.2. Parâmetros proteolíticos.....	115
3.2.1. Evolução das frações nitrogenadas	115
3.3. Perfil eletroforético das caseínas.....	130
3.4. Perfil aminoacídico	146
3.4.1. Teor de aminoácidos no queijo Zamorano DOP.....	146
3.4.2. Análise de fatores para aminoácidos.....	151
4. CONCLUSÕES	159
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

CAPÍTULO 3

CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DO QUEIJO ZAMORANO DOP COM MODIFICAÇÕES NA TEMPERATURA DE MATURAÇÃO.....	167
RESUMO	167
1. INTRODUÇÃO	169
2. MATERIAL E MÉTODOS	172
2.1. Preparo das amostras.....	172
2.2. Equipamento para a determinação reológica	173
2.3. Determinação dos parâmetros reológicos	174
2.4. Análise estatística.....	176
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	178
3.1. Avaliação do perfil da textura	178
3.2. Mudanças reológicas dos parâmetros relacionados ao perfil da textura (TPA)	178
3.3. Correlações dos parâmetros reológicos.....	188
4. CONCLUSÕES	193
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	194

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO SENSORIAL DO QUEIJO ZAMORANO DOP SOB CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO ACELERADA POR DIFERENTES CONTROLES DE TEMPERATURA.....	196
RESUMO	196
1. INTRODUÇÃO	198
2. MATERIAL E MÉTODOS	202
2.1. Preparo das amostras.....	202
2.2. Análise sensorial	204
2.4. Análise estatística.....	205
2.4.1. Comparações com o padrão	205
2.4.2. Análise de fatores.....	205
2.4.3. Análise de variância	206
2.4.4. Análise discriminante.....	206
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	207
3.1. Comparações com o padrão	207
3.2. Análise de fatores.....	213
3.3. Análises de escores dos fatores	215
3.4. Análise discriminante.....	223
4. CONCLUSÕES	225
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	226
CONCLUSÕES	228

RESUMO

NARDES, Rosane Elvira Ferrazza, D.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2002. **Caracterização do queijo Zamorano DOP sob condições de maturação acelerada por modificações na temperatura.** Orientador: Mauro Mansur Furtado. Conselheiros: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, José Ivo Ribeiro Júnior e Sebastião César Cardoso Brandão.

O queijo Zamorano DOP (Denominação de Origem Protegida), inscrito desde 1993 no Conselho Regulador, é elaborado principalmente na província de Zamora (Espanha). É obtido a partir de leite pasteurizado de ovelhas das raças Churra e/ou Castellana e necessita de um prazo mínimo de maturação, a fim de que ocorram as modificações microbiológicas, químicas e bioquímicas necessárias para que a massa insípida e sem sabor definida no início se transforme em um produto com aroma, sabor e textura definidos. Por isso, o Conselho Regulador de Denominação de Origem estipula um prazo mínimo de 100 dias para sua comercialização. Esse processo é muito lento, tornando-se dispendioso para o produtor e aumentando o custo para o consumidor. Portanto, a aceleração da maturação por aumento de temperatura, nesse tipo de queijo, favorece a redução do tempo de maturação, diminui os custos de energia e proporciona aumento de produção de queijos, principalmente onde a estocagem é um fator limitante. Através deste processo, é possível obter queijos com qualidades similares às daqueles elaborados mediante o sistema tradicional. Para alcançar esses objetivos, seguiu-se um protocolo com diferentes controles de temperatura durante 180 dias de maturação. Os queijos elaborados foram submetidos a cinco controles de temperatura de maturação: A, B, C, D e E, respectivamente a 10 °C até 180 dias; 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 120 dias; 10 °C de 120 até 180 dias; 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e 15 °C até 180 dias. Os queijos foram analisados quanto à contagem total de mesófilos, lactococos, lactobacilos, micrococos, enterococos, enterobactérias, mofos e leveduras. A contagem total de lactobacilos apresentou valores maiores ao longo da maturação, acompanhada de decréscimo da flora de lactococos. Os primeiros apresentaram metabolismo mais lento e atividade

proteolítica mais intensa. A caracterização microbiológica é indispensável para o controle de qualidade do queijo, por isso outras análises foram necessárias para verificar a presença da flora contaminante. O queijo foi caracterizado quanto aos aspectos físico-químicos, químicos e bioquímicos, no sentido de monitorar a proteólise. Verificou-se, através do índice de proteólise, extensão (NS/NT) e profundidade (NNP/NS), aumento significativo durante a maturação, favorecendo os queijos que estavam sob controles de temperatura mais elevadas (15 °C). O mesmo ocorreu em nível das frações caseínicas, por meio de uma degradação mais acentuada das α_s -caseínas, favorecidas pela atuação das enzimas do coalho e microbianas. A β -caseína sofreu menor degradação ao longo da maturação, provavelmente devido à ação da plasmina, promovendo o aparecimento de três frações de γ -caseínas. No perfil aminoacídico, percentagens maiores foram observadas para ácido glutâmico, leucina e prolina, o que favoreceu o *flavor* característico do queijo Zamorano DOP. Foram observadas as características reológicas de dureza, fraturabilidade, elasticidade, adesividade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade do queijo, através de um texturômetro universal *Texture Analyser TA-XT2*, sendo as cinco primeiras obtidas pelos gráficos produzidos pela Análise do Perfil da Textura (TPA) e as duas últimas calculadas a partir das cinco primeiras. A dureza, a elasticidade e a fraturabilidade não sofreram modificações com relação aos diferentes controles, mas apresentaram modificações significativas ao longo da maturação, como consequência do processo de proteólise. A análise sensorial foi realizada através da Análise Discriminante Quantitativa (ADQ), sendo descritas 26 características sensoriais, que foram agrupadas em quatro parâmetros fundamentais: visual, odor, textura e sabor. Cada característica foi analisada e comparada com o padrão obtido a partir dos escores estabelecidos por seis julgadores treinados, para cada controle de temperatura e período de maturação (30, 60, 120 e 180 dias). Também, com base nas 26 características sensoriais, foram realizadas análises de fatores e análise discriminante. Observou-se que um queijo maturado por 60 dias a 15 °C apresentou as mesmas características sensoriais de um outro de 120 dias de maturação sob temperatura de 10 °C. Dessa forma, pode-se modificar o prazo mínimo de 100 dias de maturação para a comercialização para 60 dias, conservando as qualidades sensoriais.

ABSTRACT

NARDES, Rosane Elvira Ferrazza, D.S. Universidade Federal de Viçosa, November 2002. **DOP Zamorano cheese characterization under accelerated ripening condition by temperature modification.** Advisor: Mauro Mansur Furtado. Committee Members: Célia Lúcia de Lucas Fortes, José Ivo Ribeiro Júnior and Sebastião César Cardoso Brandão.

DPO (Denomination of Protected Origin) Zamorano cheese, registered since 1993 at the Regulatory Council is manufactured principally in the province of Zamora (Spain). It is obtained from Churra and/or Castellana ewes' pasteurized milk. Hard cheese, such as DPO Zamorano, needs a minimum ripening period so that microbiological, chemical and biochemical changes can occur, transforming the tasteless mass, initially without a defined flavor, into a product with characteristic aroma, flavor and texture. Hence, the Regulatory Council of Denomination of Protected Origin stipulates a 100-day ripening minimum period for its commercialization. This process is very slow, making it expensive for the producer and increasing the cost to the consumer. Therefore, acceleration of the ripening process by elevated temperature for this type of cheese reduces ripening time and energy costs, thus promoting an increase in cheese production, principally in regions where storage is a limiting factor. Through this process, it is possible to obtain cheese quality similar to that of cheeses produced by the traditional system. In order to reach these objectives, a defined protocol with different temperature controls was followed during 180 days. The cheese produced was submitted to the following five ripening temperatures controls: 10 °C until 180 days (A); 10 °C until 60 days and 15 °C from 60 until 180 days (B); 10 °C until 60 days and 15 °C from 60 to 120 days and 10 °C from 120 until 180 days (C); 15 °C until 60 days and 10 °C from 60 days until 180 days (D) and 15 °C until 180 days (E). Total count of mesophylls, lactococcus, lactobacillus, micrococcus, enterococcus, enterobacteria, mold and yeast was determined in the cheeses. The total lactobacillus count increased during ripening, following a decrease in the lactococcus flora. The

former presented a slower metabolism and a more intense proteolytic activity. Microbiological characterization is indispensable for cheese quality control, thus other analyses were necessary to verify the presence of the contaminant flora. Physical-chemical, chemical and biochemical characteristics of cheese were determined to monitor proteolysis. The indexes of proteolysis, extension (SN/TN) and depth (NPN/SN) showed a significant increase during ripening, favoring cheese under elevated temperature storage (15 °C). The same occurred with casein fractions, through a more accentuated degradation of α_s -caseins, favored by the activity of curd and microbial enzymes. β -caseins suffered a lower degradation along ripening. This degradation is probably due to plasmin activity, which promotes the appearance of three γ -caseins fractions. Amino acid profiles showed higher percentages of glutamic acid, leucine and proline, which favored the characteristic DPO Zamorano cheese flavor. Rheologic characteristics such as hardness, fractureability, elasticity, adhesivity, cohesiveness, gumminess and chewability of cheese were determined using a universal texturometer (Texture Analyser TA-XT2). The first five characteristics were obtained through graphs produced by Texture Profile Analysis (TPA), from which were calculated the last two. Hardness, elasticity and fractureability did not change with different temperatures controls but presented significant changes along ripening as a consequence of proteolysis. Sensory analysis was conducted by Quantitative Discriminant Analysis (QDA), with 26 sensory characteristics grouped into the following main parameters: visual, aroma, texture and flavor. Each characteristic was analyzed and compared to the standard obtained from the established scores, by six trained graders for each temperature control and ripening periods (30, 60, 120 and 180 days). Also, based on these 26 sensory characteristics, factor analysis and discriminant analyses were conducted. Cheese ripening for 60 days at 15 °C presented the same sensory characteristics as compared to ripening for 120 days at 10 °C. Thus, the minimum 100-day ripening period for commercialization can be reduced to 60 days, preserving sensory qualities.

1. INTRODUÇÃO

Estudar a evolução do processo tecnológico de produção do queijo de leite de ovelha e o desenvolvimento de uma tecnologia de aceleração da maturação é de grande interesse, a fim de obter queijos com qualidade similar à daqueles elaborados mediante o sistema de maturação clássico, tornando-se, assim, uma opção viável e competitiva para as indústrias lácteas brasileiras.

A fabricação do queijo de leite ovelha representa, em certas regiões da Europa, valores bem apreciáveis, importantes economicamente, havendo grande variedade de queijos fabricados com esse tipo de leite. São famosos os queijos Roquefort, na França; Pecorino e Canestrato Pugliese, na Itália; Feta, na Grécia; e Manchego, Idiazabal, Roncal e Zamorano, na Espanha (NÚÑEZ et al., 1991).

Segundo SERRANO et al. (1997), a Espanha ocupa o sexto lugar na produção mundial de leite de ovelha, sendo a produção mundial de 233 milhões de litros de leite de ovelha/ano. Os países que mais produzem este leite são Turquia, Grécia, Itália, Romênia e Bulgária. O leite de ovelha é muito importante nos países do mediterrâneo, colaborando sensivelmente para a produção de queijos nessas regiões (FUERTES et al., 1998).

A maturação de queijos engloba uma série de complexos processos bioquímicos, como glicólise, proteólise e lipólise, necessários para o desenvolvimento do *flavor* e textura, podendo ser modificados pela sua aceleração (FARKYE e FOX 1990; FOX, 1993; FOX et al., 1993; PAVIÁ et al., 2000). Como consequência dessas trocas bioquímicas, a coalhada adquire novas características. A massa inicialmente compacta e sem sabor é modificada em sua composição e estrutura e, em consequência, em seu aspecto, consistência e cor, principalmente em queijos de massa firme, do tipo Zamorano (POMAR et al., 2001b). Simultaneamente, acentua-se o sabor e o aroma (FOX, 1993). Essas transformações estão condicionadas a fatores ambientais, como temperatura e umidade, características físico-químicas do produto, como composição, pH e A_w , fermentos utilizados, tipo de processamento e tipos e atividade de enzimas

nativas do leite, bem como enzimas coagulantes ou microbianas dos fermentos lácticos (FOX, 1993; LAW e HANSEN et al., 1997; FOX e McSWEENEY, 1996).

Várias técnicas têm sido empregadas na aceleração da maturação, principalmente de queijo Cheddar, mais especificamente em queijos duros e semiduros, com os objetivos de diminuir custos, favorecer o suprimento de queijos extra maturados e, controlar e monitorar a maturação (LAW et al., 1979; EL SODA, 1997). Por ser a maturação um processo lento e oneroso, há interesse em acelerar seu desenvolvimento. Entre os processos existentes para acelerar a maturação pode ser citado o uso de temperaturas elevadas, de culturas lácticas selecionadas, ativadas ou modificadas, de enzimas exógenas, pastas de queijos (*Slurries*) e, mais recentemente, da pressão hidrostática.

Muitos trabalhos têm sido realizados envolvendo estocagem de queijos com temperatura controlada (ASTON et al., 1983 e 1985; FEDRIC e DULEY, 1984; NÚÑEZ et al., 1991; GAYA et al., 1990). Estes trabalhos têm-se pautado nas mudanças na proteólise e no desenvolvimento do *flavor* e textura do queijo.

A maturação acelerada do queijo Zamorano DOP (Denominação de Origem Protegida) tornou-se de interesse em virtude de o prazo mínimo exigido para sua comercialização pelo Conselho Regulador ser de 100 dias. Na prática, para se conseguir um produto de qualidade, este deve ser freqüentemente comercializado após um período de maturação que oscila entre oito meses e um ano, representando, do ponto de vista econômico, um problema, devido à imobilização de capital durante esse período, tornando o preço de venda muito elevado, o que torna o produto pouco competitivo. Daí surge a necessidade de se procurar um processo que viabilize a diminuição desse tempo de maturação, mantendo-se a qualidade do queijo.

Modificação na temperatura de maturação é uma alternativa viável, por ser um método simples e econômico, capaz de acelerar os processos bioquímicos, que ocorrem durante esse período, apresentando ainda como vantagem a não-incorporação adicional de agente externo à massa do queijo, que, sob o ponto de vista legal, seria aceito e adequado, segundo o Conselho Regulador de D.O.P.

O objetivo deste trabalho foi investigar as características da maturação sob temperatura elevada (15 °C), utilizando diferentes combinações de temperatura durante 180 dias de maturação e avaliando os aspectos microbiológicos físico-químicos, químicos e proteolíticos, bem como os aspectos de textura e sensorial do queijo. A aceleração da maturação por temperatura controlada é uma alternativa interessante e acessível, que possibilita redução nos custos de produção, devido à redução do tempo de maturação e da refrigeração.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O leite de ovelha

Muitos animais são explorados para a produção de leite para consumo, como vaca, cabra, ovelha, búfalo e camelo, constituindo a base comercial da produção de leite e seus subprodutos (VARNAM e SUTHERLAND, 1994). É difícil chegar à origem exata da utilização do rebanho ovino para produção leiteira. Sabe-se, no entanto, que o rebanho de ovelhas acompanhou o desenvolvimento da civilização mediterrânea (KALANTZOPOULOS, 1993; FUERTES et al., 1998). Muitos escritos antigos, como o Antigo Testamento, a Ilíada, a Odisséia, referendam a ordenha do leite da ovelha e a fabricação de queijo (LUQUET, 1985).

Os historiadores gregos e latinos fizeram constantes menções ao queijo de leite de ovelha, considerando este um alimento de vital importância na dieta dos povos. A mais antiga representação gráfica do queijo de leite de ovelha e sua fabricação remontam a 3000 anos a.C., na cidade árabe de Bagdá. Nessa época utilizavam-se animais como ovelha e cabra para a produção de leite e, como consequência da acidificação deste, foram obtidos os primeiros queijos.

O período de lactação de uma ovelha ocorre em média até 100 dias e a produção diária varia em torno de um máximo de 1.200 a 1.500 g e um mínimo de 300 g, sendo em média de 700 a 500 g (VIEIRA e SANTOS, 1967). A ordenha começa um mês após a parição e é feita sem cordeiros, pois estes geralmente são vendidos com 3 a 4 semanas, quando pesam de 10 a 12 kg. O estágio de lactação tem efeito significativo no rendimento da ordenha e na composição do leite (FUERTES et al., 1998). No Brasil existem as raças Wiltermasch, Lacaune e Bergamacia (VIEIRA e SANTOS, 1967); na Espanha, Churra, Castellana, Merina e Manchega, entre outras (NÚÑEZ et al., 1986).

Os ovinos são, entre os animais produtores de leite, os que mais sofrem influência do meio ambiente, como pastagem, clima e posição geográfica. Estes fatores influem diretamente na qualidade do leite, sendo necessário e imprescindível seguir as alternativas para melhorar o ambiente de produção, de

forma a permitir que a raça encontre condições adequadas às suas exigências, principalmente para obter um melhor rendimento no processamento (FUERTES et al., 1998).

2.1.1. Composição

A composição do leite é bastante variável, em diferentes espécies, principalmente no que diz respeito aos teores de proteína, gordura e lactose (OLIVEIRA, 1986). O leite de ovelha distingue-se do leite de vaca e do de cabra por determinadas características, umas diretamente observáveis. Apresenta cor branco-nacarada, ou porcelana, portanto apresentando opacidade branca, mais marcada que o leite de vaca e de cabra. Estas características estão ligadas às suas particularidades físicas e químicas e, em especial, à ausência de caroteno no leite (LUQUET, 1985). Os ovinos variam muito quanto à sua aptidão leiteira, principalmente em função das raças, tendo igual ou menor aptidão que os caprinos. Rico em caseína e em gordura, o leite de ovinos é mais usado para a fabricação de queijos do que para o consumo natural (VIEIRA e SANTOS, 1967).

Os fatores genéticos, a reprodução, a idade do animal, as condições climáticas, a dieta e o período de lactação em que se encontra o animal são fatores que interferem diretamente na produção do leite e, conseqüentemente, na fabricação do queijo (MENDIA et al., 2000).

O leite de ovelha sempre foi considerado com características específicas, principalmente em função da sua composição química, pois apresenta grande quantidade de extrato seco total, comparado aos leites de cabra e vaca. Tem-se o hábito de dizer que, para quantidades idênticas, se prepara, em média, duas vezes mais queijo com leite de ovelha do que com leite de vaca (LUQUET, 1985).

O leite de ovelha apresenta - expressos em g/100 g de leite, em média - 18,40 de matéria seca, 7,19 de gordura, 4,5 de caseína, 0,90 de cinzas e 4,66 de lactose, sendo estes valores a média dos resultados de análises de amostras retiradas de grandes misturas (RIVEMALE, 1982).

De modo geral, a composição básica do leite é a mesma, seja qual for a origem, mas a porcentagem de cada um dos componentes principais varia muito. Essa variação é mais marcante de uma espécie de animal para outra. Pode-se observar no Quadro 1 que o leite humano é o de mais baixa porcentagem de proteína, o que coincide com a grande dependência do recém-nascido, que leva cerca de 6 meses para duplicar o seu peso inicial (LUQUET, 1985); já o leite de ovelha é o mais rico em gordura e proteína, fatores indispensáveis para bom rendimento queijeiro.

Quadro 1 – Composição centesimal do leite de várias espécies de animais

Espécie	Proteína	Gordura	Lactose	Cinzas	Água
Humana	1,5	3,5	7,0	0,2	87,8
Eqüina	2,6	1,6	6,1	0,4	89,3
Bovina	3,5	3,8	5,0	0,7	87,0
Caprina	4,0	3,0	4,8	0,8	87,4
Ovina	5,4	8,2	4,8	0,9	80,7

Fonte: OLIVEIRA (1986).

2.1.2. Caseínas

A relação caseína/proteína é um valor sensivelmente constante. O teor protéico do leite de ovelha apresenta diferenças em relação ao do leite de outros animais. O Quadro 2 mostra a divisão das frações caseínicas em leite de vaca, cabra e ovelha.

Quadro 2 – Frações caseínicas de leites de diferentes espécies (%)

Frações Caseínicas	Leite de vaca	Total	Leite de cabra	Total	Leite de ovelha	Total
α_{s1}	36,0	45,5	-	12,6	15,5	30,2
α_{s2}	9,5	-	12,6	-	14,7	-
β_1	33,0	33,0	35,9	75,3	18,9	47,1
β_2	-	-	39,4	-	28,2	-
κ	9,4	-	8,1	-	7,3	-
γ	6,8	-	3,9	-	15,4	-

Fonte: LUQUET (1985).

Observa-se que a porcentagem de caseínas α_{s1} e α_{s2} no leite de ovelha é nitidamente mais elevada que no leite de cabra (30,2% contra 12,6%), mas significativamente mais baixa com relação ao leite de vaca (30,2% contra 45,5%). Quanto à porcentagem de caseínas β no leite de ovelha, esta representa quase a metade da caseína total, contra dois terços para o leite de cabra e um terço para o leite de vaca.

O baixo teor de caseínas do grupo α_s -caseínas do leite de ovelha parece ser o responsável pela quase ausência dos sabor amargo dos queijos de leite de ovelha. Essa observação está baseada no fato de que no leite de cabra verifica-se que existe correlação entre um teor menor de α_s -caseínas e a ausência de sabor amargo (FUERTES et al., 1998).

A diferença na estrutura entre as caseínas destes leites tem influência no tempo de coagulação e na firmeza do coágulo. O leite de ovelha coagula em tempos maiores e a firmeza do gel é duas vezes maior que aquela do leite bovino (KALANTZOPOULOS, 1993).

2.1.3. Gordura

O diâmetro médio dos glóbulos de gordura é de 3,30 micron para o leite de ovelha e de 4,55 micron para o leite de vaca. A cor da matéria gorda de ovelha é nitidamente mais branca. Esta particularidade se deve à quase ausência de caroteno (LUQUET, 1985).

O leite de ovelha apresenta sabor típico e parece ser mais picante do que o leite de vaca. Esta característica parece estar relacionada, principalmente, com sua composição em lipídeos, pois são particularmente ricos em ácidos graxos C_6 - C_{12} . Triglicérides e fosfolipídeos representam 98 e 0,8%, respectivamente, dos lipídeos do leite de ovelha (KALANTZOPOULOS, 1993). Os lipídeos do leite de ovelha caracterizam-se pela presença dos ácidos cáprico e caprílico, que representam 6 a 15% dos ácidos graxos totais, respectivamente, contra somente 3 a 5% no leite de vaca (LUQUET, 1985).

As proporções relativas de ácidos graxos saturados de C₄ (ácido butírico) a C₁₆ (ácido palmítico) evoluem paralelamente, situando-se no mínimo no final do período de lactação, enquanto o máximo ocorre no início da lactação. Os ácidos esteárico e oléico seguem uma evolução inversa (LUQUET, 1985). O ácido oléico representa um teor de 16 a 30% no leite de ovelha e de 21 a 28% no leite de vaca. Comparando o leite de vaca ao leite de ovelha, o último apresenta sempre mais elevado teor de ácidos graxos, com exceção do ácido palmítico. Os ácidos graxos de menor cadeia são predominantes no leite de ovelha.

O odor e o gosto característico do leite de ovelha estão em estreita relação com a taxa de ácidos graxos de cadeia curta. As características de gosto e aroma estão também intimamente ligadas ao fenômeno de lipólise, sendo decorrentes de reações específicas dos lipídeos.

A gordura do leite de ovelha sofre variações por efeitos sazonais. Os valores são suscetíveis de oscilação em virtude dos diversos fatores ligados à lactação e aos aspectos genéticos (FUERTES et al., 1998). As diferenças observadas na composição dos lipídeos do leite de ovelha e os do leite de vaca não parecem muito importante para modificar o seu valor nutritivo (KALANTZOPOULOS, 1993).

2.2. Queijo de leite de ovelha

A maior parte dos queijos hoje fabricados a partir do leite de ovelha é produto de uma tradição ancestral, pois sabe-se que esta atividade está relacionada à atividade de pastoreio, que acompanhou o homem desde o início da civilização (SAN FRANCISCO e COBOS, 1995).

A grande parte do leite de ovelha produzido no mundo destina-se à elaboração de queijos. Estes queijos tiveram início primeiramente de maneira artesanal, com suas características próprias, o que levou os países europeus detentores desta tecnologia a criar decretos e estabelecer nestes as Denominações de Origem Protegida (DOP), sendo uma forma de manter as suas culturas e divisas para seus países (KALANTZOPOULOS, 1993). Estes queijos de leite de ovelha também podem ser elaborados como queijos de mescla, ou seja,

queijos obtidos de misturas de leite de ovelha com leite de cabra, ou com leite de vaca, ou ambos em proporções diferentes.

A produção de leite de ovelha em países como a Espanha é fortemente influenciada pelo tipo de estrutura produtiva e pelos sistemas de exploração que se emprega no gado ovino leiteiro. A partir dos anos 80 houve aumento global na produção, como consequência de maior profissionalização do setor, alcançando na atualidade 350 milhões de litros de leite, dos quais aproximadamente 90% se encontram nas regiões de Mesetas; destes, 65 a 70% ocorrem na Comunidade de Castilla e León, devido fundamentalmente aos hábitos tradicionais de consumo de queijos específicos, cuja fabricação se destina a 99% da produção (MAPA, 1997).

A indústria queijeira deste setor enfrenta um grande problema, devido às fortes variações a que é submetida a produção. A maior concentração da produção de leite ocorre aproximadamente entre os meses de março e setembro, o que limita o desenvolvimento industrial, fazendo com que a grande maioria destes queijos seja feita de maneira artesanal. Hoje o mercado encontra-se mais exigente, e grande parte dessa produção utiliza métodos industriais de fabricação, participando ativamente da competitividade econômica.

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos - ABIQ (2001), a produção de queijos no Brasil foi de 375.071.000 toneladas. Os queijos obtidos no Brasil, na grande maioria, são de leite de vaca, com pequena porcentagem de queijos de leite de cabra. A produção de queijos de leite de ovelha encontra-se em fase inicial, sendo necessário muito investimento e incentivo para obter raças de ovelhas produtoras de leite.

O Rio Grande do Sul e o Nordeste, bem como outros Estados brasileiros, estão investindo na produção de ovinos para carne e lã. Raças como Wiltermach, Lacaune e Bergamácia, já existentes na Bahia, poderão ser utilizadas também para produção de leite e queijos, como o fazem países como Austrália, Nova Zelândia, França, Itália, Portugal, Espanha, entre outros.

A composição média do leite de ovelha proporciona rendimento queijeiro mais elevado do que aquele que se pode esperar dos leites de vaca e cabra,

principalmente no que diz respeito a sua matéria gorda e protéica (LUQUET, 1985).

Os fatores sazonais são particularmente importantes e exercem influência na qualidade do queijo. O período de lactação é dependente do ciclo reprodutivo, apresentando um limite na época de fabricação do queijo. Trabalhos realizados por MENDIA et al. (2000) mostraram que o período de coleta do leite para fabricação de queijos foi altamente influenciado pela época; no mês de junho a composição do leite em gordura e proteína é maior para a elaboração de queijos, atingindo maior rendimento e melhor sabor.

Nos últimos anos têm sido realizados diversos estudos de tipificação de alguns queijos na Espanha, tanto industriais como artesanais, como, por exemplo, os queijos Manchego (PARDO et al., 1996; SERRANO et al., 1997), Majorero (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 1992), La Serena (GONZÁLEZ et al., 1991; ROA et al., 1997, 1999), Idiazábal (BARCINA et al., 1995; IBÁÑEZ et al., 1995), Roncal (MILLÁN et al., 1992), Mahón (FRAU et al., 1997; GARCÍA-PALMER et al., 1992), Valdeteja (CARBALLO et al., 1994), Armada (FRESNO et al., 1996) e Zamorano (POMAR et al., 2001a, b).

Após a ação da renina sob a caseína bovina ou ovina ou sobre suas κ -caseínas, uma grande proporção de nitrogênio não-protéico (NPN) é produzida tanto da caseína bovina quanto da ovina, favorecendo a produção de peptídeos pequenos e aminoácidos, responsáveis pelo *flavor* característico do queijo. A obtenção da caseína-glicoptídio, após a ação da renina sobre a κ -caseína ovina, é similar ao obtido sobre κ - caseína bovina (KALANTZOPOULOS, 1993).

A renina de carneiro é usada na coagulação da maioria dos queijos de leite de ovelha. Este produto, quando obtido destes animais recém-nascidos, contém principalmente quimosina e somente pequena quantidade de pepsina. Em Portugal o queijo Serra da Estrela e na Espanha o queijo La Serena e a Torta de Cazar, produzidos na região de Extremadura, são queijos de leite de ovelha, obtidos pela coagulação do leite com extrato de flores de Cardoons (*Cynara cardunculus*). Este coalho é extremamente proteolítico (KALANTZOPOULOS, 1993).

Na Grécia existe grande consumo de queijos de leite de ovelha e cabra. Aproximadamente 65% do leite de ovelha e de cabra produzido é consumido na forma de queijo obtido industrialmente, especialmente o queijo Feta. O restante é consumido na forma de leite, queijos artesanais ou iogurte. A produção de queijo de leite de vaca é muito baixa, sendo a grande parte importada (KALANTZOPOULOS, 1993).

2.3. O queijo Zamorano DOP

O queijo Zamorano é um queijo espanhol que estava incluído no grupo genérico de queijos Castelhano, fabricado em diversas regiões de Castilla e León, especialmente na província de Zamora. Com o tempo começou a demonstrar caráter único e diferente, o que lhe deu a Denominação de Origem Protegida (DOP).

A defesa da Denominação de Origem Protegida, a aplicação de seu regulamento, a vigilância do comprimento deste, assim como o fomento e o controle de qualidade do leite e dos queijos amparados, são determinados pelo Conselho Regulador da Denominação de Origem e pela Direção Geral de Política Alimentária do Ministério de Agricultura, Pesca e Alimentação, no âmbito de suas respectivas competências (MAPA, 1993).

A elaboração e a maturação do queijo estão baseadas nos arts. 8º, 9º, 10º e 11º da Legislação do MAPA (1993), com objetivo de manter o máximo de qualidade, preservando as características tradicionais do queijo. O Conselho Regulador poderá autorizar, dentro da Denominação de Origem, o uso da expressão “artesano”, quando o queijo for elaborado com leite cru de ovelhas das raças Churra e Castellana, utilizando coalho de origem animal, e de acordo com as normas vigentes estabelecidas pelo Conselho para justificar a referida denominação artesanal.

O queijo Zamorano DOP é produzido especificamente com leite de ovelha das raças Castellana e Churra, com produção em média de 82 e 97 litros/ano, respectivamente. Apesar de outras raças apresentarem produção superior, estas são favorecidas indiscutivelmente pela sua qualidade, como

demonstram as análises. As características físico-químicas do leite devem apresentar a sua composição equilibrada para obter o produto final desejado. O teor de extrato seco (ES) geralmente se apresenta em torno de 19,8%, tendo este composto em média 4,8% de lactose, 8% de gordura e 5,9% de proteínas. Estes valores médios são superiores aos do leite produzido pela Comunidade de Castilla e La Mancha, Espanha, que é de 16,5% de ES (SAN FRANCISCO e COBOS, 1995). Especificado no art. 6º de seu regulamento, estabelece-se um mínimo de 17,5% de ES, 23º Dornic de acidez no máximo e gordura não inferior a 8% (MAPA, 1993).

O queijo Zamorano se assemelha ao queijo Manchego, que é um dos queijos espanhóis mais estudados com relação às características sensoriais, físico-químicas e de maturação. O queijo Zamorano apresenta massa firme e compacta, com grande quantidade de caseína e gordura, componentes estes indispensáveis para o seu rendimento (FURTADO, 1996).

Ao término de sua maturação este queijo apresenta as seguintes características físicas: forma cilíndrica, em que o molde da forma proporciona a forma característica do queijo, com altura de no máximo 14 cm, diâmetro de até um máximo de 24 cm e peso máximo de 4 kg, casca dura, conforme suas formas, dimensões e pesos estabelecidos no art. 12.2 do MAPA (1993), de cor amarela pálida a cris escura. O queijo deve apresentar a massa firme e compacta, de cor variável, desde branco até marfim-amarelado, podendo apresentar olhos pequenos em toda a sua extensão. O aroma e sabor devem ser característicos, bem desenvolvidos, intensos e persistentes ao paladar (MAPA, 1993).

Quanto às características físico-químicas e químicas, o queijo deve possuir um mínimo de 55% de extrato seco, gordura não inferior a 45% sobre o extrato seco total e teor de proteína total mínimo de 25%; o valor do pH deve ser estabelecido entre 5,1 e 5,8. As qualidades microbiológicas devem seguir a legislação vigente. Os produtos que não seguirem as normas estabelecidas pelo Conselho Regulador não serão amparados pela Denominação de Origem Protegida (MAPA, 1993). Ainda com relação a esses tipos de queijos, devem-se seguir todas as normas de registros para obter e manter a DOP.

O queijo Zamorano DOP é fortemente influenciado pela estrutura produtiva e pelo sistema de manejo com que é conduzido o gado leiteiro produtor de leite para esse tipo de queijo. Pela primeira vez este queijo está sendo estudado quanto às suas características tecnológicas, a fim de auxiliar na sua divulgação e caracterização, tão importante junto ao Conselho Regulador de Denominação de Origem. É importante conhecer todos os seus aspectos físico-químicos, visando pleitear novas tecnologias e melhorias constantes nos aspectos higiênicos sanitários, satisfazendo a demanda de qualidade por parte dos consumidores, bem como reduzir as perdas durante a produção do queijo.

É de importância fundamental em qualquer queijo maturado a observação das condições e do controle de sua maturação, a fim de se obter a padronização do produto final, que sem dúvida se traduzirá em grande expansão do mercado tanto interno como externo. É importante caracterizar os queijos DOP, tanto os obtidos de maneira artesanal como industrial (MAPA, 1993).

Estudos realizados por POMAR et al. (2001a) em queijos Zamorano DOP elaborados de maneira artesanal e industrial com até 240 dias de maturação, nos aspectos físico-químicos e químicos, nas partes externa e interna do queijo, demonstraram que o conteúdo de extrato seco aumentou significativamente ($p < 0,05$) ao longo de toda a maturação, sendo o aumento maior na porção superficial. Os valores médios finais da maturação foram de 77,56 e 68,89 g ES/100 g de queijo na superfície e no interior, respectivamente. Esses resultados satisfazem perfeitamente os valores determinados pelo Conselho Regulador de Denominação de Origem Protegida, que devem ser de, no mínimo, 55% de ES. As quantidades de proteína e gordura encontradas foram superiores às estabelecidas pela legislação - no mínimo, 25 e 45% /ES, respectivamente.

2.4. Microbiota do queijo

A seleção da cultura lática a ser empregada na elaboração de queijos é um dos fatores da produção que apresentam grande influência no produto final. Cada cultura apresenta metabolismo próprio, com substratos e potencial glicolítico, lipolítico e proteolítico específicos da sua estirpe (SOUSA et al., 2001).

As bactérias do ácido láctico (BAL) são essenciais na fabricação da maioria dos queijos. O ácido produzido por estas bactérias contribui para a atividade enzimática do coalho, favorecendo a sinérese, liberando a umidade sob a forma de soro e formando o queijo, reduzindo o conteúdo de água de 30 a 60%, diminuindo o pH de 6,6 para 4,6 a 5,2 e proporcionando aumento na vida útil do produto. A produção do ácido láctico durante a fabricação do queijo tem outros efeitos além da sinérese do gel, como retenção do coagulante no queijo, resistência da coalhada ao corte, extensa dissolução de fosfato de cálcio e inibição de crescimento de muitas espécies patogênicas (COGAN e HILL, 1993).

Além das bactérias do ácido láctico, as bactérias da flora secundária são de suma importância no queijo, pois se apresentam de forma diversificada, dependendo da matéria-prima, do tratamento térmico a que é submetido e do ambiente do processamento. Diferindo na quantidade e qualidade, a microbiota contribui intensamente para a textura e o *flavor* do queijo (DUMAIS et al., 1991; FOX et al., 1993; Mc SWEENEY et al., 1995).

Segundo KALANTZOPOULOS (1993), a microflora do queijo feito de leite de ovelha consiste de bactérias naturalmente presentes ou que podem ingressar no leite durante a produção. Na região do Mediterrâneo, combinações de bactérias naturais do ácido láctico existem como resultado da seleção natural, na qual produzem uma cultura especial que se denomina “Cultura Natural Mediterrânea”, usada na produção de queijos tradicionais. As espécies predominantes são bactérias termofílicas, especialmente espécies de *Lactobacillus*, que seguem as seguintes características: capacidade de boa acidificação, bom desenvolvimento no soro, resistência a fagos, algumas com força e ação anti-*Clostridium*.

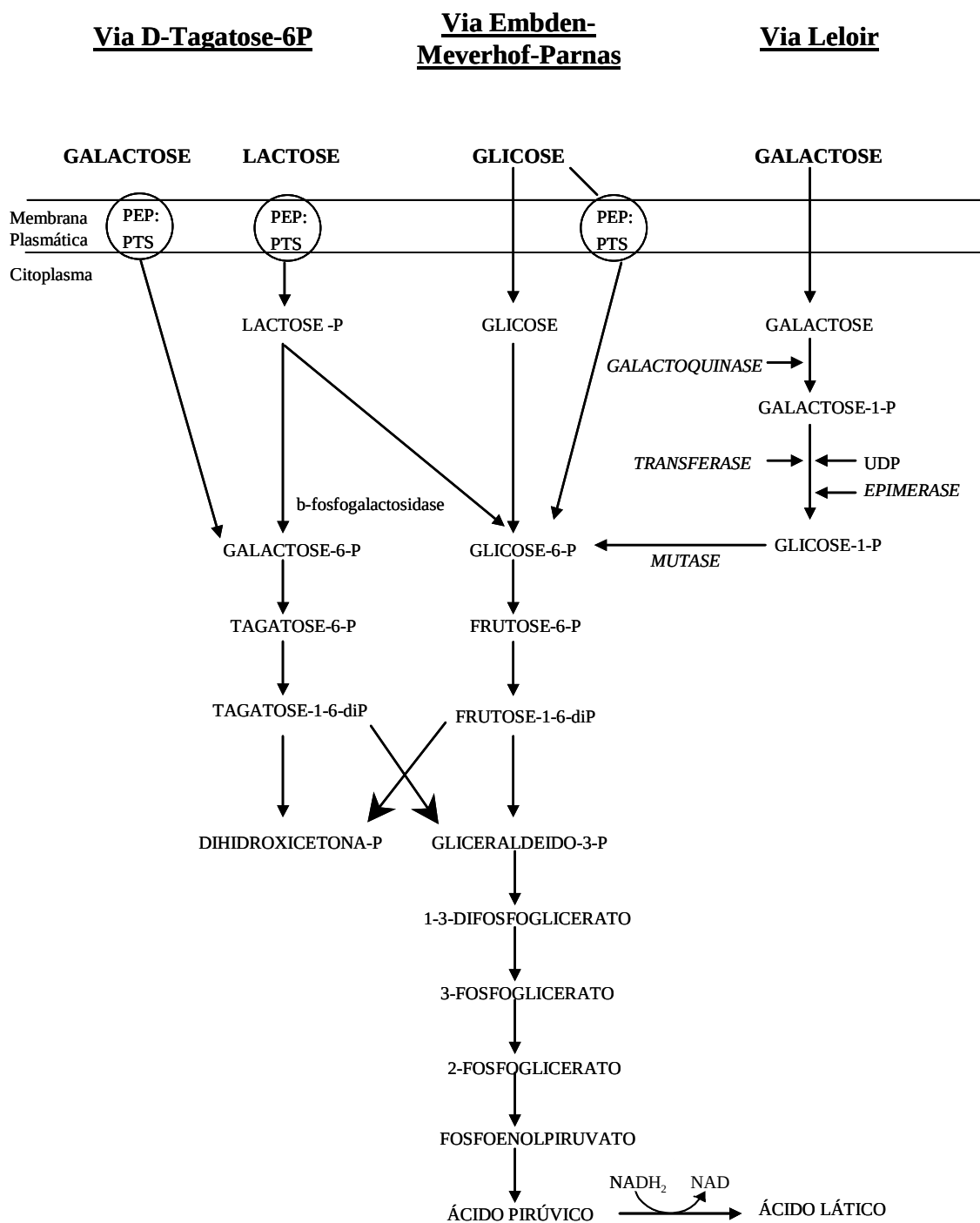
As culturas mais usadas na elaboração de queijos são as mesofílicas, que apresentam uma temperatura de crescimento ótima de aproximadamente 30 °C, e as termofílicas, com um ótimo de crescimento em torno de 45 °C. A escolha da cultura depende do tipo de queijo que vai ser elaborado. Na grande maioria dos queijos são utilizadas culturas mesofílicas, que crescem muito bem no leite e são capazes de se associar a outras culturas, especialmente *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (COGAN e HILL, 1993). Estes

microrganismos são importantes, principalmente na primeira fase de fabricação do queijo (DUMAIS et al., 1991).

As BALs podem ser homo ou heterofermentadoras. As homofermentadoras degradam as hexoses por via glicolítica, produzindo ácido láctico como produto final. As heterofermentadoras seguem a rota das pentoses-P, produzindo ácido láctico, CO₂, acetato e/ou etanol, que, além dos produtos orgânicos produzidos em seu metabolismo, originam ácidos voláteis e diacetil, responsáveis pelo *flavor* no queijo (DUMAIS et al., 1991). A principal diferença entre as duas vias está relacionada com o rendimento em ATP por molécula de glicose fermentada, que, para homoláticas, é de dois moles, e para heteroláticas é de um mol. Elas também diferem no tipo de ácido láctico formado, produzindo isômeros D e L do lactato, em função do que possuem D-lactato desidrogenase ou L-lactato desidrogenase, ou podem apresentar distintas especificidades, caso em que será formado ácido láctico racêmico (COGAN e HILL, 1993).

De acordo com FRANK e MARTH (1988), a maioria dos microrganismos que fermentam a lactose utiliza duas estratégias para iniciar a fermentação: a hidrólise da lactose pela enzima β -D-galactosidase (lactase) e/ou pela enzima β -D-fosfogalactosidase. Quando a hidrólise ocorre via β -D-galactosidase, há produção de glicose e galactose, que são metabolizadas via Embden-Meyerhorf-Parnas e via Leloir, respectivamente. Por outro lado, se a hidrólise ocorre via β -D-fosfogalactosidase, tem-se a produção de glicose e galactose-6-P, metabolizadas via Embden-Meyerhorf-Parnas e via D-Tagatose-6P, respectivamente, conforme Figura 1.

As bactérias do ácido láctico (BAL) também possuem atividades proteolíticas e peptidolíticas, levando à formação do nitrogênio solúvel, constituído de peptídeos de maior e menor tamanho. Na formação do nitrogênio amínico e do nitrogênio amoniacal a ação das bactérias lácticas parece ser fundamental (GRIPON et al., 1977; DESMAZEAUD et al., 1976). As culturas lácticas possuem sistemas enzimáticos complexos, constituídos por aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases, sendo os lactobacilos especialmente ricos em exopeptidases.

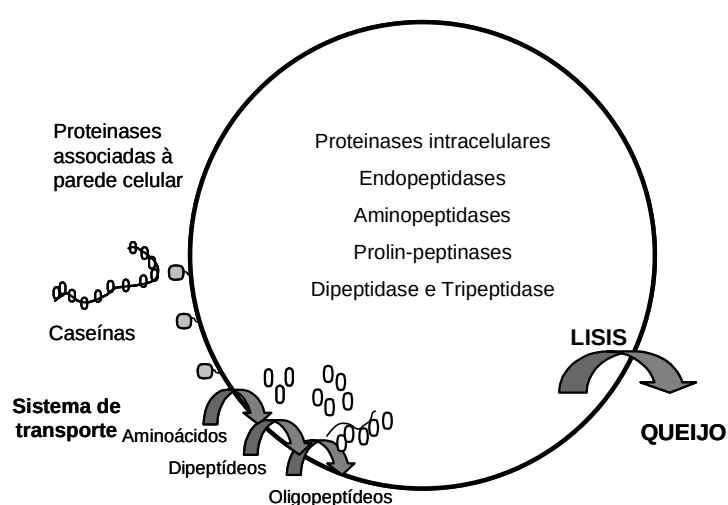


Fonte: LAWRENCE et al. (1976).

Figura 1 – Vias de degradação da lactose realizada por alguns microrganismos.

Os principais substratos das BALs são as caseínas α_{s1} ou o produto de degradação destas (DESMAZEAUD et al., 1976). A ação das bactérias lácticas complementa, portanto, a ação do coalho, uma vez que este libera peptídeos de alto peso molecular, que são logo degradados pelas bactérias do ácido láctico a aminoácidos, e peptídeos de cadeias curtas (CHOISY et al., 1987; OLSON, 1990), resultando em alterações de textura, as quais decorrem da hidrólise da fração α_{s1} -caseína e do enfraquecimento da rede de caseínas (MORENO et al., 2002).

A importância das peptidases intracelulares das culturas lácticas no processo de maturação e aceleração da maturação em queijos já foi comprovada. Um total de 16 peptidases de bactérias lácticas foi caracterizado bioquímica e/ou geneticamente. Elas são liberadas na matriz do queijo após a autólise celular provocada pelas autolisinas, enzimas líticas que catalisam a hidrólise de ligações específicas do peptidoglicano, o principal componente da parede celular das bactérias. A autólise pode também ocorrer de forma espontânea, quando as bactérias alcançam a fase estacionária de crescimento ou quando se encontram em condições fisiológicas desfavoráveis. A correlação entre os níveis de autólise das culturas lácticas e a proteólise foi determinada medindo-se a liberação de aminoácidos livres e de peptídeos nos queijos, conforme SOUSA et al. (2001) (Figura 2).



Fonte: SOUSA et al. (2001).

Figura 2 – Representação esquemática do sistema proteolítico dos lactococos.

As bactérias lácticas possuem escassa atividade lipolítica, atuando mais facilmente sobre a gordura já parcialmente hidrolisada, principalmente sobre mono e diglicerídeos (CHOISY et al., 1987). Os lactococos e lactobacilos são descritos por apresentarem um sistema lipásico e esterásico intracelular (HARPER et al., 1980), cuja ação está preferencialmente dirigida, devido à liberação de ácidos graxos de cadeia curta (C4:0 a C8:0) (KAMALY e MARTH, 1989). A atividade lipásica das BALs se manifesta na faixa de pH de 5 a 9 e parece ser mais elevada em pH 7 (KAMALY et al., 1990).

Praticamente em todos os tipos de queijos que usam culturas mesofílicas encontram-se as espécies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Ambas são responsáveis pelo processo de acidificação (COLLINS, 1962). Os lactococos são homofermentadores e fermentam rapidamente a lactose, degradando-a durante as primeiras etapas da maturação dos queijos. Eles são responsáveis pelas primeiras mudanças que ocorrem na maturação e, direta ou indiretamente, vão influenciar no desenvolvimento do aroma e da textura do queijo (STEELE e ÜNLÜ, 1992).

O sistema proteolítico dos lactococos pode estar relacionado com as proteinases caseinolíticas associadas à parede celular, peptidases extracelulares, sistema de transporte de aminoácidos, sistema de transporte de peptídeos e peptidases intracelulares (SMID et al., 1991). Existem duas importantes proteínas associadas à parede celular, que diferem entre si pela sua especificidade, mas as β -caseínas parecem ser as mais suscetíveis (OLSON, 1990).

De acordo com OLSON (1990), foram detectadas exopeptidases em lactococos, principalmente aminopeptidases ligadas à parede celular ou intracelular, dependendo da espécie e da cepa de lactococos. EXTERKATE (1984) detectou uma atividade Lys-aminopeptidase em *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, localizada basicamente no interior celular. Não há registros de atividade carboxipeptidase pelos lactococos, pois estes só degradam peptídeos começando pela extremidade amínica (SMID et al., 1991).

BROOME et al. (1990) constataram que muitas linhagens de *Lactobacillus* spp. apresentam atividade proteolítica mais intensa que a atividade dos lactococos e liberam mais rapidamente aminoácidos das caseínas.

Os *Lactobacillus* crescem em associação com lactococos e leuconostoc. Tem um metabolismo de degradação dos açúcares que pode ser homofermentativo ou heterofermentativo (FOX e McSWEENEY, 1996). Segundo este mesmo autor, a principal proteinase de *Lactobacillus* está associada à parede celular. As peptidases podem estar localizadas na membrana e na parede celular, e os derivados peptídicos atravessam a envoltura celular (EXTERKATE, 1984). EL SODA (1993) estabeleceu que as atividades das aminopeptidases se localizam na fração solúvel intracelular.

Os *Lactobacillus* realizam um metabolismo mais lento que o dos lactococos, aparecendo posteriormente em etapas mais avançadas da maturação. Degradam a lactose residual e produzem lactato e compostos aromáticos, como acetato, diacetil e CO₂ (LAW e KOLSTAD, 1983).

Os *Lactobacillus* heterofermentadores, *Leuconostocs* e *Pediococcus*, estão intimamente relacionados e são responsáveis pelo aroma, gerando, individualmente ou em combinações, dicarbonilos e ácidos orgânicos (COLLIN et al., 1993). Os *Micrococcus* têm papel importante na formação de tioésteres (metanotiol) e os *Lactobacillus* podem produzir piracenos aromáticos (LAW e HANSEN, 1997). Há mais de 20 anos se reconhece que os cultivos secundários são responsáveis pelo sabor no queijo; associados aos fermentos lácticos utilizados, eles formam um perfil característico de sabor e aroma, principalmente pela produção de aminoácidos, como precursores do aroma, diacetil, acetaldeído, etanol e ácidos orgânicos (LAW e HANSEN, 1997).

O queijo Pecorino Umbro, elaborado com leite de ovelha, normalmente apresenta período de maturação de 60 dias. Com adição de *Lactobacillus* mesofílico nos limites de 10⁶-10⁷ ufc/g obteve-se, após 28 dias aproximadamente, uma contagem de 10⁸ ufc/g. Nesse período observou-se a aceleração da maturação, com a liberação de aminoácidos livres, sem aparecimento de *off flavor* (CORSETTI et al., 1998).

Os enterococos, que também se incluem no grupo das bactérias láticas por sua capacidade de fermentar a lactose e produzir ácido lático, possuem certas diferenças que se traduzem em um interesse não só tecnológico (algumas espécies são proteolíticas e/ou lipolíticas), podendo ser também indicadoras de contaminação fecal e possivelmente de patógenos (CARRASCO DE MENDOZA et al., 1992). Estas bactérias são relativamente resistentes ao calor e tolerantes ao sal. Sua atividade proteolítica e acidificante pode estimular e acelerar a maturação de algumas variedades de queijo (DUMAIS et al., 1991).

A produção de ácido lático por certos lactococos é estimulada pela presença de enterococos, que, devido à atividade proteolítica intensa, proporcionam substâncias para o crescimento da flora ácido-lática (LITOPOULOU-TZANETAKI e TZANETAKIS, 1992), pois as bactérias do ácido lático são fastidiosas e requerem geralmente aminoácidos, vitaminas e outros fatores nutricionais para o seu crescimento (COGAN e HILL, 1993). GARCÍA DE FERNANDO et al. (1992) descobriram que a proteinase intracelular de *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* L61, procedente de queijo Manchego elaborado a partir de leite de ovelha, acelerava a proteólise neste tipo de queijo.

A família *Enterobacteriaceae* inclui gêneros que indicam contaminação fecal, alguns dos quais podem ser enteropatogênicos para o homem. O emprego de culturas fermentadoras adequadas na produção de queijos é fundamental no controle desses microrganismos; valores de pH baixo influenciam, inibindo o seu crescimento através da produção de ácido lático e possivelmente de algumas substâncias inibidoras (GIBBS, 1987).

A família *Micrococcaceae* inclui fundamentalmente dois gêneros de interesse: *Micrococcus* e *Staphylococcus*. Os primeiros são mais proteolíticos que as bactérias láticas, podendo degradar os produtos de ação do coalho sobre a caseína, produzindo mudanças no nitrogênio não-protéico e no nitrogênio amínico. Todos os *Micrococcus* spp. parecem produzir proteinases intracelulares e algumas proteinases extracelulares (CHOISY et al., 1987). Alguns *Micrococcus* resistem à pasteurização do leite, apresentando atividades proteolíticas,

peptidolíticas e esterolíticas durante o processo de maturação do queijo (BHOWMIL e MARTH, 1990).

GARCÍA DE FERNANDO e FOX (1991) purificaram duas metaloproteínas extracelulares a partir de *Micrococcus* GF: uma delas hidrolisou preferencialmente a β -caseína e a outra hidrolisou α_{s1} e β -caseína com aproximadamente a mesma especificidade.

Os estafilococos são microrganismos indicadores de contaminação humana ou animal e, se presentes no queijo, podem colocar em risco a saúde humana. A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, em número elevado, pressupõe a presença no alimento de enterotoxinas, porém estudos indicam que alguns estafilococos coagulase negativa de origem animal podem também gerar riscos de produção de enterotoxinas (RAPINI et al., 2002).

As bactérias contaminantes dos queijos incluem, além dos gêneros *Micrococcus* e *Enterococcus*, algumas espécies psicrotróficas. As bactérias psicrotróficas são bactérias que, embora apresentem crescimento ótimo na faixa de 20 a 30 °C, são capazes de se desenvolverem em temperaturas de refrigeração comercial (2 a 7 °C). Estes microrganismos são termosensíveis, mas produzem enzimas termorresistentes como as proteases e lipases. Isso ocorre principalmente quando se encontram no leite em quantidades superiores a 10⁶ ufc/ml. Além disso, podem surgir por contaminação pós-pasteurização (VISSER, 1993).

As proteinases de algumas espécies psicrotróficas (*Flavobacterium* e *Pseudomonas*) são capazes de degradar a α_{s1} -caseína, e algumas de suas proteinases causam sabores amargos no queijo, cujo defeito é difícil de ser eliminado (VISSER, 1993).

As lipases extracelulares produzidas por bactérias psicrotróficas têm considerável potencial para hidrolisar a gordura do leite e seus derivados. A quase totalidade destas bactérias, majoritariamente gram-negativas e termosensíveis, é destruída por tratamento térmico, porém suas lipases são muito estáveis ao calor e conservam a atividade após o tratamento térmico (FITZ-GERALD et al., 1982).

CORSETTI et al. (1998), com a finalidade de acelerar a maturação de queijos, introduziram, durante a fabricação do queijo Pecorino Umbro, extrato citoplasmático de *Pseudomonas fluorescens* e observaram que aumentou a quantidade de peptídeos e aminoácidos no queijo, em especial devido à atividade de aminopeptidases e dipeptidases.

Embora apenas algumas espécies bacterianas sejam adicionadas no processamento de queijos como culturas *starters*, outras podem estar presentes em função de suas enzimas termorresistentes, bem como do próprio ambiente do laticínio, fazendo parte da microbiota do queijo, influenciando o desenvolvimento do sabor e aroma (*flavor*) desses produtos (McSWEENEY et al., 1995). Muitas bactérias não *starter* do ácido láctico (NSLAB) podem ser utilizadas como adjuntos selecionados para acelerar a maturação e/ou intensificação do *flavor* nos queijos (CORSETTI et al., 1998). Um outro aspecto a ser considerado na aparição destas bactérias são as características regionais de cada queijo, principalmente influenciado pela matéria-prima usada na elaboração, criando variações sutis de *flavor* (COGAN e HILL, 1993).

As NSLABs têm sido isoladas e identificadas em diferentes tipos de queijos. WILLIAMS et al. (2000) verificaram que no início do período de maturação do queijo Cheddar a população de lactococos era dominante, devido ao número de células viáveis adicionadas como fermento. No entanto, esta população foi gradativamente sendo substituída pelas bactérias lácticas autóctones, que sobreviveram mais tempo durante a maturação.

Existem determinadas espécies de bactérias autóctones identificadas em diferentes tipos de queijos, como, por exemplo, em queijo Cheddar, onde se constatou a presença de *Lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Pediococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Lb. Rhamnosus* e *L. paracasei* subsp. *paracasei*. No queijo Comté foram encontrados *L. fermentum*, *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp. e *Propionibacterium* sp. No queijo Prato foram encontradas bactérias lácticas termofílicas, *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp. e *Enterococcus* sp. (MORENO et al., 2002). Muitos destes microrganismos são utilizados para acelerar a maturação do queijo, como é o caso dos lactobacilos mesofílicos heterofermentativos *Pediococcus*, *Micrococcus* e *Enterococcus*.

O leite contém todos os compostos necessários à multiplicação bacteriana, mas há limitações no suprimento de aminoácidos essenciais, como ácido glutâmico, metionina, valina, leucina e histidina, necessários à síntese de proteínas. Em virtude disso, as bactérias lácticas dependem de seu sistema proteolítico para atender suas necessidades nutricionais e permitir seu crescimento em meio pobre em aminoácidos livres (MORENO et al., 2002).

Essas NSLABs podem efetuar uma fermentação secundária, por usarem resíduos de lactose, lactato, citrato, peptídeos, aminoácidos, açúcares derivados da caseína, glicerol e/ou por usarem material liberado da autólise das bactérias *starter* após a fermentação primária destas (MARTLEY e CROW, 1993).

Um dos principais fatores que influenciam a proteólise secundária dos queijos está relacionado com a variabilidade de tendência à autólise entre as culturas. Algumas culturas, quando muito autolíticas, podem levar ao aparecimento de defeitos no *flavor*; o ideal seria um equilíbrio entre o número de células intactas e o de células lisadas para uma maturação adequada. Além da predisposição da linhagem, outros fatores que influenciam a autólise são as condições de processamento (aquecimento, pH) e a composição do queijo (NaCl, teor de lactose inicial) (MORENO et al., 2002).

As proteinases e peptidases de culturas secundárias no queijo são particularmente importantes na degradação protéica de algumas variedades. As espécies do gênero *Penicillium* e os microrganismos das superfícies de queijos maturados por mofos produzem proteinases e peptidases extracelulares potentes (GRIPON et al., 1977).

Os mofos possuem um sistema proteolítico que libera peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos. O gênero *Penicillium* possui endopeptidases extracelulares que degradam as caseínas. As exopeptidases (carboxipeptidase ácida, carboxipeptidase alcalina, aminopeptidase alcalina) degradam fortemente os peptídeos presentes e originam aminoácidos. Algumas cepas de *Geotrichum candidum* são ricas em endopeptidases e contribuem para aumentar o nitrogênio solúvel do queijo, tendo ação degradativa sobre os aminoácidos (CHOISY et al., 1987).

A flora do queijo inclui também leveduras, que se multiplicam durante a maturação do queijo e normalmente são os grupos microbianos de evolução mais lenta e com contagens mais altas no final da maturação, principalmente o gênero *Candida*; são capazes, em sua maioria, de assimilar o ácido láctico, contribuindo com isso para elevar o pH (TORNADIJO et al., 1998).

2.5. A proteólise no queijo

A maturação do queijo é um sistema dinâmico que envolve processos químico, bioquímico, microbiológico e enzimático complexo. A proteólise é provavelmente o processo bioquímico mais importante que ocorre durante a fabricação e maturação na maioria das variedades de queijo (PAVIÁ et al., 2000); ela afeta diretamente a textura, o aroma e a intensidade de *flavor* durante o processo de maturação do queijo (FOX et al., 1996).

A proteólise consiste na degradação das proteínas em produtos mais simples e mais solúveis. É um fenômeno bastante complexo, levando em consideração a natureza das proteínas do leite, a variedade da flora e o grande número de enzimas proteolíticas participantes (SOUSA et al., 2001).

Nos queijos de massa dura, a maturação é uma das fases mais importantes no processo produtivo, já que ela está associada com lento e intenso processo proteolítico, com liberação progressiva de polipeptídeos, peptídeos e aminoácidos livres pela ação de enzimas endógenas, exógenas ou da microbiota presente no leite (POMAR et al., 2001b).

Em relação aos fenômenos proteolíticos que acontecem ao longo da maturação do queijo podem-se estabelecer as seguintes diferenciações: a proteólise primária, que compreende as reações responsáveis pela formação de peptídeos de peso molecular intermediário ou alto a partir da caseína, influenciando no desenvolvimento da textura (ROSENBERG et al., 1995); e a proteólise secundária, na qual intervêm as proteases microbianas, originando peptídeos de cadeia curta e aminoácidos, a partir dos quais se formam substâncias aromáticas voláteis e insípidas não-voláteis (RANK, et al., 1985). Numerosas cepas de

Lactococcus e *Lactobacillus* são essenciais para o desenvolvimento da proteólise secundária pela liberação de proteases capazes de hidrolisar as proteínas do leite e peptidases associadas à parede celular, que as convertem em peptídeos (LAW et al., 1993; EXTERKATE et al., 1995).

Na contribuição para o sabor do queijo, a degradação das proteínas pode atuar de maneira direta, com a liberação de aminoácidos e peptídeos, inclusive alguns produzindo sabor amargo, e de maneira indireta, pelo catabolismo de aminoácidos para a formação de aminas, ácidos, tióis, tioésteres, entre outros. As mudanças na textura ocorrem basicamente devido à quebra da matriz protéica, ao aumento do pH e à maior retenção de água pelos recém-formados grupamentos aminos e carboxílicos (POMAR et al., 2001a).

Durante a maturação, os principais componentes protéicos (α_s e β -caseínas) são hidrolisados pelas enzimas fornecidas por bactérias usadas como fermentos, pelas enzimas naturais do leite, pelas enzimas da flora láctica do leite e pelo próprio coalho utilizado na fabricação do queijo. Todos esses efeitos contribuem diretamente para a proteólise do queijo, sendo os responsáveis pelo sabor e pela textura deste durante a maturação (FOX e Mc SWEENEY, 1996; SOUSA et al., 2001).

2.5.1. As frações nitrogenadas no queijo

Substâncias nitrogenadas é o nome de um grupo de compostos complexos, cuja única característica comum é apresentar nitrogênio em sua molécula. Estes compostos são importantes tanto sob o ponto de vista quantitativo como qualitativo (FOX e McSWEENEY, 1996). O método clássico para determinar o grau de proteólise no queijo está baseado na determinação das frações nitrogenadas, como o nitrogênio solúvel, o nitrogênio não-protéico, o nitrogênio amínico e o nitrogênio amoniacal. Estas frações são determinadas durante o processo de maturação de vários tipos de queijo, com o objetivo de verificar a intensidade de solubilização da caseína durante a maturação, mediante o estudo do fracionamento do nitrogênio (PARDO et al., 1996).

As frações nitrogenadas surgem através da degradação das proteínas e estão classificadas em função da precipitação em pH 4,6, considerando-se o nitrogênio solúvel (NS), e em ácido tricloroacético a 12%, considerando-se o nitrogênio não-protéico (NNP). Com base nessa decomposição das frações nitrogenadas do queijo pode-se determinar o grau de extensão e profundidade de maturação do queijo (LENOIR, 1963). Essas frações nitrogenadas são características fundamentais para analisar a proteólise da caseína, em termos de "índice de maturação" (Figura 5) (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989).

A "extensão" da proteólise se caracteriza pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis (NS) acumuladas durante o processo, sendo expressa como percentagem do nitrogênio total ($\text{Extensão} = \frac{\text{Nitrogênio Solúvel}}{\text{Nitrogênio Total}} \times 100$).

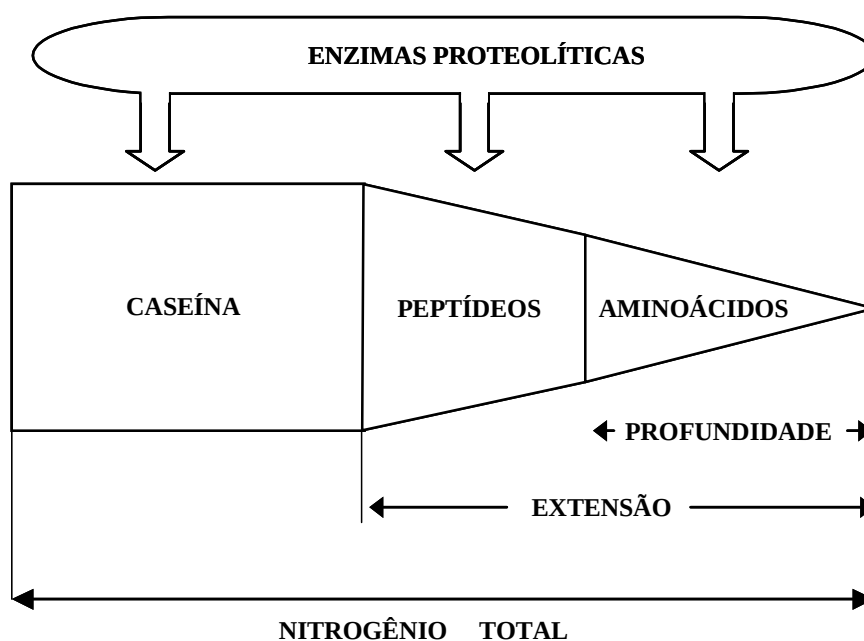
A "profundidade" da proteólise abrange as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, acumuladas durante o processo de proteólise. Compostos característicos são os aminoácidos, oligopeptídeos, aminas, etc. A profundidade pode ser quantificada pelo teor de nitrogênio não-protéico (NNP), solúvel em ácido tricloroacético, ou pela determinação direta dos aminoácidos produzidos, sendo expressa como percentual do nitrogênio total ($\text{Profundidade} = \frac{\text{Nitrogênio Não-Protéico}}{\text{Nitrogênio Total}} \times 100$).

A Figura 3 mostra graficamente como está distribuído o nitrogênio total em função da degradação das proteínas pelas enzimas proteolíticas presentes no queijo ao longo do período de maturação.

PARDO et al. (1996), estudando a proteólise no queijo Manchego, observaram que a relação nitrogênio solúvel/nitrogênio total (extensão) relativa aos polipeptídeos solúveis aumentou ao longo da maturação. Isso se deveu à velocidade de sua formação e foi compensado pela velocidade de sua hidrólise, provavelmente causada pela ação da atividade das aminopeptidases e endopeptidases das bactérias lácticas.

Trabalhos realizados por MENDIA et al. (2000) demonstraram que a época de produção do leite de ovelha influencia o processo de maturação do queijo, bem como o tempo em que estes ficam na câmara de maturação,

apresentando relação diretamente proporcional. A quantidade de NNP/NT aumentou nas amostras coletadas no mês de junho em comparação com as do mês de janeiro, estando isso correlacionado com os resultados da porcentagem de NS/NT. No queijo Idiazábal, elaborado com leite de ovelha, observou-se aumento no conteúdo das frações nitrogenadas, principalmente aumento da fração NS/NT, acompanhado por intensa proteólise, bem como aumento no conteúdo de ácidos graxos livres, indicando lipólise, com o decorrer do tempo de maturação do queijo. Esses fatos estão diretamente relacionados com o período de lactação e com a ação das peptidases das bactérias lácticas, do coalho e também da plasmina (ORDÓÑEZ et al., 1998).



Fonte: WOLFSCHOON-POMBO e LIMA (1989).

Figura 3 – Representação esquemática dos conceitos de extensão e profundidade da proteólise.

2.5.2. A degradação das caseínas

A proteólise primária do queijo pode ser definida como aquela que modifica as α_{s1} , β e γ caseínas e peptídeos e pode ser determinada por

eletroforese-PAGE (RANK et al., 1985), sendo um método eficiente na observação do grau de proteólise do queijo.

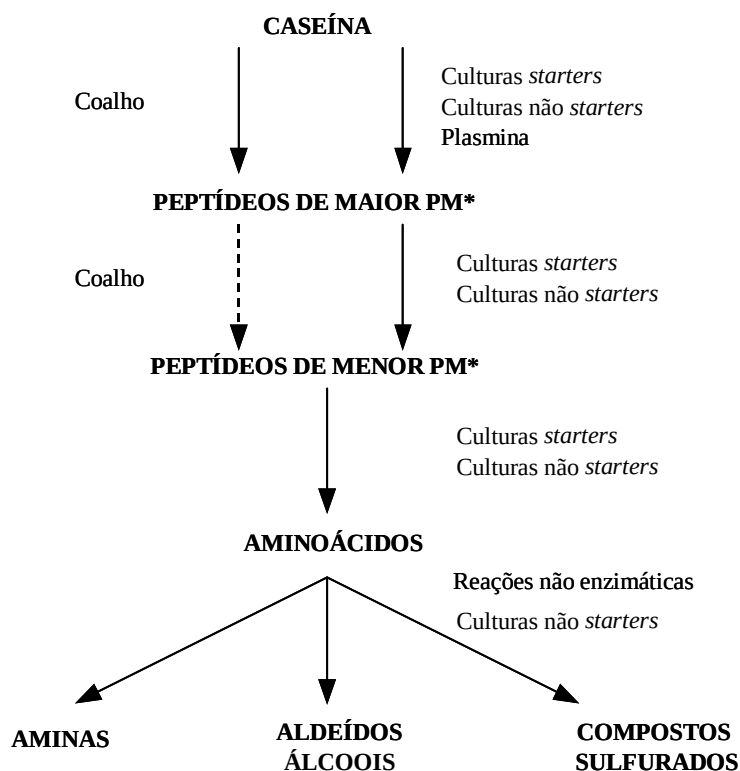
Em estudos de proteólise no queijo Manchego elaborado artesanalmente e/ou industrialmente com leite de ovelha, observou-se, através do perfil eletroforético, que α_s -caseínas se hidrolisaram mais rapidamente e em maior quantidade que as β -caseínas, evidenciando dessa forma que estas últimas são mais resistentes à proteólise durante a primeira fase de maturação (PARDO et al., 1996).

MACEDO et al. (1996) observaram, no queijo Serra da Estrela, que a β -caseína apareceu com menor degradação durante a maturação, enquanto as α_s -caseínas foram rapidamente degradadas. Alguns autores já apontaram a β -caseína como mais resistente à renina animal, em comparação com α_s -caseínas (CHOISY et al., 1987).

As modificações nas frações protéicas do queijo se devem à atividade de diferentes enzimas, cuja procedência pode ser do próprio leite, das bactérias que contaminam o leite, do coalho ou enzima coagulante, das bactérias lácticas ou mesmo da flora secundária (SOUSA et al., 2001). A Figura 4 indica as etapas da degradação das caseínas durante a elaboração e o processo da maturação do queijo.

A degradação das caseínas do queijo durante a maturação, após uma primeira fase caracterizada pelo surgimento de peptídeos de grande e médio peso molecular, prossegue sob a ação das proteases e peptidases de origem microbiana, liberando no meio peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres. Estes últimos compostos desempenham papel importante no aroma do queijo. Portanto, cada variedade de queijo apresenta um perfil característico de aminoácidos livres, os quais são responsáveis pelo seu *flavor* específico (POMAR et al., 2001b).

A γ -caseína, presente em quase todos os tipos de queijo, origina-se a partir da β -caseína por ação da plasmina, a qual apresenta maior ação (FENNEMA, 1996), sendo também ativa sobre a α_{s2} -caseína, e possui menor atividade sobre a α_{s1} -caseína (LE BARS e GRIPON, 1989).



* PM = peso molecular.

Fonte: MENÉNDEZ et al. (1999).

Figura 4 – Fluxograma da degradação da caseína no processo de maturação do queijo.

Trabalhos realizados por TRUJILLO et al. (1993) sobre a plasmina mostram que ela influencia o rendimento e a maturação dos queijos. Suas variações são dependentes do estado de lactação, do estado sanitário do animal, da alimentação, da raça e das espécies de animais. A plasmina se encontra associada às micelas de caseínas, e uma pequena parte encontra-se aderida à membrana do glóbulo de gordura.

Quando o leite é submetido a tratamento térmico, a quantidade de plasmina é aumentada de 30 a 40% devido à inativação dos inibidores do ativador do plasminogênio, que nesse momento se transforma em plasmina. A ação da plasmina sobre as proteínas do leite de vaca ocorre na ordem $\beta > \alpha_s > \kappa$ (FENNEMA, 1996), o mesmo ocorrendo para as proteínas do leite de ovelha (MACEDO e MALCATA, 1997).

A plasmina age de maneira diferente, dependendo do tipo de queijo. No queijo Cheddar, durante a fase de elaboração, ela se associa (em torno de 85 – 90%) às micelas de caseínas, permanecendo apenas de 10 a 15% no soro. A plasmina apresenta maior atividade nos queijos de massa cozida do que naqueles de massa não-cozida, podendo ocorrer diferenças dentro do mesmo tipo de queijo, o que pode ser explicado pelos diferentes leites e pelas diferentes condições de fabricação. Estudos realizados em queijo Cheddar mostraram uma proteólise maior na β -caseína, com concomitante aumento das γ -caseínas; o nível de α_{s1} -caseína se mostrou independente da atividade da plasmina (FARKYE e FOX, 1990).

As enzimas utilizadas na obtenção da coalhada, além da ação coagulante, apresentam ação proteolítica. São endopeptidases que cortam as cadeias no centro e nos extremos das moléculas protéicas, liberando peptídeos e aminoácidos. Por essa razão, o excesso de coalho residual no queijo pode dar origem ao aparecimento de sabores amargos. Os peptídeos assim formados são degradados em aminoácidos, por ação das enzimas microbianas. Por isso, os coalhos de origem microbiana têm atividade maior que os coalhos bovinos e seus efeitos são mais importantes em queijo de massa prensada não-cozida, como Cheddar, em que o tempo de maturação é maior (CHOISY et al., 1987).

O teor de coalho residual e o tipo de coalho utilizado na elaboração de queijos têm papel importante na proteólise (VICENTE et al., 2001). A maior parte do coalho se perde com o soro e, dependendo da quantidade inicial colocada, permanece em torno de 6%. HOLMS et al. (1977) comprovaram que a retenção de quimosina na coalhada é tanto maior quanto menor o pH durante a dessoragem.

O coalho é o agente responsável pela ruptura das ligações Phe₂₃-Phe₂₄ ou Phe₂₄-Val₂₅ da α_{s1} -caseína, originando dessa ação o peptídeo α_{s1} -I-caseína (RICHARDSON e CREAMER, 1976). A quantidade deste peptídeo aumenta durante a maturação do queijo (REVILLE e FOX, 1978). A β -caseína é mais resistente à ação da quimosina, principalmente em consequência da indução de diversos fatores, em especial por um nível de cloreto de sódio, e 10% inibe

totalmente a hidrólise da β -caseína pela enzima do coalho (MULVIHILL e FOX, 1978). A α_{s2} -caseína e a p- κ -caseína também são resistentes ao ataque da quimosina (MENÉNDEZ et al., 1999).

As bactérias lácticas, sejam componentes ou não do fermento, intervêm na proteólise que tem lugar durante a maturação do queijo, utilizando a caseína ou seus produtos como fonte de aminoácidos (SOUSA et al., 2001). Esses microrganismos exercem atividade endopeptidase sobre a β -caseína, atuando também sobre a α_{s1} -caseína e o peptídeo α_{s1} -I-caseína (FOX e McSWEENEY, 1996).

Outros microrganismos que exercem ação proteolítica intensa são os mofo dos gêneros *Penicillium* ou *Geotrichum*, os quais liberam peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos no decorrer da maturação (FOX, 1993). Exoptidases produzidas por leveduras como *Kluyveromyces lactis* e bactérias *Brevibacterium linens*, *Propionibacterium* spp., *Enterococcus* spp. e *Micrococcus* spp. são extremamente proteolíticas, sendo as duas últimas utilizadas para acelerar a maturação de queijos (FOX e McSWEENEY, 1996). Esses microrganismos, quando presentes no leite cru, liberam aminoácidos que estimulam o crescimento de bactérias lácticas (CHOISY et al., 1987).

Em algumas variedades de queijos, as proteases de bactérias psicotróficas, especialmente *Pseudomonas* e *Alcaligenes*, presentes no leite cru, sob refrigeração prolongada, degradam as proteínas quando estão em quantidade superior a 10^5 ufc/ml. Com o tratamento térmico esses microrganismos são destruídos, mas deixam enzimas, proteases já sintetizadas, que podem ser causa de excessiva proteólise, amaciamento excessivo do queijo e sabor amargo nos queijos maturados (DUMAIS et al., 1991). Tem-se comprovado que tratamentos com lactoperoxidase, acrescentando tiocianato e H_2O_2 , ou a adição de CO_2 ao leite são úteis para prevenir esses fenômenos (UCEDA et al., 1994).

Os sabores amargos são originados da acumulação de peptídeos hidrofóbicos procedentes da hidrólise das caseínas. A β -caseína é a que mostra uma estrutura primária com maior hidrofobicidade (FENNEMA, 1996). Alguns autores opinam que os peptídeos amargos são formados fundamentalmente pela ação do coalho residual e de endopeptidases bacterianas sobre a β -caseína.

GONZÁLEZ de LLANO et al. (1995) encontraram correlação negativa entre quantidades de peptídeos hidrófobos e o nitrogênio amínico no queijo.

Conforme MENÉNDEZ et al. (1999), em geral, a aparição de peptídeos amargos nos queijos pode ser atribuída ao emprego do coalho com elevada atividade proteolítica inespecífica; ao emprego de coagulantes microbianos, geralmente de origem fúngica, com alta atividade sobre β -caseína; à utilização de preparados enzimáticos contendo enzimas proteolíticas destinadas a acelerar a maturação; e ao uso de bactérias lácticas ou outros microrganismos altamente proteolíticos no queijo.

Os peptídeos amargos podem ser degradados como consequência da ação das peptidases específicas, geralmente provenientes de bactérias lácticas presentes nos fermentos ou acrescentadas de maneira diversa nas preparações. Têm sido utilizados lactococos Prot- (deficientes em proteases de parede, mas com as mesmas peptidases que o cultivo-mãe) com a finalidade de evitar o aparecimento de sabores amargos e melhorar o rendimento (RICHARDSON et al., 1983).

Segundo FRESNO BARO (2000), as enzimas coagulantes utilizadas na fabricação do queijo são fundamentais na proteólise, pois, dependendo do tipo de coalho empregado, exercem ação característica, dependendo serem estas enzimas de origem animal (estômago de bezerro, carneiro, etc.), microbiana (*Bacillus subtilis*, *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Chryphonectria parasitica*, etc.), vegetal (*Cynara cardunculus*, *Ficus carica*, *Carica papaya*), obtidas por engenharia genética ou recombinantes (genes de quimosina clonada em bactérias, fungos ou leveduras).

ROA et al. (1997), ao estudarem os efeitos tecnológicos na elaboração do queijo de leite de ovelha La Serena, utilizando coagulante vegetal de *Cynara cardunculus*, verificaram degradação muito rápida de α_{s1} -caseína, comparada à β -caseína. Trabalhos recentes têm mostrado o emprego de enzimas encapsuladas, geralmente em lipossomos, com o objetivo de acelerar a maturação de queijos. Com essa técnica é possível incrementar a degradação das caseínas α_{s1} e β -caseínas, obtendo queijos mais macios, melhorando o aroma e evitando o defeito

do sabor amargo (PICÓN et al., 1994). Esta metodologia é pouco usada, devido aos elevados custos na elaboração.

O desenvolvimento da textura está intimamente relacionado com o grau de proteólise que o queijo apresenta. De acordo com LAWRENCE et al. (1987), com 7 a 14 dias de maturação a textura elástica da coalhada origina um produto mais suave e homogêneo. Durante este período, cerca de 20% da α_{s1} -caseína é hidrolisada pelo coalho, para converter-se em peptídeo α_{s1} -I-caseína (CREAMER e OLSON, 1982). Em uma segunda fase são produzidas modificações mais intensas na textura, à medida que o resto de α_{s1} -caseína e outras frações caseínicas são degradados (LAW e HANSEN, 1997).

Tem-se observado relação inversa entre a relação sal/umidade e a hidrólise das α_{s1} e β -caseínas e outros índices de proteólise, o que pode ser atribuído ao estado de hidratação da proteína (FOX et al., 1996). Em queijos salgados em salmoura, em que a difusão do sal desde a casca até o interior ocorre de maneira progressiva, o grau de proteólise é menor no interior do queijo, quando comparado com a superfície (FURTADO, 1996).

2.5.3. Aminoácidos no queijo

A evolução dos aminoácidos no processo de maturação dos queijos se deve à hidrólise dos peptídeos por atividade das aminopeptidases dos fermentos lácticos e de outras bactérias provenientes da flora secundária. Os aminoácidos constituintes das caseínas vão sendo liberados e servindo de sustento a transaminases, desaminases e descarboxilases, para transformar-se em aminoácidos livres, aminas, aldeídos e outros compostos (VISSER, 1993). Estes aminoácidos livres influenciam as características organolépticas dos queijos durante a maturação, sendo atribuído ao conjunto de aminoácidos totais o aroma de fundo desses queijos (PARDO et al., 1996).

Estudos realizados por POMAR et al. (2001b), tanto na parte externa como na interna do queijo Zamorano DOP, mostraram que os aminoácidos foram incrementando significativamente ao longo da maturação (até 240 dias), sendo

mais importante o aumento na porção interna, com valores finais de 3,9% dos sólidos totais.

Conforme estudos realizados por MENDIA et al. (2000) em queijo Idiazábal elaborado com leite de ovelha, os aminoácidos que apresentaram em maior quantidade durante o período de maturação, em análise feita no mês de janeiro a junho, foram o ácido glutâmico, a ornitina, ácido aspártico e a prolina.

Mudanças no conteúdo de aminoácidos livres foram estudadas durante a maturação do queijo Idiazábal por influência do tipo de coalho e tipo de cultura láctica utilizada. Foram utilizados dois tipos de coalho de carneiro (comercial e artesanal), com e sem adição de cultura láctica. Foi demonstrado que o tipo de coalho influenciou a proteólise do queijo, uma vez que um alto teor de aminoácidos livres foi encontrado principalmente naqueles queijos elaborados com coalho de carneiro obtido comercialmente. Foram encontrados 24 aminoácidos; leucina, ácido glutâmico, valina e fenilalanina apresentaram maior conteúdo durante a maturação (180 dias).

MENÉNDEZ et al. (1999) afirmam que os peptídeos e os aminoácidos são os principais responsáveis pelo aroma e sabor dos queijos. Em particular, parece ser a transformação química ou enzimática dos aminoácidos que determina os efeitos positivos na maturação e no aroma do queijo (STEELE e ÜNLÜ, 1991; FOX e McSWEENEY, 1996).

A produção de amônia e aminas procedente da descarboxilação dos aminoácidos originados pela proteólise é muito importante na constituição de aroma de certas variedades de queijo. Os compostos sulfurados, que caracterizam o sabor do queijo Cheddar, procedem da degradação do metanotiol, ou de seu precursor, a metionina (FOX e McSWEENEY, 1996). Os aminoácidos, os ácidos graxos e os compostos carboxílicos são os principais responsáveis pelo aroma do queijo. Entre estes últimos se encontram os aldeídos, compostos transitórios no queijo, pois são degradados rapidamente a álcool ou a seus ácidos correspondentes, que são responsáveis pelo sabor de frutos nos queijos (MOLIMARD e SPINNLER, 1996). O aroma e o sabor particular de cada queijo estão relacionados com a conversão de um número limitado de aminoácidos (VISSER, 1993).

2.6. Maturação acelerada

O *flavor* e a textura típicos do queijo são influenciados pelo tipo de leite (vaca, ovelha, cabra) e pelos complexos processos bioquímicos em desenvolvimento durante a maturação, envolvendo enzimas naturais do leite, coagulantes, microrganismos *starter* e não *starter* (CORSETTI et al., 1998).

A maioria dos tipos de queijo, incluindo as variedades duras, requer muito tempo de cura e, conseqüentemente, melhor controle das condições de maturação, tornando-se um processo oneroso. Dessa forma, a aceleração da maturação pode representar benefício econômico, além de preservar o *flavor* e as qualidades do produto final (CORSETTI et al., 1998).

Existe ampla literatura sobre maturação acelerada de queijos de vaca (EL SODA, 1993; EL-SHAFEI, 1994; KANAWJIA et al., 1995; PICÓN et al., 1996; RODRIGUEZ et al., 1996; CORSETTI et al., 1998; JOHNSON, 1998). Os métodos normalmente empregados na aceleração da maturação incluem adição de enzimas exógenas, adição de culturas lácticas modificadas, adição de bactérias não-láticas, adição de pasta de queijos maturados e elevação da temperatura.

A maioria dos estudos da aceleração da maturação tem envolvido queijo Cheddar (ASTON et al., 1985; FEDRICK e DULEY, 1984; FOX et al., 1996), mas também outros tipos de queijos têm sido estudados, como o Ras (ABDEL BAKI et al., 1982), Gouda (BARTTELS et al., 1987) Suíço (SINGH e KRISTOFFERSEN, 1971), queijo italiano Grana (SCOLARI e BOTAZI, 1983) e Pecorino Umbro (CORSETTI et al., 1998), queijo elaborado com leite de ovelha Feta (VATOPOULOU et al., 1989) e Manchego (GAYA et al., 1990; NÚÑEZ et al., 1991).

Cada um desses métodos apresenta vantagens e desvantagens, as quais são discutidas por EL SODA (1997). As enzimas exógenas são relativamente baratas, sua ação é muito específica e permitem potencializar grande variedade de aromas no queijo. No entanto, sua utilização está limitada, devido ao risco de supermaturação, além da dificuldade de sua incorporação no queijo de maneira homogênea e da possível proibição por barreiras legais.

As culturas lácticas modificadas são fáceis de ser incorporadas à massa do queijo e proporcionam bons resultados. O maior inconveniente é que as técnicas de modificação são bastante complexas. A utilização de cultivos de bactérias lácticas não *starter* (NSLAB) tem grandes possibilidades no futuro, mas no momento está limitada, pela falta de disponibilidade de cepas adequadas (JOHNSON, 1998).

A adição de pasta de queijos (*slurries*) não tem proporcionado até o momento resultados muito satisfatórios, já que não se consegue obter queijos com características sensoriais similares às daqueles elaborados por sistemas tradicionais (KOSIKOWSKI, 1977).

O aumento da temperatura de maturação é o método mais simples e econômico para acelerar os processos bioquímicos que ocorrem durante esse período e apresenta a vantagem adicional de não incorporar nenhum agente externo ao queijo. Os maiores problemas enfrentados são possíveis alterações microbianas e, sobretudo, dificuldades em controlar as reações não-específicas que podem ocorrer durante a maturação, alterando a qualidade final do queijo (ASTON et al., 1985).

A maturação acelerada mediante temperaturas elevadas tem sido estudada com bastante frequência em queijo Cheddar (FEDRICK et al., 1983; FEDRICK e DULLEY, 1984; ASTON et al., 1985; CROMIE et al., 1987; GUINEE et al., 1991; FOLKERTMA et al., 1996). As conclusões obtidas a partir deste estudo são que, além de aumentar a proteólise, ela influencia a microflora, a textura e a intensidade do aroma, podendo-se estabelecer uma faixa máxima de temperatura de maturação, acima da qual começam a ocorrer problemas. Em estudos realizados sobre outras variedades de queijo, como Manchego (NÚÑEZ et al., 1986, 1991; GAYA et al., 1990), os resultados obtidos são semelhantes. A aceleração da maturação por temperatura controlada é uma alternativa interessante e acessível, que poderá possibilitar redução nos custos de produção de queijos.

2.6.1. Influência da temperatura na maturação acelerada

Os queijos apresentam tempo de maturação que varia de acordo com cada tipo, podendo ser de quatro semanas, como alguns queijos Camembert, até quatro anos, como alguns queijos muito duros, como o Parmesão (EL SODA, 1997). O *flavor* do queijo aumenta com o aumento dos períodos de maturação. Quanto maior o tempo de maturação do queijo Cheddar, maior sua proteólise e maior o seu *flavor*. Isso ocorre em virtude da degradação de proteínas e lipídeos que ocorrem no queijo ao longo da maturação (WILKINSON, 1993).

É durante a maturação que as características de cada espécie bacteriana podem ser desenvolvidas. Durante a maturação, as condições de temperatura e umidade devem ser controladas, a fim de promover o desenvolvimento da flora microbiana e de reações enzimáticas responsáveis pelas mudanças bioquímicas que ocorrem no queijo durante a maturação. Como regra geral, o controle da temperatura da maioria dos queijos se encontra entre 4 e 12 °C e a umidade relativa é de 80 a 90% (EL SODA, 1997), podendo, com a aceleração da maturação, esta temperatura ser elevada até 20 °C (FEDRICK e DULLEY, 1984; FOLKERTMA et al., 1996).

O aumento da temperatura da câmara de maturação dos queijos apresenta-se como um método simples e econômico para acelerar os processos bioquímicos que ocorrem durante a maturação, tendo ainda a vantagem de não apresentar custos adicionais, reduzir os custos de refrigeração e não incorporar agentes estranhos à fabricação (EL SODA, 1993, 1997; IZCO et al., 1999).

A temperatura tem efeito tanto na proteólise quanto na lipólise (FERNÁNDEZ GARCIA e LÓPEZ-FANDIÑO, 1994). Todas as reações que ocorrem nos queijos com o aumento da temperatura não acontecem de maneira uniforme e dependem muito da qualidade de matéria-prima utilizada na elaboração, podendo muitas vezes dar lugar a aromas e sabores estranhos, devido ao crescimento de microrganismos indesejáveis (EL SODA, 1993).

LAW et al. (1979) observaram que o aumento na temperatura de maturação de 6 °C por 48 semanas para 13 °C por 24 semanas proporcionou aumento

de 50% na produção do *flavor* do queijo Cheddar. O escore na escala sensorial para os queijos maturados a 13 °C foi de 4,4, numa escala de 0 a 8, para intensidade do *flavor*, ao passo que para os queijos estocados a 6 °C o escore foi de 3,2, correspondendo a um *flavor* moderado. As degradações de peptídeos amargos por peptidases não foram favorecidas nessas temperaturas, mas sabe-se que a presença de sabores indesejáveis pode ocorrer quando combinados tempo e temperaturas elevadas (IZCO et al., 1999).

ASTON et al. (1985), em intensivos estudos com diferentes temperaturas de maturação, concluíram que à temperatura de 15 °C o queijo pode permanecer estocado por 32 semanas sem redução de suas qualidades características, mas foi observado um aroma atípico no queijo Cheddar submetido à temperatura de 17,5 °C durante 32 semanas. Altas temperaturas de maturação não melhoraram a qualidade do aroma e do sabor, porém aumentaram a intensidade do *flavor* (IZCO et al., 1999).

Em concordância com outros autores, ASTON et al. (1983) encontraram correlação positiva entre o nitrogênio amínico e os valores para *flavor* em queijo Cheddar, sem conseqüências adversas para a sua qualidade. A produção de compostos sulfurados voláteis foi monitorada durante seis meses, observando-se aumento na intensidade do *flavor*. A proteólise mais notável em nitrogênio amínico ocorreu com os queijos submetidos a 20 °C por quatro semanas e, a seguir, mantidos a 13 °C por 28 semanas, quando comparados com os queijos mantidos a 8 °C por 32 semanas. NÚÑEZ et al. (1991) utilizaram altas temperaturas para maturação do queijo Manchego, junto com a adição de enzimas proteases, e constataram aumento no índice de proteólise, bem como pronunciado aroma durante a maturação.

Estudos realizados por ASTON et al. (1985) indicaram que os queijos submetidos à maturação de 15 °C por 12 semanas foram similares aos queijos maturados a 8 °C após 32 semanas. Segundo FEDRICK et al. (1983), o tempo de redução de maturação por aumento de temperatura foi reduzido à metade quando os queijos foram submetidos à temperatura de 15 °C.

Existe pouca informação na literatura sobre a aceleração da maturação de queijos de leite de ovelha. O queijo de leite de ovelha Manchego DOP está entre os poucos queijos que foram avaliados quanto à aceleração da maturação por aumento na temperatura, sendo observada extensa proteólise no queijo pelo aumento de temperatura. Observou-se extensa proteólise no queijo quando submetido à temperatura de maturação a 16 °C por quatro meses, expressa pelos altos teores de nitrogênio solúvel, nitrogênio não-protéico e frações amínicas. Foi observada também extensa proteólise em razão da degradação das frações α_{s1} e β -caseínas, que no início da maturação apresentaram teores de 43,2 e 27,2%, respectivamente; após quatro meses de maturação os teores apresentados foram de 17,5 e 19,5%, respectivamente (GAYA et al., 1990).

A aceleração da maturação por aumento na temperatura de maturação não favorece apenas os microrganismos do fermento; pode favorecer também o crescimento de outras espécies de bactérias e, portanto, alterar a qualidade do produto final (GARCIA, 1986). Este método apresenta vantagens no sentido de não apresentar barreiras legais e ser economicamente viável (EL SODA, 1993), obtendo resposta rápida para a demanda do mercado consumidor (ASTON et al., 1983; FEDRICK et al., 1983).

2.7. Características reológicas do queijo

2.7.1. Conceitos básicos

A reologia é uma ciência que tem a finalidade de estudar a estrutura dos alimentos, em resposta a uma força ou deformação aplicada (RAO, 1977; SHOEMAKER et al., 1992). A deformação diz respeito aos materiais sólidos, como é o caso dos queijos semiduros e duros (RAPACCI et al., 1998).

O estudo das propriedades reológicas dos produtos derivados do leite é importante como método de controle do processo de fabricação, a fim de garantir a manutenção da estrutura física e química do corpo do queijo durante a estocagem (CAMPOS, 1989; SHOEMAKER et al., 1992).

A textura dos alimentos é uma característica multidimensional formada por um conjunto de sensações táteis, visuais e auditivas, podendo ser definida como o conjunto de sensações físico-mecânicas percebidas durante a manipulação e mastigação dos alimentos (BOURNE, 1978; GUERREIRO, 1993). Tem por princípio básico estudar a estrutura dos alimentos, em resposta a uma força ou deformação aplicada (SHOEMAKER et al., 1992). A textura é uma propriedade que exerce papel fundamental na qualidade do produto final (BOURNE, 1978).

Os estudos da reologia há muitos anos ficaram confinados a métodos empíricos (BOURNE, 1978). Nos últimos anos, muitos tecnólogos de alimentos preferem os métodos fundamentais, que são determinados rigorosamente e descritos por equações (BOURNE, 1993), ou os métodos imitativos, que é um dos métodos mais utilizados na atualidade, que pode ser realizado através da Análise do Perfil da Textura (TPA), utilizando o texturômetro Texture Profile Analyser TA-XT2 – Stable Micro Systems (FRAU et al., 2000).

2.7.2. Parâmetros da textura

Conforme observado no Quadro 6, os parâmetros utilizados no TPA são bem definidos (BOURNE, 1978). Este método tenta imitar, através de instrumentos, o comportamento do alimento na boca, possuindo excelentes correlações com a análise sensorial (FEDRICK e DULLEY, 1984; FRAU et al., 2000). Esta técnica foi usada pela primeira vez por BOURNE (1978) e aplicada em alimentos por SZCZESNIAK (1983) e BREENE (1975).

Os parâmetros de textura utilizados na avaliação das propriedades reológicas para estudo do perfil da textura são: dureza, elasticidade, coesividade, adesividade, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade (BOURNE, 1978; SZCZESNIAK, 1983; CAMPOS, 1989; TUNICK e NOLAN, 1992; GIESE, 1995), que podem ser definidos conforme mostrado no Quadro 3 e na Figura 5.

A dureza, elasticidade e fraturabilidade são os parâmetros mais estudados na aplicação da TPA como método instrumental, para avaliar o perfil da textura, na aceleração da maturação, especialmente do queijo Cheddar (LAW et al., 1979;

LAWRENCE et al., 1987), e também na avaliação da aceleração da temperatura por modificações na temperatura de estocagem (ASTON et al., 1983; FEDRICK e DULLEY, 1984; NÚÑEZ et al., 1991).

Quadro 3 – Principais parâmetros de textura e suas definições

Parâmetros de textura	Definições
Dureza	É a força necessária para ocasionar uma compressão no alimento, correspondente ao pico máximo (positivo), obtido no primeiro ciclo de compressão.
Adesividade	É a força necessária para vencer as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície do elemento da prova, correspondendo ao pico máximo (negativo) existente sobre a primeira e a segunda curva.
Elasticidade	É dado como a altura que o alimento recupera entre o primeiro e o segundo pico de compressão.
Coesividade	É a relação entre a área da força (positiva) obtida durante o segundo pico de compressão e a área da força (positiva) obtida no primeiro ciclo de compressão ($A2/A1$).
Fraturabilidade	É a força num primeiro pico significativo na curva do ciclo de compressão.
Gomosidade	É o produto da firmeza e coesividade.
Mastigabilidade	É o produto da elasticidade e gomosidade

Fonte: RAPACCI et al. (1998).

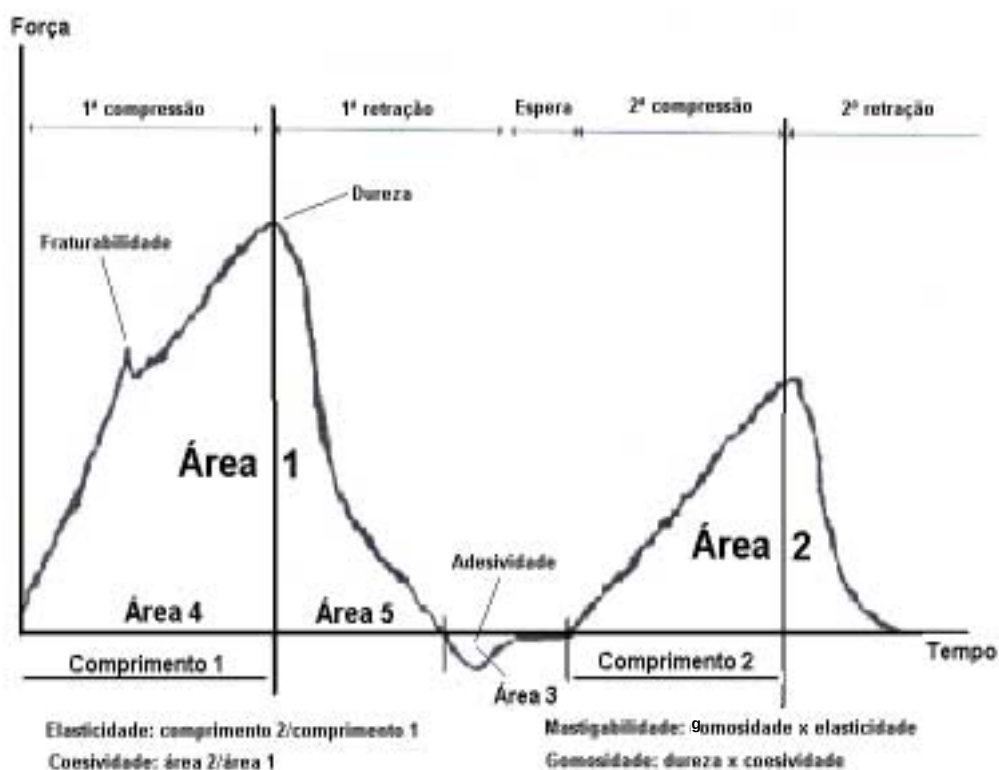


Figura 5 – Gráfico do perfil de textura (TPA) para sete parâmetros.

Segundo SZCZESNIAK (1963), as características que representam a textura podem ser de ordem mecânica, relativo à reação do alimento frente à tensão; características geométricas, que dependem do tamanho, da forma e da orientação das partículas dentro do alimento; e outras características, que podem ser relativas à umidade e ao conteúdo de gordura.

A análise das curvas faz com que se obtenha os valores dos sete parâmetros de textura, dos quais cinco (fraturabilidade, dureza, coesividade, adesividade e elasticidade) são obtidos através dos valores das curvas e duas (gomosidade e mastigabilidade) são calculados a partir dos cinco parâmetros iniciais (FRAU et al., 2000). Estes registros gráficos indicam a relação da força/tempo ou força/distância. As duas curvas da TPA indicam o comportamento do alimento, simulando a primeira e a segunda mordida do alimento na boca, e ambos apresentam picos e áreas característicos para cada parâmetro analisado (BOURNE, 1978; VAN-VLIET, 1991; RAPACCI et al., 1998).

O Texturômetro Analyser TA-XT2 é o equipamento mais usado mundialmente para indicar o perfil da textura dos alimentos. Este equipamento fornece medidas de compressão, tanto de distância como de força, variáveis em função do modelo aplicado. Os valores obtidos são calculados utilizando-se *softwares* especiais específicos do aparelho, que fazem a integração das curvas proporcionando a interpretação dos resultados (TEXTURE TECHNOLOGIES CORP., 1992).

Considerações são especificadas de acordo com as medidas em função do tempo e a força por unidade de área. A deformação ocorre em função do tamanho ou espessura do corpo, em resposta a uma força aplicada. É um parâmetro adimensional, sempre relacionando a espessura ou o tamanho original (SZCZESNIAK, 1983; GIESE, 1995). O parâmetro adimensional é a força, enquanto a velocidade e a distância permanecem constantes.

O TPA se fundamenta basicamente na utilização de três tipos de pressão: compressão, aplicada perpendicularmente contra a superfície do material; tensão, estiramento do material; e cisalhamento, aplicado de forma tangencial ao material.

O texturômetro TA-XT2 apresenta cinco elementos que são fundamentais para o funcionamento do aparelho: utiliza um mecanismo de condução do sensor que pode variar desde um simples peso até um sofisticado condutor elétrico variável motorizado ou hidráulico; um elemento de prova (lâmina de corte, sonda, entre outros), que entra em contato com o alimento; uma força aplicada tanto vertical como horizontalmente ou tangencialmente, que corta, perfura, pontua, comprime, tritura, cisalha ou tensiona a amostra; um elemento sensitivo; e um *display*, que mostra os resultados das medidas (SZCZESNIAK, 1983).

2.8. Análise sensorial

2.8.1. Importância da análise sensorial

A análise sensorial se baseia na avaliação subjetiva das observações relacionadas com aparência, odor, textura e sabor (MODESTA, 1994). A utilização correta da tecnologia sensorial disponível leva à obtenção de resultados reprodutivos, com precisão e exatidão comparáveis às dos métodos denominados objetivos (CHAVES, 1996).

A análise sensorial é uma medida multidimensional e apresenta três vantagens importantes: identifica a presença ou ausência de diferenças perceptíveis; identifica e quantifica as características sensoriais importantes de forma rápida; e identifica problemas particulares que não poderiam ser detectados por outros procedimentos analíticos (PENNA et al., 2002).

A análise sensorial pode ser realizada sob vários aspectos por métodos específicos de avaliações descritivas, discriminantes e afetivas, dependendo da situação e natureza do produto (MODESTA, 1994).

Segundo a Sensory Evaluation Division do Instituto of Food Technologists - IFT (1981), a análise sensorial pode ser aplicada para: desenvolvimento de novo produto, reprodução do produto, melhoramento do produto, alteração de processo, redução de custos e/ou seleção de nova fonte de suprimento, controle de qualidade, estabilidade de armazenamento, avaliação do nível de qualidade do produto, aceitação do consumidor, seleção de provadores e

treinamento e correlação da avaliação sensorial de qualidade com medidas químicas e físicas.

Os objetivos definidos dentro da empresa para as descrições sensoriais são de máximo interesse para posicionar objetivamente os queijos no mercado, e para esse trabalho de caracterização é necessário dispor de técnicas de avaliação reproduzíveis das características peculiares de cada tipo de queijo (ELORTONDO et al., 2000).

2.8.2. Parâmetros sensoriais

Vários aspectos podem ser analisados nos parâmetros sensoriais. Através da visão é possível constatar a aparência externa dos alimentos. O sabor imprime os diferentes paladares obtidos diretamente ao se degustá-los. O aroma explica a sensação que o indivíduo experimenta ao colocar o alimento em contato com as células olfativas. O sabor, juntamente com o aroma, resulta no *flavor*. A textura é um fator indispensável na qualidade do alimento, assim como o *flavor*, especialmente em queijos maturados.

A visão está intimamente relacionada a determinados aspectos, como cor, superfície, tamanho e forma. No caso de queijos, a intensidade da cor, o tamanho e número de olhos são importantes variáveis que podem dar informações mais específicas, como tempo de maturação, tipo de microrganismos, contaminações e alterações diversas, entre outras (ELORTONDO et al., 2000).

A visão é extremamente importante na análise sensorial, pois as primeiras impressões dos alimentos estão relacionadas à aparência geral (MORALES, 1994), o que pode ser considerado uma expectativa do consumidor com relação ao sabor, levando a atitudes de aceitação, indiferença ou rejeição do alimento avaliado (TEIXEIRA et al., 1987).

Para avaliação sensorial de queijos, os principais aspectos envolvidos são aparência, textura e sabor (PENNA et al., 2000), porém o aroma é um aspecto importante a ser avaliado, principalmente em queijos duros e semiduros, em que o processo de proteólise durante a maturação é responsável pelo *flavor* do queijo (LAVANCHY et al., 1993; PENNA et al., 2000).

O odor é a sensação produzida ao se estimular o sentido do olfato. O olfato é o mais sensível dos sentidos e possui maior poder de discriminação que o gosto (AMERINE et al., 1965). O odor é a sensação percebida por células receptoras olfativas quando estimuladas por substâncias voláteis, e o aroma é a sensação que se percebe por meio das células receptoras olfativas quando estimuladas por substâncias voláteis que passam pela boca (CHAVES, 1996). Os odores podem atrair ou repelir os consumidores, assumindo assim grande importância na aceitação de vários produtos alimentícios, uma vez que eles podem indicar a qualidade do produto, assim como a sanidade deste (MODESTA, 1994).

O odor e o aroma permitem diferenciar determinados tipos de alimentos e avaliar uma série de variáveis, caracterizando-os (CHAVES, 1996). O parâmetro sabor deve ser muito bem trabalhado pelos degustadores que fazem parte da equipe selecionada para realizar a análise sensorial (MORALES, 1994).

Quando um alimento é tocado ou sentido com a boca, procede-se à avaliação sensorial de sua textura de forma mais significativa do que por meio dos sentidos da visão e da audição. Quando um alimento não apresenta uma textura esperada, percebida por terminações nervosas sensitivas, ele é conseqüentemente rejeitado (TEIXEIRA et al., 1987). A avaliação das propriedades da textura não tem apenas a finalidade de indicar as características do produto final, mas de servir também como ferramenta do controle de qualidade da matéria-prima ou do produto em vários estágios do processamento (MODESTA, 1994).

O gosto é percebido pelos órgãos gustativos assim que é estimulado por substâncias presentes no alimento (PENNA et al., 2002). Os gostos ou sensações gustativas fundamentais considerados na grande maioria são quatro: o ácido (azedo), o doce, o salgado e o amargo. Muitos estudos consideram que os demais gostos observados em alimentos são resultantes de combinações desses gostos primários (TEIXEIRA et al., 1987). Estudos recentes sugerem a existência de um quinto gosto básico, conhecido como umami (FUKE e UEDA, 1996).

2.8.3. Análise sensorial em queijos

A análise sensorial está sendo utilizada cada vez mais no setor de alimentos (BARCINA, 1997). Os resultados de sua correta utilização podem permitir a qualquer empresa de alimentos melhorar a qualidade de seus produtos, especialmente no setor da indústria de queijos de Denominação de Origem Protegida (DOP) (ELORTONDO et al., 2000).

A análise sensorial é muito importante para avaliar o *flavor* e a textura de queijos de massa dura ou semidura (LAVANCHY et al., 1993; PENNA et al., 2002). É muito utilizada na caracterização sensorial, em estudos de mercados e no controle de qualidade em diferentes tipos de queijo (ELORTONDO et al., 2000).

Segundo PENNA et al. (2002), uma equipe foi formada para estudar a análise sensorial de queijos, com o objetivo de melhorar a uniformidade no treinamento do painel sensorial, através de um método descritivo ETANA, auxiliando na caracterização dos queijos de DOP, entre eles o Comté (França), o Parmigiano Regiano e o Fontina (Itália), o Mahón (Espanha) e o Appenzeller (Suíça).

As reações bioquímicas que ocorrem no queijo são devidas a vários fatores, quais sejam as enzimas presentes no leite, as enzimas do coalho, a ação de microrganismos presentes na massa do queijo e os componentes do leite, como proteína, gordura, lactose e citrato, todos eles influenciando o desenvolvimento do *flavor* do queijo (ORTIGOSA et al., 2001).

A época de lactação influi decisivamente no *flavor*. Estudos indicam que queijos Idiazábal, elaborados com leite de ovelha, produzidos com leite de ordenha de junho, oferecem maior *score* para sabor amargo, e os melhores resultados foram obtidos com queijos produzidos com o leite de lactação de fevereiro (MENDIA et al., 2000).

ORTIGOSA et al. (2001) verificaram que queijos Roncal elaborados com leite de ovelha cru apresentaram maior intensidade no *flavor* do que aqueles elaborados com leite pasteurizado, quando submetidos ao painel de degustadores.

Isso se deve ao fato de que, com a pasteurização, muito dos microrganismos presentes na flora nativa do leite foram eliminados.

O decréscimo de alguns aminoácidos foi constatado durante a maturação do queijo quando elaborado com leite pasteurizado, principalmente Val e Leu, sendo estes responsáveis pela produção de 2-metilpropanol-1 e 3- metilbutanol-1 (MENDIA et al., 2000), o mesmo acontecendo com os níveis de propanol-1, álcool derivado do metabolismo da metionina (COLLIN et al., 1993).

Os aminoácidos e peptídeos liberados durante a maturação contribuem diretamente para o *flavor*. Certos aminoácidos são extremamente importantes no desenvolvimento do *flavor*, como, por exemplo, a Arg, que pode estar associada a sabores amargos no queijo, enquanto Pro, Ser e Asn têm sido relatados como produtores de sabor doce no queijo (IZCO et al., 2000).

A maturação acelerada do queijo Manchego a 20 °C, através da adição de enzimas exógenas, afetou negativamente a qualidade sensorial do queijo (NÚÑEZ et al., 1986), ao passo que queijos maturados a 16 °C obtiveram pontuação ligeiramente mais alta que os controles a 8 °C (GAYA et al., 1990).

2.8.4. Análise descritiva (ADQ)

A Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) representa a mais sofisticada das metodologias de avaliação sensorial, comparada com métodos descritivos e afetivos (MODESTA, 1994), uma vez que descreve quantitativa e qualitativamente atributos de aparência, sabor, aroma e textura, em conjunto, de um alimento (CHAVES, 1996).

A análise é bastante trabalhosa e dispendiosa. Há necessidade de provadores treinados, devendo estes possuir poder de discriminação, reproducibilidade em seus resultados e coerência com os demais membros da equipe (STONE et al., 1974). A ADQ é recomendada para desenvolvimento de novos produtos, a fim de estabelecer diferenças entre amostras ou produtos; para controle de qualidade, para correlacionar dados sensoriais com dados instrumentais; e para o próprio treinamento de julgadores (TEIXEIRA et al., 1987).

As amostras em estudo, codificadas, são apresentadas aos provadores, uma de cada vez, seguindo a metodologia adequada que cada caso requer. A avaliação do nível de qualidade do produto requer uma classificação da amostra de acordo com o tipo e os padrões definidos para o produto, avaliando-se a amostra sempre em relação a uma já conhecida. Este método pode ser usado durante a produção, distribuição e comercialização, a fim de garantir que o produto final seja tão bom quanto o padrão (MODESTA, 1994).

2.8.5. Tendências da análise estatística para análise sensorial

Um exercício de avaliação sensorial é necessariamente um experimento. Nos experimentos, os dados e as informações estatísticas são indispensáveis para que se consiga um consenso dos resultados. Os especialistas em análises sensoriais devem contribuir com as interpretações, indicando as razões e formas de atuações com base nesses resultados (MODESTA, 1994).

Para que os objetivos da análise sensoriais se cumpram é importante planejar bem o trabalho experimental, bem como aplicar metodologias adequadas para a análise estatística dos resultados. Atualmente muitos trabalhos aplicados em análise sensorial têm mostrado novas tendências para análise estatística dos resultados. Muitos autores têm aplicado em estudos sensoriais a análise multivariada, que permite uma avaliação mais abrangente dos resultados obtidos, sem perder informações importantes. Dentre estas técnicas se destacam a aplicação de análise dos componentes principais, análise discriminante, análise de *cluster* (análise de agrupamento), análise de fator, métodos de superfície e resposta e mapas de preferência interno e externo (RESSURECIÓN, 1988).

A análise discriminante é um tipo de análise em que, em primeiro lugar, se calculam as funções canônicas, isto é, as combinações lineares das variáveis originais que melhor diferenciam os grupos existentes, de maneira que cada grupo aparece caracterizado com um espaço multidimensional por um conjunto de funções canônicas, o que permite a classificação de grupos “desconhecidos” em grupos previamente definidos (BÁRCENAS et al., 2000). As pontuações

discriminantes são calculadas para cada grupo. A análise discriminante é utilizada para estudos em diversas variedades de queijos, para análises físico-químicas, evolução da maturação, estudo da matéria-prima, para desenvolver produtos similares, assim como para classificar as amostras de queijo de acordo com os parâmetros sensoriais e instrumentais (BÁRCENAS et al., 2000; CHAPMAN et al., 2001).

A análise descritiva quantitativa permite que seja realizada a análise do componente principal, que consiste em avaliar os resultados obtidos, através de programas estatísticos, o que possibilitará sugerir os atributos responsáveis pela maior ou menor variação dos produtos, dados pelos vetores projetados pelos atributos sobre os eixos definidos estatisticamente (BÁRCENAS et al., 2000). O primeiro componente será responsável pela maior variância e o segundo pela segunda variância, e assim sucessivamente, até que toda a variância seja envolvida. Na prática, o pesquisador pode determinar o limite do número de componentes estudados (RESSURECIÓN, 1988).

A análise de *cluster* é um descritor geral para procedimentos nos quais variáveis ou casos com medidas similares são agrupados em *cluster* ou subgrupos. As variáveis assim associadas estão altamente associadas entre si (RESSURECIÓN, 1988). Avalia-se o número de variáveis independentes envolvidas na análise em função dessas variáveis, procurando agrupar as respostas obtidas das amostras, de acordo com a sua similaridade. A similaridade entre as amostras pode existir em função de fatores particulares, que não são evidentes nas pontuações atribuídas (RESSURECIÓN, 1988).

A análise de fator é uma técnica que está sendo atualmente muito aplicada na redução dos dados e simplificação em estudo de qualidade de alimentos. Consiste na redução de um grande número de variáveis a um conjunto de variáveis menores, chamadas fator. Cada fator, neste grupo reduzido, é altamente correlacionado com um subgrupo de variáveis inter-relacionadas. O objetivo desta metodologia é encontrar um pequeno número de fatores que, juntos, possam substituir as variáveis originais medidas no experimento (RESSURECIÓN, 1988; BÁRCENAS et al., 2000; CHAPMAN et al., 2001).

O mapa de preferências é outra metodologia aplicada para comparar as preferências e relacioná-las com as características sensoriais do produto. Este mapeamento auxilia na segmentação do mercado em grupos definidos de consumidores. Consiste essencialmente de uma representação gráfica (multidimensional scaling-MDS) das diferenças de aceitação entre amostras, que permite a identificação de cada indivíduo e suas preferências com relação às amostras analisadas (BÁRCENAS et al., 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL BAKI, A.A.; EL FAK, A.M.; RABIE, A.M.; EL NESHEWY, A.A. Cheese slurry in acceleration of Cephalotyre Ras cheese ripening. **Journal of Food Protection**, 45:894-897, 1982.
2. AMERINE, A.; PANGBORN, R.M.; ROESSLER, E.B. **Principles of Sensory Evaluation of Food**, Academic Press Inc., 1965. 602p.
3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS – ABIQ. **Produção brasileira de produtos lácteos em estabelecimentos sob inspeção federal**. Anuário Milkbiz- São Paulo, 2001.
4. ASTON, J.W; GRIEVE, P.A; DURWARD, I.G.; DULLEY, J.R. Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese subjected to accelerated ripening treatments. **The Australian Journal of Dairy Technology**, 38: 59-65, 1983.
5. ASTON, J.W.; GILES, J.E.; DURWARD, I.G.; DULLEY, J.R. Effect of elevated temperature on proteolysis and flavor development in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, 52:565-572, 1985.
6. BÁRCENAS, P.; ELORTONDO, F.J.P; SALMERÓN, J.; ALBISU, M. Development of a preliminary sensory lexicon and standard references for ewes milk cheeses aided by multivariant statistical procedures. **Journal of Sensorial Studies**, 14:161-179, 1999.
7. BÁRCENAS, P.; PÉREZ F.J.; SALMERÓN, J.; ALBISU, M. Tratamiento estadístico de datos sensoriales. **Alimentación, equipos y tecnología**, 6:59-65, 2000.
8. BARCINA, Y.; IBÁÑEZ, F.G.; ORDÓÑEZ, A.I. Evolution of free amino acids during Idiazabal cheese ripening. **Food Control**, 6:161-164, 1995.
9. BARTTELS, H.J.; JOHNSON, M.E; OLSON, N.F. Accelerated ripening of Gouda cheese. 2. Effect of freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavour development. **Milchwissenschaft**, 42:139-146, 1987.
10. BOURNE, M. C. Texture Profile Analysis. **Food Technology**, Chicago, 32(7):62-72, 1978.
11. BROOME, M.C.; KRAUSE, D.A.; HICKEY, M.W. The use of non-starter lactobacilli in Cheddar cheese manufacture. **The Australian Journal of Dairy Technology**. 45:67-73, 1990.
12. BHOWMIL, T.; MARTH, E.H. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. **Journal of Dairy Science**, 73:859-866, 1990.
13. CAMPOS, S.D. Metodologia objetiva para avaliação de parâmetros de textura. In: CAMPOS, S.D. **Reologia e Textura de Alimentos**. Campinas: ITAL, p.43-59, 1989 (Manual Técnico)
14. CARBALLO, J.; FRESNO, J.M.; TUERO, J.R.; PRIETO, J.G.; BERNARDO, A.; MARTÍN-SARMIENTO, R. Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish hard goat cheese. **Food Chemistry**, 49:77-82, 1994.
15. CARRASCO DE MENDOZA, M.; SCARINCI, H.E.; GARAT, M.H.; SIMONETTA, A.C. Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. **Microbiologie – Aliments - Nutrition**, 10:289-293, 1992.
16. CHAPMAN, K.W.; LAWLESS, H.T.; BOOR K.J. Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultrapasteurized milk. **Journal of Dairy Science**, 84:12-20, 2001.

17. CHAVES, J.B.P. **Análise sensorial: histórico e desenvolvimento**. Cadernos didáticos nº327; Imprensa Universitária, UFV- Viçosa, MG, 1996.
18. CHOISY, C.; DESMAZEAUD, M.J.; GRIPON, J.C.; LAMBERET, G.; LENOIR, J.; TOURNEUR, C. Os fenômenos microbiológicos e enzimáticos e a bioquímica da cura (Afinação). In: ECK, A. **O queijo**. 1.ed., Vol.1. 1987. 337p.
19. COGAN T.M.; HILL, C. Cheese Starter Cultures. In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. V.1, 2.ed. Chapman and Hall, London, United kingdom, 1993. 599p.
20. COLLIN, S.; OSMAN, M.; DELCAMBRE, S.; EL ZAYAT, A.Y.; DUFOUR, J.P. Investigation of volatile flavor compounds in fresh and ripened Domiati cheeses. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 41:1659-1663, 1993.
21. COLLINS, EB. Symposium on lactic starter cultures I. Culture identity and selection. **Journal of Dairy Science**., 45:1263-1266, 1962.
22. CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; SMACCHI, E.; DE ANGELIS, M.; ROSSI, J. Accelerated ripening of Pecorino Umbro cheese. **Journal of Dairy Research**, 65:631-642, 1998.
23. CREAMER, L.K.; OLSON, N.F. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. **Journal of Food Science**, 47:631-646, 1982.
24. CROMIE, S.J.; GILES, J.E.; DULLEY, J.R. Effect of elevated ripening temperatures on the microflora of Cheddar cheese. **Journal Dairy Research**., 54:69-76, 1987.
25. DESMAZEAUD, M.J.; GRIPON, J.C.; LE BARS, D.; BERGERE, J.L. Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes. **Lait**, 56:379-396, 1976.
26. DUMAIS, R.; BLAIS J.A.; CONRAD, F. Queso. In AMIOT, J. **Ciencia y Tecnología de la Leche**, 1991, 547p.
27. EL SODA, M. Control and enhancement of flavour in cheese. In: LAW, B.A. **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Blackie Academic & Professional, New York. p. 219-246. 1997.
28. EL SODA, M. Accelerated maturation of cheese. **International Dairy Journal**, 3:531-544, 1993.
29. ELORTONDO. F.J.P.; BÁRCENAS, E.P.; ALBISU, A.M. Analisis sensorial en quesos con denominación de origen. **Alimentaria**, 155:165-167, 2000.
30. EL-SHAFEI, H. Accelerated ripening of Ras cheese using cell free extract, freeze- and heat-shocked *Leuconostoc* spp. Cultures. **Nahrung**, 38:599-603, 1994.
31. EXTERKATE, F.A. Location of peptidases outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. **Applied and Environmental Microbiology**, 47:177-183, 1984.
32. EXTERKATE, F.A., ALTING, A.C.; SLANGEN, C.J. Conversion of α_{s1} -casein-(24-199)-fragment and β -casein under cheese conditions by chymosin and starter peptidases. **Systematic and Applied Microbiology**, 18:7-12, 1995.
33. FARKYE, N.Y.; FOX, P.F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science and Technology**, 1:37-40, 1990.
34. FEDRICK, I.A.; DULLEY, J.R. The effect of elevated storage temperatures on the rheology of Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, 19:191-195, 1984.
35. FEDRICK, I.A.; ASTON, J.W.; DURWARD, L.G.; DULLEY, J.R. The effect of elevated ripening temperatures on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, 18:253-260, 1983.

36. FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, Espanha. 2.edição, 1996, 1095p.
37. FERREIRA, C.L.L.F. **Produtos Lácteos Fermentados (Aspectos Bioquímicos e Tecnológicos)**. Editora UFV, Nº 43, Viçosa, MG, 2001, 112p.
38. FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Accelerated ripening of ewe's milk cheeses. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos**, 34: 353-367, 1994.
39. FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ALONSO, L.; RAMOS, M. The use of lipolytic and proteolytic enzymes in the manufacture of Manchego type cheese from ovine and bovine milk. **Journal of Dairy Science**, 77:2139-2149, 1994.
40. FITZ-GERALD, C.H.; DEETH, H.C.; COGHILL, D.M. Low temperature inactivation of lipases from psychrotrophic bacteria. **The Australian Journal Dairy Technology**, 37:51-54, 1982.
41. FOLKERTMA, B.; FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. **International Dairy Journal**, 6:1117-1134, 1996.
42. FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. Proteolysis in cheese during ripening. **Food Reviews International**, 12:457-509, 1996.
43. FOX, P.F.; WALLACE, J.M.; MORGAN, S.; LYNCH, C.M.; NILAND, E.J.; TOBIN, J. Acceleration of cheese ripening. **Antoine Van Leeuwenhook**, 70:271-297, 1996.
44. FRAU, M.; CAÑELLAS, B.; SÁNCHEZ, E.; ROSSELLÓ, C. Las propiedades texturales del queso y su papel en la industria láctea. **Alimentaria**, Marzo, nº.5:55-59, 2000.
45. FOX, P.F. Cheese and overview. In: FOX, P.F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. Vol.1. New York, Chapman and hall, p.523-555, 1993.
46. FOX, P.F.; LAW, J.; MCSWEENEY, P.L.H.; WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P.F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**, Vol.1. New York, Chapman and hall, p.523-555, 1993.
47. FRANK, J.F.; MARTH, E.H. Fermentations. In WONG, N.P. **Fundamentals of dairy chemistry**. 3.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, cap.13, p.655-738, 1988.
48. FRAU, M.; SIMAL, S.; FEMENIA, A.; ROSELLO, C. Application of principal component analysis to chemical characteristics of Mahón cheese. **Zeinschrift Lebensmittel-und Forschung**, 205:429-432, 1997.
49. FRESNO BARO, J.M. Controles de producto en la fabricación de quesos. Comunicação pessoal, Universidad de León. España. 2000.
50. FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E.; CARBALLO, J.; GONZÁLEZ-PRIETO, J.; BERNARDO, A. Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish craft goat's milk cheese (Armada variety). **Food Chemistry**, 55:225-230, 1996.
51. FUERTES, J.A.; GONZALO, C.; CARRIEDO, J.A.; SAN PRIMITIVO, F. Parameters of test day milk yield and milk components for dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, 81:1300-1307, 1998.
52. FURTADO, M.M. Enfoque Práctico Acerca de Ciertos Parámetros Tecnológicos en la Fabricación de Quesos, y su Efecto en la Fermentación, Textura y Sabor. **Congreso Internacional de tecnología en Producción de Quesos**. Buenos Aires, FEPALE/ CHR. HANSEN 1996. 273 p.
53. FUKE, S.; UEDA, Y. Interactions between umami and other flavour characteristics. **Trends in Food Science and Technology**, 7: 407-411, 1996.

54. GARCIA, E.F. Maduración acelerada del queso. Nuevas tendencias. **Alimentación Equipos y Tecnología**, julio-agosto, p.53-63, 1986.
55. GAYA, P.; MEDINA, M.; RODRIGUEZ-MARÍN, M.A.; NÚÑEZ, M. Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: the effect of elevated ripening temperatures. **Journal of Dairy Science**, 73:26-32, 1990.
56. GIESE, J. Measuring physical properties of foods. **Food Technology**, Chicago, **49**(2):54-63, 1995.
57. GONZÁLEZ, J.; MAS, M.; LÓPEZ GALLEGO, F. Características de la leche de oveja merina y del queso La Serena producidos en tres tipo de explotaciones. **Revista Investigaciones Agrícolas: Producción Sanidad Animal**, 2:143-155, 1991.
58. GRIPON, J.C. Flavour and texture in soft cheese. In: LAW, B.A. **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Blackie academic & Professional, 2.ed., 1997.
59. GRIPON, J.C.; DESMAZEAUD, M.J.; LE BARS, D.; BERGERE, J.I. Role of proteolytic enzymes of *Streptococcus lactis*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium caseicolum* during cheese repening. **Journal of Dairy Science**, 60:1532-1538, 1977.
60. GUINEE, T.P; WILKINSON, M.O.; MULHOLLAND, E.O.; FOX, P.F. Influence of ripening temperature, added commercial enzyme preparations and attenuated mutant (lac-) *Lactococcus lactis* starter on the proteolysis and maturation of Cheddar cheese. **Irish Journal of Food Science and Technology**, 15:27-52, 1991.
61. GARCÍA DE FERNANDO, G.D.; FOX, P.F. Extracellular proteinases from *Micrococcus* GF:II. Isolation and characterization. **Lait**, 71:371-382, 1991.
62. GARCÍA DE FERNANDO, G.D.; SANZ, B.; ASENSIO, M.A.; ORDÓÑEZ, J.A. Effect of extracellular proteinase of *E. Faecalis* subsp. *liquefaciens* on protein breakdown in cheese. **Milchwissenschaft**, 47: 420-422, 1992.
63. GARCIA, E.F. Maduración acelerada del queso. Nuevas tendencias. **Alimentación, Equipos y Tecnología**, Julio/agosto, p.53-63, 1986.
64. GARCÍA-PALMER, F.J.; SERRA, N.; PALAU, A.; GIANOTTI, M. Free amino acids as indices of mahón cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, 80:1908-1917, 1997.
65. GIBBS, P.A. Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium Supplement, 51S-58S, 1987.
66. GONZÁLEZ de LLANO, D.; POLO, M.C.; RAMOS, M. Study of proteolysis in artisanal cheeses: high performance liquid chromatography of peptides. **Journal of Dairy Science**, 78:1018-1024, 1995.
67. IBÁÑEZ, F.C; TORRES, M.I.; ORDÓÑEZ, A.I.; BARCINA, Y. Changes in physicochemical properties and in content of nitrogen compounds with traditional smoking during the ripening of Idiazabal cheese. **Netherlands Milk Dairy Journal**, 49:167-175, 1995.
68. HARPER, W.J.; CARMONA DE CATRIL, A.; CHEN, J.L. Esterases of lactic streptococci and their stability in cheese slurry systems. **Milchwissenschaft**, 35:129-135, 1980.
69. HOLMS, D.G.; DUERSCH J.N.; ERNSTRON C.A. Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during Cheddar cheese making. **Journal of Dairy Science**, 60: 862-869, 1977.
70. IZCO, J.M.; TORRE, P.; BARCINA, Y. Maduración Acelerada de los Quesos: Revisión. **Alimentaria**, 135:135-144, 1999.

71. IZCO, J.M.; TORRE, P.; BARCINA, Y. Effect of added enzymes on the free amino acids and sensory characteristics in Ossau-Iraty Cheese. **Food Control**, 11:201-207, 2000.
72. JOHNSON, M.E. Cheese products. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 1998.
73. KALANTZOPOULOS, G.C. Cheeses from ewes' and goats' milk. In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. V.2, 2.ed. Chapman and Hall, London, United Kingdom, 1993. 577p.
74. KAMALY K.M.; MARTH, E.H. Enzyme activities of lactic streptococci and their role in maturation of cheese: a review. **Journal of Dairy Science**, 72:1945-1966, 1989.
75. KAMALY, K.M.; TAKAYAMA, K.; MARTH, E.H. Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* and their mutants. **Journal of Dairy Science**, 73:280-290, 1990.
76. KANAWJIA, S.K.; RAJESH, P.; LATHA, S.; SINGH, S. Flavour, chemical and textural profile changes in accelerated ripened Gouda cheese. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, 28:577-583, 1995.
77. LAW, B.A.; HANSEN, E.B. Classification and identification of bacteria important in the manufacture of cheese. In: LAW, B.A. **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Blackie Academic & Professional, New York p. 219-246, 1997.
78. LAW, B.A.; HOSKING, Z.D.; CHAPMAN, H.R. The effect of some manufacturing conditions on the development of flavour in Cheddar cheese. **Journal Society of Dairy Technology**, 32:87-90, 1979.
79. LAW, B.A.; KOLSTAD, J. Proteolysis systems in lactic acid bacteria. **Antonie Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, 49:225-245, 1983.
80. LAW, B.A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. V.1, e V.2, 2.ed. Chapman and Hall, London, United Kingdom, 1993.
81. LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.C.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, 70:1748-1760, 1987.
82. LAVANCHY, P.; BERODIER, F.; ZANNONI, M.; NOEL, Y.; ADAMO, C.; SQUELLA, J.; HERRERO, L. L'évaluation sensorielle de la texture des fromages à pâte dure ou semi-dure. Etude interlaboratoires. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, 26:59-68, 1993.
83. LENOIR, J. Note sur la composition en matières azotées des fromages afines de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. **Annals Technologie Agriculture**, 12:51-57, 1963.
84. LUQUET, F.M. **O Leite: do úbere a fábrica de laticínios**, Vol. 1. Publicações Europa-América, Ltda Portugal, 1985, 447p.
85. KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods**. 2.ed. Ann Arbor: Edwards brothers, 1977. 711p.
86. LAWRENCE, R.C.; THOMAS, T.D.; TERZAGHI, B.E. Cheese starters. **Journal of Dairy Research**, 141:163-170, 1976.
87. LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Microbiological study of White-brined cheese made from raw goat milk. **Food Microbiology**, 55:111-113, 1992.
88. MACEDO, A.C.; COSTA, M.L.; MALCATA, F.X. Assessment of proteolysis and lipolysis in Serra cheese: effects of axial cheese location, ripening time and lactation season. **Lait**, 76:363-370, 1996.

89. MACEDO, A.C.; MALCATA, F.X. Hydrolysis of α_s and β -caseins during ripening of Serra cheese. **Food Chemistry**, 58:43-48, 1997.
90. MAPA Ordem de 6 de mayo de 1993 por la que se aprueba el reglamento de la denominación de origen "Queso Zamorano" y de su Consejo Regulador. **BOE. Nº120 de 20 de mayo de 1993**, p.15311-15316, 1993.
91. MAPA **Anuario de Estadística Agraria**. Ed. Secretaría General Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, 1997.
92. MARTÍN-HERNÁNDEZ, M.C.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M. Biochemical characteristics of three types of goat cheese. **Journal of Dairy Science**, 75:1747-1752, 1992.
93. MARTLEY, F.G.; CROW, V.L. Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. **International Dairy Journal**, 3:461-483, 1993.
94. Mc SWEENEY, P.L.H; FOX, P.F.; OLSON, N.F. Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: Preliminary observations and comparison with chymosin. **International Dairy Journal**, 5:321-336, 1995.
95. MENDIA, C.; IBÁÑEZ, F. C.; TORRE, P.; BARCINA, Y. Influence of the season on proteolysis and sensory characteristics of Idiazabal Cheese. **Journal of Dairy Science**, 83:1899-1904, 2000.
96. MENÉNDEZ, S.; GODINEZ, R.; RODRÍGUEZ-OTERO, J.L.; CENTENO, J.A. Fenómenos bioquímicos durante la maduración del queso. **Alimentación, Equipos y Tecnología**, Julio/Agosto, 1999. p.97-105.
97. MILLÁN, R.; ALCALÁ, M.; SANJUAN, E.; PENEDO, J.C.; CASTELO, M. Componentes fisicoquímicos y nitrogenados del queso Roncal. **Alimentación, Equipos y Tecnología**, julio/agosto, p.61-64, 1992.
98. MODESTA, R.C.D. **Manual de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Tomo I – Geral, EMBRAPA, C.T.A.A., R. J., 1994.
99. MOLIMARD, P.; SPINNLER, H.E.A Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheese: origins and properties. **Journal of Dairy Science**, 79:169-184, 1996.
100. MORALES, A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica**. Zaragoza, España, Editorial Acribia, 1994.
101. MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A.L.S.; DESTRO, M.T. A importância da microbiota adicionada e autóctone na maturação de queijos prato. **Indústria de Laticínios**, 39:59-62, 2002.
102. MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. Proteolysis of bovine β -casein by chymosin influence of pH, urea and sodium chloride. **Irish Journal of Food Science and Technology**, 2:135-139, 1978.
103. NÚÑEZ, M.; GARCÍA-ASER, C.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M.A.; MEDINA, M.; GAYA, P. The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipólisis in manchego cheese. **Food Chemistry**, 21:115-123, 1986.
104. NÚÑEZ, M.; GUILLÉN, A.M.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M.A.; MARCILLA, A.M.; GAYA, P.; MEDINA, M. Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: the effect of neutral proteinases. **Journal of Dairy Science**, 74:4108-4118, 1991.
105. OLIVEIRA, J.S. de. **Queijo: fundamentos tecnológicos**, Campinas: Ícone, 1986. 146p.
106. OLSON, N.F. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. **FEMS Microbiology Reviews**, 87:131-148, 1990.

107. ORDÓÑEZ, A.I.; IBÁÑEZ, F.C.; TORRE, P.; BARCINA, Y. Characterization of the casein hydrolysis of Idiazábal cheese manufactured from ovine milk. **Journal of Dairy Science**, 81:2089-2095, 1998.
108. ORTIGOSA, P.; TORRE, P.; IZCO, J.M. Effect of Pasteurization of Ewe's Milk and Use of a Native Starter Culture on the Volatile Components and Sensory Characteristics of Roncal cheese. **Journal of Dairy Science**, 84:1320-1330, 2001.
109. PARDO, J.E.; PEREZ, J.I.; GOMEZ, R.; TARDAGUILA, J.; MARTÍNEZ, M.; SERRANO, C.E. Review: physico-chemical quality of Manchego cheese. **Alimentaria**, 281:81-82, 1996.
110. PAVIÁ, M.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Proteolysis in Manchego-type-cheese salted by brine vacuum impregnation. **Journal of Dairy Science**, 83:1441-1447, 2000.
111. PENNA, A.L.B.; HOFFMANN, F.L.; BOZZETTI, V. Sensorial evaluation of cheese using the Etana model. Anais do XIX congresso Nacional de Laticínios, **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, 2002.
112. PICÓN, A.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NÚÑEZ, M. The effect of liposome encapsulation of chymosin derived by fermentation on Manchego cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, 77:16-23, 1994.
113. PICÓN, A.; SERRANO, C.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NÚÑEZ, M. The effect of liposome encapsulated cyprosin on Manchego cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, 79:1699-1705, 1996.
114. POMAR, E.; PABLOS, A.; TORNADIJO, M.E.; FRESNO, J.M.; GONZÁLEZ, J. Estudo da proteólise do Queso Zamorano (D.O.). **Journal of Dairy Science**, **Anais do Congresso**, Porto, Portugal, maio de 2001a.
115. POMAR, E.; PRIETO, B.; FRANCO, I.; TORNADIJO, M.E.; FRESNO, J.M.; GONZÁLEZ, J. Caracterización química y físico-química del queso Zamorano con Denominación de Origen. **Anais do Congresso**, Porto, Portugal, maio de 2001b.
116. RANK, T.C.; GRAPPIN, R.; OLSON, N.F. Secondary proteolysis of cheese during ripening: A review. **Journal of Dairy Science**, 68:801-807, 1985.
117. RAO, M.A. Rheology of liquid foods a review. **Journal of Texture Studies**, 8:135-168, 1977.
118. RAPACCI, M.; CAMPOS, S.D.S.; VAN DENDER, A.G.F. Requeijão Cremoso-Avaliação do Perfil de Textura. **Revista Indústria de Laticínios – Ano 3**, n.18, Nov/dez, 1998.
119. RAPINI, L.S.; FEIJO, L.D.; VERAS, J.F.; NASCIMENTO, K.F.; AMADO, J.B.; COUTO, I.P. Assesment of *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Listeria* sp and *Staphylococcus* sp and detection of staphylococcal enterotoxin in "coalho" type cheese. Anais do XIX Congresso Nacional de Laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, 57:60-65, 2002.
120. RESSURECIÓN, A.V.A. Applications of multivariate analysis methods in food quality evaluation. **Food Technology**, Nov., 1988.
121. REVILLE, W.J.; FOX, P.F. Soluble protein in Cheddar cheese: a comparison of analytical methods. **International Journal of Food Science and Technology**, 2:167-175, 1978.
122. RIVEMALE, M. **Comunic. Inter.** Lak. Société des Caves, Roquefort, 1982.
123. RICHARDSON, B.C.; CREAMER, L.K. Comparative micelle structure. V. The isolation and characterization of the major ovine caseins. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, 11:6-53, 1976.

124. RICHARDSON, G.H.; ERNSTROM, C.A.; KIM, J.M.; DALY, C. Proteinase negative variants of *Streptococcus cremoris* for cheese starters. **Journal of Dairy Science**, 66:2278-2286, 1983.
125. ROA, I.; MENDIOLA, F.J.; GONZÁLEZ, J.; MAS, M. Effect of technological innovation in manufacture of La Serena cheese. **Alimentaria**, 285:45-49, 1997.
126. ROA, I.; LÓPEZ, M.B.; MENDIOLA, F.J. Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. **Food Research International**, 32:413-419, 1999.
127. RODRÍGUEZ, J.; REQUENA, T.; GOUDEDRANCHE, H.; MAUBOIS, J.L.; JUÁREZ, M. Accelerated ripening of reduced fat semi-hard cheese from a mixture of cow's, goat's and ewe's ultrafiltered milk by using a Lac- Prt-strain of lactococci. **Lait**, 76:513-522, 1996.
128. ROSENBERG, M.; WANG, Z.; CHUANG, S.L.; SHOEMAKER, C.F. Viscoelastic property changes in Cheddar cheese during ripening. **Journal of Food Science**, 60:640-644, 1995.
129. SAN FRANCISCO, C.; COBOS, J.R. **El queso Zamorano**. Ed. Patronato de Turismo – Diputación de Zamora, Zorca, 1995, 49p.
130. SCOLARI, G.L.; BOTTAZZI, V. Accelerated ripening and new views in dairy production. II. Effect on Grana cheese slurries of addition of enzymic extract from lactic acid bacteria. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, 34:159-164, 1983.
131. SENSORY EVALUATION DIVISION OF THE INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS (IFT). Evaluation guide for testing food and beverage products. **Food Technology**, Chicago, v.11, 1981.
132. SERRANO, C.E.; GARCÍA, C.; MEDINA, L.M.; SERRANO, E. Physicochemical study of Manchego cheese with denomination of origin. **Alimentaria**, 281:81-82, 1997.
133. SHOEMAKER, C.F.; NANTZ, J.; BONNANS, S.; NOBLE, A.C. Rheological characterization of dairy products. **Food Technology**, 46:98-104, 1992.
134. SOUSA, M.J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, 11:327-345, 2001.
135. SZCZESNIAK, A.S. Classification of textural characteristics. **Journal of Food Science**, 28:385-389, 1963.
136. SZCZESNIAK, A.S. Physical properties of food: what they are and their relation to other food properties. In: PELEG, M.; BAGLEY, E.B. Westport, AVI, Inc., 1983, 42p.
137. SINGH, V.K.; KRISTOFFERSEN, T. Accelerated ripening of Swiss cheese curd. **Journal of Dairy Science**, 54:349-354, 1971.
138. SMID, E.J.; POOLMAN, B.; KONING, W.N. Casein utilization by lactococci. **Applied and Environmental Microbiology**, 57:2447-2452, 1991.
139. STEELE, J.L.; ÜNLÜ, G. Impact of lactic acid bacteria on cheese flavor development. **Food Technology**, p 128-135, november, 1991.
140. STONE, H.; SIDEL, J.L.; OLIVER, S.; WOOLSEY, A.; SINGLETON, R.C. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology**, p.24-34, nov., 1974.
141. TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.M.; BARBETTA, P.A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis, Sc: Editora da UFSC, 1987. 180p.
142. TEXTURE TECHNOLOGIES CORP. Texture analyzer application study of TA-XT2 Key Features. New York, 1992. (Catálogo).

143. TORNADIJO, M.E.; FRESNO J.M.; MARTÍN SARMIENTO, R.; CARBALLO, J. Study of yeast during the ripening process of Armada cheese from raw goat's milk. **Latí**, 78:647-659, 1998.
144. TRUJILLO, A.J.; FELIPE, X.; GUAMIS, B.; CARRETERO, C. Influencia de la proteasa alcalina de la leche (Plasmina) durante el madurado del queso. Métodos de cuantificación. **Revista Española de Lechería**, Marzo/Abril, 1993.
145. TUNICK, M.H.; NOLAN, E.J. Rheology of cheese. In: BAIANU, I.C. **Physical chemistry of Food Processes: Fundamental Aspects**, vol. 1. Van Nostrand Reinhold, New York, p.273-297, 1992.
146. UCEDA, R.; PICÓN, A.; GUILLÉN, A.M.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NÚÑEZ, M. Characteristics of Manchego cheese manufacture from ewe raw milk preserved by addition of carbon dioxide or by activation of lactoperoxidase system. **Milchwissenschaft**, 49:678-683, 1994.
147. VAN VLIET, T. Terminology to be used in cheese rheology. **Bulletin of the International Dairy Federation**. Brussels, 268:5-15, 1991.
148. VARNAM A.H.; SUTHERLAND J.P. **Milk and Milk Products: Technology, Chemistry and Microbiology**. Editora Chapman & Hall, 1.ed., 1994, 415p.
149. VATOPOULOU, A.; ALICHANIDIS, E.; ZERFIRIDIS, G. Accelerated ripening of Feta cheese, with heat-shocked cultures or microbial proteinases. **Journal of Dairy Research**, 56:285-296, 1989.
150. VICENTE, M.S.; IBÁÑEZ, F.C.; BARCINA, Y.; BARRON, L.J.R. Changes in the free amino acid content during ripening of Idiazábal cheese: influence of starter and rennet type. **Food Chemistry**, 72:309-317, 2001.
151. VIEIRA, G.V.N.; SANTOS, V.T. **Criação de ovinos e suas enfermidades**. Edições Melhoramento, São Paulo, 1967, 479 p.
152. VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. **Journal of Dairy Science**, 76:329-350, 1993.
153. WILKINSON, M.G. Acceleration of cheese ripening. In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. Vol.1. New York, Chapman and Hall, p.523-555, 1993.
154. WILLIAMS, A.G.; WITHERS, S.E.; BANKS, J.M. Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, 10:17-23, 2000.
155. WOLFSCHOON-POMBO, A.F.W.; LIMA, A. de. Extensão e profundidade de proteólise em queijos Minas Frescal. **Revista do Instituto Laticínios "Cândido Tostes"**, 44: 261-266, 1989.

CAPÍTULO 1

EVOLUÇÃO DA FLORA MICROBIANA DO QUEIJO ZAMORANO DOP SOB CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO ACELERADA

RESUMO

O queijo Zamorano com DOP, inscrito desde 1993 no Conselho Regulador de Denominação de Origem, é elaborado na província de Zamora, Junta de Castilla e León, Espanha, obtido a partir de leite pasteurizado de ovelhas das raças Churra e/ou Castellana, de massa prensada, de forma cilíndrica, com dimensões de 18 a 22 cm de diâmetro por 8 a 12 cm de altura e com peso de aproximadamente 4 kg. O objetivo deste trabalho foi estudar a evolução da microbiota do queijo Zamorano DOP durante um período de 180 dias de maturação, no qual os queijos foram expostos a diferentes temperaturas, visando a aceleração do processo de maturação. Os queijos elaborados foram submetidos a cinco controles de temperatura de maturação (A, B, C, D e E), sendo: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias. Os queijos foram analisados quanto à contagem total de mesófilos, lactococos, lactobacilos, micrococos, enterococos, enterobactérias, mofos e leveduras. A contagem total de mesófilos foi similar em todos os controles de temperatura durante os dois primeiros meses de maturação (10^8 ufc/g), decrescendo a partir daí até o final do período avaliado. As contagens de lactococos em M17 se mantiveram constantes em todos os controles de temperatura (10^6 ufc/g) durante os dois primeiros meses, diminuindo em um ciclo logarítmico para o controle de temperatura A, dois ciclos para os controles B e C e três ciclos para D e E após os dois seguintes meses de maturação (120 dias). No final da maturação (180 dias), comparando aos 60 dias de maturação, observou-se decréscimo da flora mesófilos totais na

contagem de três ciclos log para os controles de temperatura A e C e de quatro ciclos log para os controles de temperatura B e D. Para o controle de temperatura E, observou-se decréscimo de cinco ciclos log na contagem. As contagens de lactobacilos foram possíveis após os 15 dias de maturação e foram diferentes entre os controles de temperatura A, B e C, pois aos 60 dias, os queijos apresentaram-se com 10^4 ufc/g, e os queijos armazenados sob os controles de temperatura D e E, nesse mesmo período, possuíram 10^7 ufc/g; no final da maturação (180 dias), os queijos submetidos aos controles de temperatura A e C mantiveram-se praticamente constantes, o controle de temperatura B aumentou um ciclo e os queijos armazenados sob controles de temperatura D e E diminuíram um ciclo logarítmico. Micrococos e enterococos foram observados unicamente nos queijos armazenados sob os controles de temperatura D e E, apresentando 10^3 e 10^2 ufc/g, respectivamente, durante o primeiro mês de maturação, desaparecendo a partir desse momento. Não foram observadas contagens de mofo e leveduras nos queijos submetidos aos diferentes controles de temperatura. As contagens de enterobactérias foram similares em todos os queijos examinados nos diferentes controles de temperatura, apresentando contagem de 10^3 ufc/g até o primeiro mês de maturação, desaparecendo logo no seguinte, com exceção dos controles de temperatura B e C, que apresentaram decréscimo de um ciclo log até os 60 dias, desaparecendo nos meses subsequentes de maturação.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Zamorano é produzido principalmente na província de Zamora, Comunidade de Castilla e León, Espanha, a partir de leite de ovelha das raças Churra e Castellana e é aprovado pelo Conselho Regulador de Denominação de Origem (D.O.P.), segundo MAPA, desde 1993. Caracteriza-se por apresentar uma forma cilíndrica, com altura e diâmetro inferiores a 14 e 24 cm, respectivamente, e um peso em torno de 3 kg no final da maturação. A casca é dura, bem definida, de massa firme compacta, de cor variável de branco a marfim-amarelado, podendo apresentar olhos pequenos e distribuídos na massa do queijo. Seu aroma e sabor são bastante intensos e persistentes ao paladar.

Queijos duros necessitam de um período maior para a maturação, a fim de que ocorram as modificações bioquímicas, físicas e microbiológicas (DUMAIS et al., 1991) necessárias para que a massa insípida e sem forma definida no início se transforme em um produto rico em aroma e sabor e com textura e consistência próprias (CARVALHO e SILVA, 1993).

Essas transformações bioquímicas são influenciadas por vários fatores, entre eles as enzimas do coalho, as nativas do leite e dos próprios microrganismos presentes, sejam estes *starters* ou não *starters* (SOUSA et al., 2002). A caracterização da microbiota do queijo é muito importante, pois exerce papel fundamental na proteólise deste durante a maturação (MORENO et al., 2002). Por meio desses conhecimentos pode-se monitorar a qualidade e conhecer melhor a influência desta sobre o desenvolvimento do *flavor* e sobre a textura do queijo (EL SODA, 1997).

Os microrganismos que estão envolvidos na maturação do queijo podem ser divididos em dois grupos: a flora *starter* e a flora secundária. A flora *starter* é constituída por bactérias lácticas que são acrescidas ao leite para a fabricação do queijo, combinadas de diferentes formas, dependendo do tipo de queijo que se quer elaborar, e são responsáveis pela produção de ácido durante o processo de fermentação, podendo ser divididas em dois subgrupos: *starter* primária e *starter* secundária (EL SODA et al., 2000). A flora secundária, conhecida também como NSLAB (bactérias lácticas não *starter*), é constituída por uma complexa mistura

de bactérias, mofo e leveduras (BERESFORD et al., 2001). O papel desses dois grupos tem sido documentado em várias revisões (FOX et al., 1998; JOHNSON, 1998; SOUSA et al., 2002).

Os principais microrganismos que participam como fermentos, para a produção especialmente de ácido láctico, são as culturas mesofílicas *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, principais responsáveis pela acidificação do queijo no início da fermentação (MORENO et al., 2002). Apresentam ainda um fenômeno complexo, que envolve modificações, por meio de seus diversos sistemas enzimáticos, sendo indispensáveis para o desenvolvimento típico de sabor, aroma e textura de diversos tipos de queijo (JOHNSON, 1998).

As bactérias autóctones geralmente presentes no leite cru podem estar presentes também no leite pasteurizado, sendo algumas remanescentes do leite *in natura* ou adquiridas durante a fabricação do queijo, advindas do próprio ambiente do laticínio, das condições higiênicas, do grau de contaminação de ingredientes, equipamentos, pessoas, ambiente do processamento e da temperatura de estocagem (MORENO et al., 2002). De acordo com o tipo de queijo, pode ocorrer predomínio das espécies autóctones, sendo algumas delas responsáveis pela aceleração da maturação, intensificando o *flavor* (Mc SWENEY et al., 1993). Normalmente cepas de *Lactobacillus* são encontradas e podem estar presentes em grande número. Os *Pediococcus* e *Enterococcus* também fazem parte deste grupo, porém estão presentes em menor número (FOX et al., 1998).

Os lactobacilos e pediococos geralmente não crescem bem no leite e não contribuem para a acidificação inicial durante a fabricação do queijo (COGAN et al., 1997). *Micrococcus* não são bactérias do ácido láctico, mas têm papel significativo na formação do *flavor* de certos tipos de queijos (BHOWMIK e MARTH, 1990).

As microbiotas adicionadas ou as autóctones apresentam nutrição complexa, necessitando de fonte exógenas de nucleotídeos, vitaminas e aminoácidos para sua multiplicação. Por isso, as bactérias necessitam do sistema proteolítico para atender essas necessidades nutricionais (MORENO et al., 2002).

O sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* é composto de três grupos de componentes – as proteinases extracelulares, uma série de peptidases intracelulares e o sistema de transporte – que catalisam as translocações de peptídeos e aminoácidos livres. Os tipos e as especificidades das enzimas proteolíticas liberadas a partir das células lisadas é que determinam a qualidade do queijo (MORENO et al., 2002).

WILLIAMS et al. (2000) observaram que, no queijo Cheddar, a população de *Lactococcus lactis* ssp. era dominante, porém ela foi sendo substituída ao longo da maturação por bactérias lácticas autóctones, principalmente pelos lactobacilos, que sobrevivem por mais tempo durante a maturação. Além disso, os lactobacilos apresentam atividade proteolítica mais intensa que a atividade dos lactococos (MORENO et al., 2002).

A microbiota do queijo contribui para sua maturação, por meio de suas enzimas hidrolases, influenciando tanto a lipólise como a proteólise. As proteases presentes no queijo ocasionam a proteólise da caseína, juntamente com a plasmina e a quimosina do coalho, liberando peptídeos de maior tamanho, que por sua vez são hidrolisados por enzimas peptidases dos microrganismos, resultando em peptídeos de baixo peso molecular e em aminoácidos. Os aminoácidos são posteriormente transformados, produzindo substâncias sulfuradas, como metanotiol, aminas e outros (SOUSA et al., 2002). Essas transformações são produzidas de forma natural na massa durante a maturação e podem ser aceleradas por vários métodos (GARCIA, 1986; FERNÁNDEZ GARCIA e LÓPEZ-FANDIÑO, 1994).

Métodos de aceleração da maturação são comuns para vários tipos de queijo, entre eles o aumento da temperatura durante a estocagem (GAYA et al., 1990; NÚÑEZ et al., 1991; EL SODA, 1993). A temperatura afeta o crescimento bacteriano em todos os tipos de queijo durante a fabricação. Temperatura menor que 8 °C reduz a taxa de crescimento das NSLAB no queijo Cheddar (FOLKERTSMA et al., 1996). Estudos a respeito do efeito da temperatura sobre o crescimento de microrganismos foram analisados por SHAKEEL-Ur et al. (2000), indicando maior crescimento dos microrganismos tanto em queijos

produzidos com leite pasteurizado quanto nos elaborados com leite cru, submetidos a altas temperaturas de maturação.

FEDRICK et al. (1983) concluíram que o aumento da temperatura influi de maneira seletiva na atividade proteolítica e peptidolítica do queijo Cheddar. NÚÑEZ et al. (1991) realizaram estudos em queijo Manchego de leite de ovelha, e o maior aumento da temperatura de maturação exerceu maior influência na atividade das endopeptidases do que exopeptidases ou do coalho.

EL SODA (1986) relatou que temperaturas acima de 20 °C podem ocasionar risco de crescimento de microrganismos indesejáveis, ao contrário do que afirmaram ASTON et al. (1985) e FEDRICK e DULLEY (1984), que obtiveram a essa temperatura queijos Cheddar de boa qualidade, livres de *off-flavor*. Os autores consideraram o aumento de temperatura na maturação como um avanço tecnológico neste caso, mas isso só é possível se utilizado leite de excelente qualidade (EL SODA, 1997).

Todos os processos para acelerar a maturação apresentam aspectos negativos e positivos. No presente trabalho foi aplicado o processo de modificação na temperatura de maturação, por ser uma forma simples e econômica de acelerar os processos bioquímicos que ocorrem durante o período de maturação, apresentando ainda como vantagem a não-incorporação adicional de agente externo à massa do queijo, que, sob o ponto de vista legal, não seria permitido (MAPA, 1993).

Na prática, o Conselho Regulador estipula um mínimo de 100 dias de maturação para o queijo Zamorano DOP ser comercializado e considerado um produto de qualidade (MAPA, 1993). No entanto, este é freqüentemente comercializado após um período de maturação que oscila entre oito meses e um ano, representando um problema do ponto de vista econômico, devido a uma imobilização de capital durante esse período, e elevando o preço para o consumidor.

Isso justifica a necessidade de um processo que viabilize a diminuição do tempo de maturação, mantendo a qualidade do queijo. O estudo da microbiota do queijo Zamorano DOP é importante para verificar a influência e o comportamento dos microrganismos presentes em diferentes momentos da maturação, pois estes influenciam diretamente a proteólise no queijo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Elaboração dos queijos

No presente trabalho foram elaborados queijos Zamorano DOP com leite pasteurizado de ovelha, na indústria Campostera, na província de Zamora (Espanha). No leite foram incorporadas culturas mesofílicas “O” (1%), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Os queijos foram coagulados a uma temperatura de 32 °C, acrescentando-se coalho animal (25 ml de coalho líquido ovino de força 1/10000 p/100 litros de leite), de forma que a coagulação fosse verificada em um tempo de 35 a 40 minutos. Após este período a coalhada foi submetida a corte intenso até a obtenção de grão de tamanho semelhante ao de grão de arroz ou de milho, seguido de agitação durante 35 a 40 minutos e aquecimento da massa a uma temperatura de 37-38 °C. Quando os grãos de coalhada adquiriram a consistência desejada, o soro foi eliminado e a massa transferida para recipientes cilíndricos, que foram submetidos a uma prensagem utilizando prensas pneumáticas durante cinco horas. Posteriormente, a coalhada foi retirada dos moldes e introduzida na salmoura (20° Baumé e temperatura de 10 °C), onde permaneceram por 24 horas. Por último, os queijos foram transferidos para as câmaras de maturação, sob diferentes controles de temperatura e com uma umidade relativa de 85%.

As condições de temperatura empregadas na maturação acelerada dos queijos em diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E) e os períodos de coleta das amostras para estudo de um dia (coalhada prensada sem salga) – 7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias – estão indicados no esquema da Figura 1.

2.2. Preparo das amostras

As amostras de leite pasteurizado, após 30 minutos de adicionado o fermento, e os queijos do experimento foram obtidos na Indústria Campostera, na província de Zamora (Espanha). As amostras de leite, juntamente com o fermento, foram retiradas diretamente da cuba de fabricação do queijo, em

recipiente estéril e sob condições de refrigeração de $< 5^{\circ}\text{C}$, transportados até os laboratórios do Departamento de Higiene e Tecnologia de Alimentos (DHTA) da Universidade de León, para realização das análises. As amostras de queijo para as análises seguiram o esquema de coleta apresentado na Figura 1, obedecendo às normas de assepsia preconizadas.

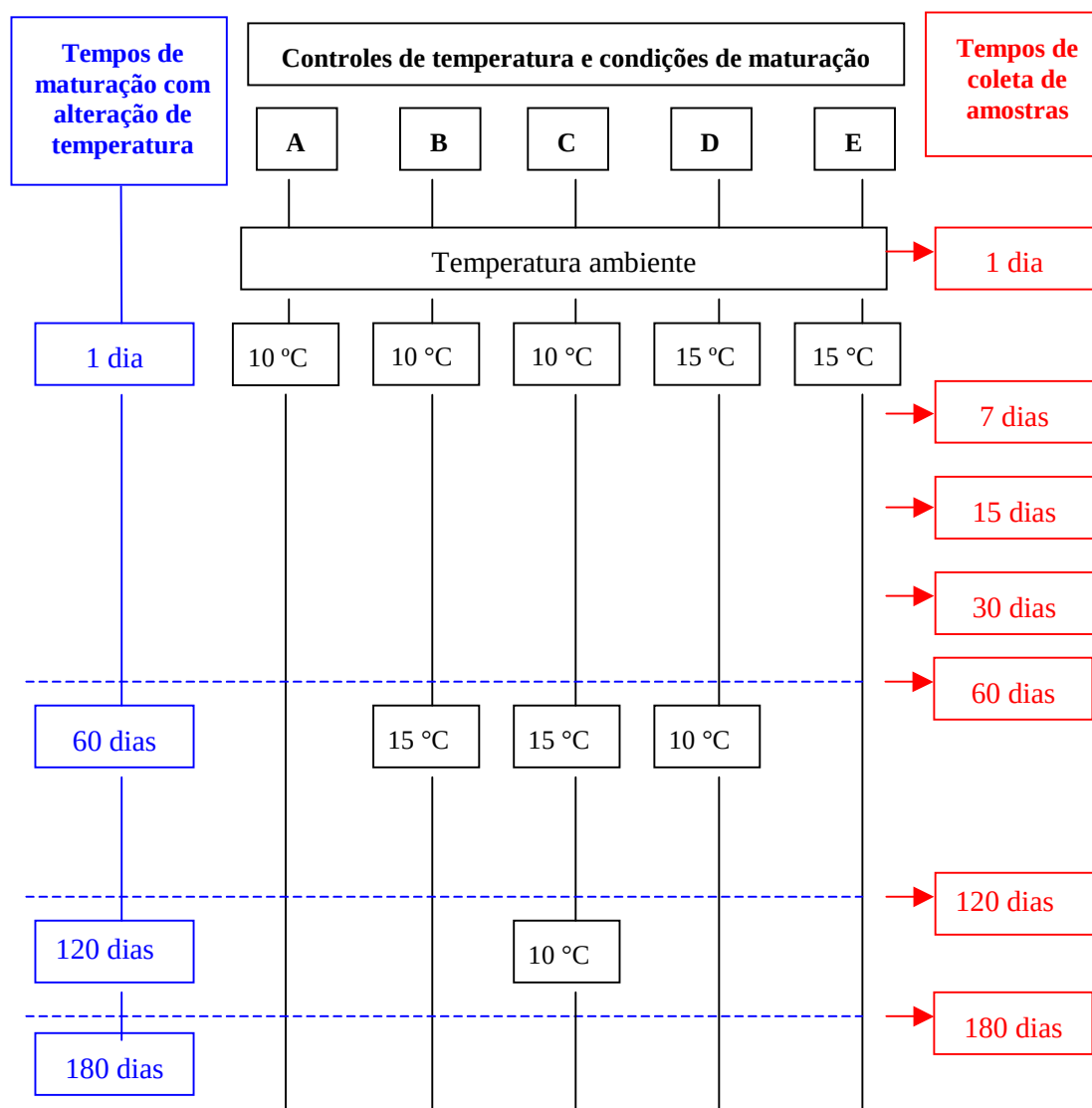


Figura 1 – Diagrama das condições experimentais de maturação do queijo Zamorano DOP.

As amostras de leite, bem como as amostras de queijo (retirada a casca e coletadas partes representativas e aleatórias da matriz do queijo), foram obtidas a partir de 50 gramas. A seguir as amostras foram homogeneizadas com 200 ml de uma dissolução estéril de citrato sódico tribásico a 2% a 40-45 °C, em um Stomaccher 400 Lab Blender, durante três minutos, obtendo-se uma diluição de 1/5. A partir desta foram preparadas as diluições decimais sucessivas, misturando-se 10 ml da diluição previamente preparada com 90 ml de água peptonada estéril a 0,1%, seguindo normas preconizadas pela FIL-122 C (1996). Todas as diluições foram preparadas em duplicatas.

2.3. Análises microbiológicas

2.3.1. Leite

As análises microbiológicas realizadas no leite para fabricação do queijo incluíram contagem de mesófilos totais no meio PCA (Plate Count Agar - Oxoid), seguindo metodologia estabelecida pelo APHA (1992), com incubação de 30 °C por 48 horas; contagem de *Enterobactireaceae*, realizada em VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar - Oxoid), seguindo a metodologia de MOSSEL et al. (1962); e contagem de presumíveis lactococos, feita em ágar M17 (Biokar), seguindo a metodologia proposta por TERZAGHI e SANDINE (1975).

2.3.2. Queijo

As análises microbiológicas dos queijos, em cada etapa do experimento, de acordo com os grupos microbianos, foram as que se seguem:

2.3.2.1. Contagem da flora aeróbia mesófila total

A contagem foi feita em PCA (Plate Count Agar da Oxoid), seguindo metodologia estabelecida pela APHA (1992). As sementeiras foram realizadas em placas de Petri, utilizando 1 ml do inóculo de cada diluição e 15 ml do meio. Posteriormente, as placas foram homogeneizadas e incubadas a 30 °C/48 horas.

2.3.2.2. Contagem da flora ácido-lática

A contagem de presumíveis lactococos foi feita em ágar M17 (Biokar), seguindo a metodologia de TERZAGHI e SANDINE (1975). Foi semeado em superfície 0,1 ml por diluição em duplicata, incubado a 30 °C por 18 horas. Este meio é muito rico em componentes nutricionais e promove o crescimento de lactococos. Entre os componentes do meio figuram lactose (5%) e glicerolfosfato de sódio (19%), que permitem aumentar a capacidade-tampão do meio e manter o pH em 7,2±0,1.

A contagem de lactobacilos foi realizada em ágar ROGOSA (Oxoid), conforme metodologia preconizada por ROGOSA et al. (1951). Foi colocado 1 ml de cada diluição nas respectivas placas de Petri e acrescentado o meio, homogeneizado. Após solidificação do meio, foi colocada uma cobertura de ágar para favorecer o crescimento dos lactobacilos (microaerófilos). Este meio foi incubado a 30 °C por cinco dias.

2.3.2.3. Contagem de *Micrococcaceae*

A contagem de *Micrococcaceae* para possíveis micrococos e estafilococos foi utilizado ágar Manitol Sal Agar (MSA- Oxoid), conforme metodologia de CHAPMAN (1945). Utilizou-se 0,1 ml da diluição semeada em superfície, com auxílio de uma alça de Drigalski, e depois incubou-se a 30 °C por 48 horas. Este meio é seletivo para microrganismos halotolerantes, possui manitol e sua utilização se manifesta pela produção de ácido e viragem do meio. A degradação do manitol está relacionada com a patogenicidade do microrganismo e serve como indicativo de *S. aureus*. As colônias manitol (+), com halo luminoso e crescimento intenso, correspondem em geral a *S. aureus*. Outras colônias sem cor e pouco crescimento podem corresponder a *S. epidermides*, entre outros.

2.3.2.4. Contagem de enterococos

A contagem destes microrganismos foi realizada em placas de Petri em meio de KAA (Kanamycin Aesculin Azide Agar Base - Oxoid), seguindo

metodologia de MOSSEL et al. (1978). Foi colocado nas placas, em duplicatas, 1 ml da diluição, o respectivo meio e, após homogeneização e solidificações, incubou-se a 37°C/24 h. Este meio é suplementado com kanamicina.

2.3.2.5. Contagem de *Enterobacteriaceas*

A contagem destes microrganismos foi realizada em VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar - Oxoid), seguindo a metodologia proposta por MOSSEL et al. (1962). Foi inoculado no meio 1 ml de cada diluição nas respectivas placas de Petri, em duplicata, homogeneizado; após solidificação, colocou-se uma sobrecamada, incubando a 37 °C por 18-24 horas. Este meio possui glicose, açúcar fermentável por todas as enterobactérias, com produção de ácido e vermelho neutro como o indicador do meio. Os sais biliares e o cristal-violeta inibem os outros microrganismos presentes, especialmente as bactérias gram-positivas, pois são seletivos para enterobactérias.

2.3.2.6. Contagem de mofos e leveduras

A contagem de mofos e leveduras foi feita em meio de OGYEA (Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar - Oxoid), conforme preconizado por MOSSEL et al. (1970). Realizou-se semeadura em profundidade em placas de Petri, por duplicata, colocando-se 1 ml de cada diluição nas respectivas placas, e acrescentado o meio; após homogeneização e solidificação, foram incubadas a 22 °C durante cinco dias.

Depois de transcorrido o tempo necessário para o crescimento de cada grupo microbiano, efetuou-se a contagem das placas que possuíam entre 30 e 300 colônias. Os resultados foram expressos em log de unidades formadoras de colônias por grama (ufc/g).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos no leite após 30 minutos da adição do fermento foram, para a flora aeróbia mesófila total, flora aeróbia *Enterobacteriaceae* e lactococos, de $2,38 \times 10^7$, $6,50 \times 10^2$ e $1,27 \times 10^5$ ufc/g, respectivamente. Estes valores médios da flora aeróbia mesófila total encontram-se aumentados em razão do acréscimo da flora láctica *starter* mesofílica que foi adicionada ao leite. Os valores para lactococos, que representam a cultura “O” adicionada para elaboração do queijo, demonstraram ótima atividade nessa etapa de elaboração do queijo (30 minutos). A presença de enterobactérias indicou contaminação pós-pasteurização do leite.

As contagens para a flora aeróbia mesófila total (Figura 2) para o queijo de um dia, em todos os controles de temperatura, foram de uma a duas unidades logarítmicas mais altas que os obtidos no leite pasteurizado (LP) para a contagem de mesófilos. O aumento dessas contagens mais altas na coalhada é um fenômeno normal na fabricação de queijo, que se deve em parte à retenção dos microrganismos no coágulo e em parte à multiplicação microbiana durante a coagulação e drenagem do soro. Segundo TATINI et al. (1971), a retenção das bactérias na coalhada é responsável pelo aumento de uma unidade logarítmica na contagem, sendo a multiplicação microbiana a responsável pelo aumento restante. A pouca multiplicação microbiana nessa etapa do queijo (coalhada de um dia) é explicada pelo pequeno aumento dessas contagens.

A contagem da flora aeróbica mesófila total se manteve mais ou menos constante e com valores em torno de 8,5 a 9,0 log ufc/g, em todos os controles de temperatura, durante os dois primeiros meses de maturação dos queijos. A partir desse momento, observou-se diminuição das contagens de duas unidades logarítmicas em todos os controles de temperatura até o final da maturação, conforme indica a Figura 2. Na flora mesofílica total, onde se encontra toda a microbiota ácido-láctica presente no queijo, não houve nenhuma interferência do aumento da temperatura nos diferentes controles, sendo influenciada apenas pelos períodos de maturação.

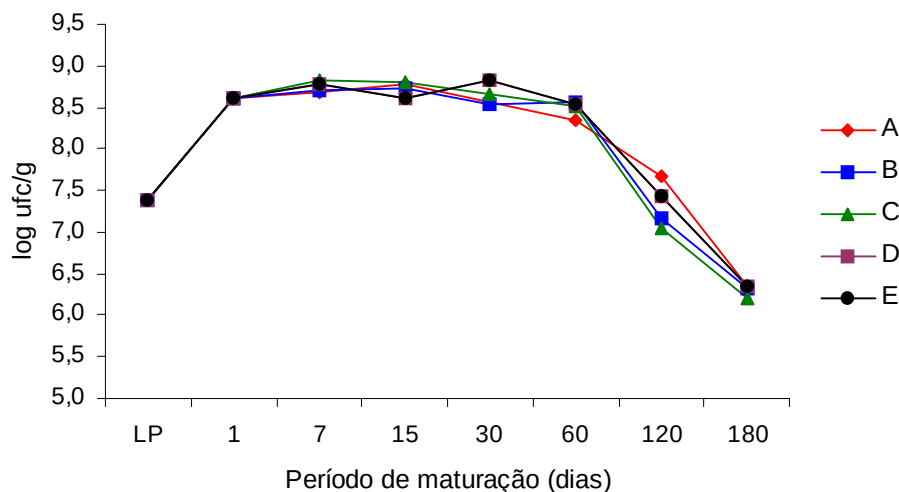


Figura 2 – Evolução da contagem da flora aeróbica mesofílica total durante a maturação do queijo Zamorano submetido a diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

A contagem em M17 para possíveis lactococos foi constante nos diferentes controles de temperatura, com valores em torno de 6-7 log ufc/g, durante os primeiros meses de maturação dos queijos. Isso indica que nos primeiros 60 dias o aumento da temperatura em 5 °C, nos controles de temperatura D e E, não teve influência no crescimento destes microrganismos, contrariando os estudos realizado por SHAKEEL-Ur et al. (2000), pois cada tipo de queijo apresentou uma característica própria, mesmo que fossem aplicados tratamentos semelhantes. No entanto, os diferentes controles de temperatura a que foram submetidos os queijos no início da maturação parecem condicionar as contagens desses microrganismos em suas etapas mais avançadas, já que nos dois meses seguintes as contagens diminuíram em duas unidades logarítmicas para os controles de temperatura B e C, com relação ao controle de temperatura A, em que a diminuição foi de apenas uma unidade logarítmica, como apresenta a Figura 3.

A evolução das contagens em M17 pode ser interpretada levando-se em consideração que este é um meio eletivo para os lactococos e que este grupo é metabolicamente muito ativo e começa a fermentar a lactose e a proliferar nas

etapas iniciais da maturação dos queijos (WILLIAMS et al., 2000), predominando nesta fase. No entanto, a partir dos 60 dias esta população diminuiu devido à sua sensibilidade à acidez e à pouca capacidade de competir com outras populações microbianas, como as bactérias lácticas autóctones, aqui representadas pelos *Lactobacillus* ssp., que sobreviveram em etapas mais avançadas da maturação.

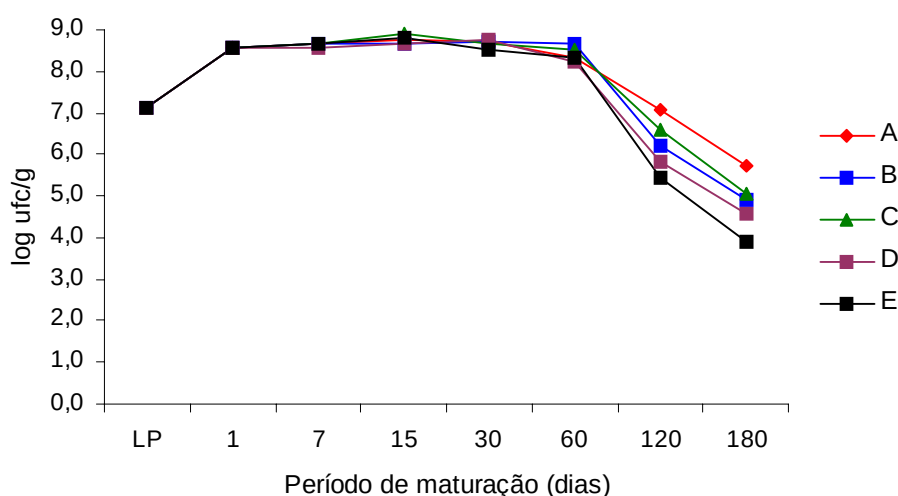


Figura 3 – Evolução de presumíveis lactococos em M17 durante a maturação do queijo Zamorano submetido a diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Constatou-se diminuição no número de lactococos nos queijos em que os controles de temperatura foram maiores (15 °C) e, conseqüentemente, apresentaram menor atividade de água (A_w), o que indica a maior sensibilidade desse grupo microbiano diante das condições adversas do meio (baixa A_w , maior concentração de cloretos na umidade e baixos valores de pH), sendo substituídos por lactobacilos à medida que transcorreu a maturação.

A autólise pode ocorrer de forma espontânea, quando as bactérias alcançam a fase estacionária de crescimento, ou quando se encontram em condições

fisiológicas desfavoráveis (MORENO et al., 2002). Este mecanismo está diretamente relacionado ao *flavor* dos queijos, ocorrendo mais especificamente em estágios mais avançados de maturação (SOUSA et al., 2002).

As contagens em ágar ROGOSA (Figura 4) foram muito diferentes para os queijos nos controles de temperatura A, B e C e entre os controles de temperatura D e E durante os dois primeiros meses de maturação. Os controles de temperatura D e E apresentaram valores de duas a três unidades logarítmicas superiores às dos controles de temperatura A, B e C. Ao final da maturação as contagens em ROGOSA foram muito similares em todos os lotes estudados; os controles de temperatura A e C foram ligeiramente inferiores aos controles de temperatura B, D e E (Figura 4).

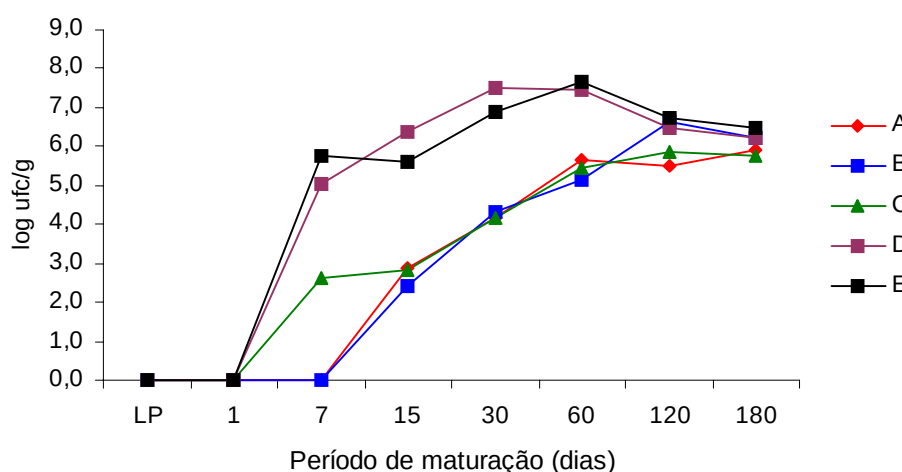


Figura 4 – Evolução da contagem de *Lactobacillus* em ROGOSA durante a maturação do queijo Zamorano submetido a diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

O meio ROGOSA é seletivo para os lactobacilos, o que pode explicar a evolução das contagens no controle de temperatura A, já que este grupo microbiano possui metabolismo mais lento que o dos lactococos e são microrganismos ácido-tolerantes, com pH ótimo de crescimento inferior ao dos lactococos. Isso explica crescimentos inicialmente mais lentos dos lactobacilos, obtendo-se ao

longo da maturação contagens mais elevadas. Assim, enquanto a população de lactococos diminuiu, a dos lactobacilos aumentou.

Na Figura 4 observa-se que a evolução da contagem de lactobacilos foi influenciada pelos diferentes controles de temperatura aos quais os queijos foram submetidos durante a maturação. Nos controles de temperatura D e E o crescimento foi mais rápido e mais acentuado que os observados nos controles de temperatura A, B e C. Os queijos mantidos nos controles de temperatura D e E alcançaram contagem maior aos 30 e 60 dias de maturação, obtendo valores similares aos esperados para queijos elaborados com leite cru (10^6 e 10^7 ufc/g) (DEMARIGNY et al., 1996; BEUVIER et al., 1997). Estes queijos apresentaram contagens superiores no início da maturação, provavelmente influenciados pelo pH 5,5 destes queijos e pelo aumento de temperatura, apresentando maior atividade metabólica, o que provavelmente favoreceu o seu crescimento, diferindo dos outros controles de temperatura (A, B e C), cujo crescimento ocorreu de forma mais lenta.

As espécies NSLABs (bactérias do ácido láctico não *starters*) variam com os tipos de queijo. Esses microrganismos podem atuar no queijo como coadjuvantes do fermento láctico, acelerando a maturação, conforme observado por MENÉNDEZ et al. (2000) em queijo Arzúa-Ulloa e por CROW et al. (2001) em queijo Cheddar. O crescimento dos lactobacilos tanto nos primeiros dias como no final da maturação pode ter sido influenciado pelo aumento da temperatura, como pode ser observado na Figura 4.

Estudos realizados por SOUSA et al. (2002) indicaram que todas as bactérias do ácido láctico contribuem com suas proteinases e peptidases no processo de proteólise do queijo durante o seu crescimento e, em especial, após a sua lise celular.

De acordo com BARTTELS et al. (1987), os lactobacilos com elevada atividade peptidásica e aminopeptidásica podem acelerar a maturação dos queijos sem desenvolver excessivo sabor amargo. Os peptídeos amargos correspondem principalmente ao extremo C-terminal da β -caseína, que sofreu degradação pela plasmina. Muitos microrganismos, especialmente os lactobacilos, liberam

prolina-aminopeptidases, com grande importância na eliminação dos sabores amargos dos queijos (McDONNELL et al., 1997). As NSLABs têm sido empregadas para melhorar o *flavor* de queijos durante a maturação (CROW et al., 2001). Outros autores (LEMIEUX et al., 1989; LEE et al., 1990) indicam que os lactobacilos homofermentativos mesófilos têm sido empregados em muitas ocasiões para acelerar a maturação e melhorar as características dos queijos. Neste trabalho não houve produção de sabores amargos e os lactobacilos podem ter contribuído para a proteólise do queijo, bem como para a produção do *flavor* característico do queijo Zamorano DOP.

Quanto à contagem de *Micrococaceae* e enterococos, estes apenas foram detectados nos controles de temperatura D e E durante o primeiro mês de maturação, desaparecendo a partir desse momento. Mofos e leveduras não foram detectados nos tratamentos analisados. As contagens de enterobactérias foram similares em todos os queijos examinados, nos diferentes controles de temperatura, apresentando contagem de 10^3 ufc/g até o primeiro mês de maturação, desaparecendo logo no seguinte, com exceção dos controles de temperatura B e C, que apresentaram decréscimo de um ciclo logarítmico até os 60 dias e desapareceram nos dois meses após a fabricação do queijo. Estes microrganismos, bem como *Microcococaceae* e enterococos, se fizeram presentes, indicando possível contaminação dos queijos, produzida a partir do ambiente e/ou dos utensílios empregados durante o processo de fabricação ou manipulação.

4. CONCLUSÕES

Os queijos analisados apresentaram uma microbiota ácido-lática compatível com os períodos de maturação a que foram submetidos, demonstrando o crescimento inicialmente de lactococos; com a diminuição destes, ocorreu aumento de lactobacilos ao longo da maturação. Estes microrganismos, por meio do seu sistema enzimático, contribuíram para a degradação de compostos nitrogenados solúveis importantes na proteólise do queijo. O efeito da temperatura foi notado mais especificamente durante o crescimento dos microrganismos não *starter*, representados aqui pelos *Lactobacillus* ssp., principalmente naqueles queijos que foram submetidos a uma maior temperatura de maturação (15 °C), aplicados no início da maturação nos queijos submetidos aos controles de temperatura D e E e evidente também nos queijos sob o controle de temperatura B a partir de 60 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION-APHA. **Standard methods for examination of dairy products**, 18.ed. Whashington, DC: 1992. 433p.
2. ASTON, J.W.; GILES, J.E.; DURWARD, I.G.; DULLEY, J.R. Effect of elevated temperature on proteolysis and flavor development in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, 52:565-572, 1985.
3. BARTTELS, H.J.; JOHNSON, M.E.; OLSON, N.F. Accelerated ripening of Gouda cheese. 2. Effect of freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavour development, **Milchwissenschaft**, 42:139-146, 1987.
4. BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, 11:259-274, 2001.
5. BEUVIER, E.; BERTHAND, 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**, 7:311-323, 1997.
6. BHOWMIK, T.; MARTH, E. Role of Micrococcus and Pediococcus species in cheese ripening. **Journal Dairy Science**, 73:859-866, 1990.
7. CARVALHO, F.A.; SILVA, P.H.F. Alternativas para aceleração da maturação de queijo. **Leite & Derivados**, São Paulo, 11:36-38, 1993.
8. CHAPMAN, G.H. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. **Journal Bacteriology**, 50:201-203, 1945.
9. COGAN, T.M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P.S.; FERNANDES, I.; GÓMEZ, J.; GÓMEZ, R.; KALANTZOPOULOUS, P.S.; LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M.C.; RODRÍGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, 64:409-421, 1997.
10. CROW, V.; CURRY, B.; HAYES, M. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. **International Dairy Journal**, 11:275-283, 2001.
11. DEMARIGNY, Y.; BEUVIER, E.; DASEN, A.; DUBOZ, G. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. I. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. **Lait**, 76, 371-387, 1996.
12. DUMAIS, R.; BLAIS J.A.; CONRAD, F. Queso. In: AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la Leche**, 1991, 547p.
13. EL SODA, M. Acceleration of cheese ripening: recent advances. **Journal of Food Protection**, 49:395-399, 1986.
14. EL SODA, M. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening, **FEMS-Microbiology Reviews**, 12:239-252, 1993.
15. EL SODA, M. Control and enhancement of flavour in cheese. In: LAW, B.A. **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Blackie Academic & Professional, New York, p. 219-246. 1997.
16. EL SODA, M.; MADKOR, S.A.; TONG, P.S. Adjunct Cultures: Recent Developments and Potential significance to the cheese industry. **Journal Dairy Science**, 83:609-619, 2000.

17. FEDRICK, I.A.; DULLEY, J.R. The effect of elevated storage temperatures on the rheology of Cheddar cheese. **Journal Dairy Science**, 19:191, 1984.
18. FEDRICK, I.A.; ASTON, J.W.; DURWARD, L.G.; DULLEY, J.R. The effect of elevated ripening temperatures on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese N.Z.J. **Dairy Science Technology**, 18:253-260, 1983.
19. FOLKERTSMA, B.; FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. **Int. Dairy J.**, 6:1117-1134, 1996.
20. FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H.; LYNCH. Significance on nonstarter lactic acid bacteria in Cheeder cheese. **Australy Journal Dairy Technology**, 53:83-89, 1998.
21. GARCIA, E.F. Maduración acelerada del queso. Nuevas tendencias. **Alimentación Equipos y Tecnología**, julio-agosto, p.53-63, 1986.
22. GARCIA; E.F.; FÃNDINO RL. Revisión: Maduración acelerada de quesos de leche de oveja. **Revista española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, 34:3-367, 1994.
23. GAYA, P.; MEDINA, M.; RODRIGUEZ-MARÍN, M.A.; NÚÑEZ, M Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: the effect of elevated ripening temperatures. **Journal Dairy Science**, 73:26-32, 1990.
24. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. FIL-IDF, 122C. Lait et produits laitiers. Preparation des echantillons et des dilutions en vue de l'examen microbiologique. Bruxelles: **Bulletin-IDF**, 1996. 5p.
25. JOHNSON, M.E. Cheese products. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**. Ed.Marcel Dekker, Inc. New York, 1998.
26. LEE, B.H.; LALEYE, L.C.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; EMMONS, D.B.; GIROUX, R.N. Influence of homofementative lactobacilli on physicochemical and sensory properties of Cheddar cheese. **Journal of Food Science**, 55:386-390, 1990.
27. LEMIEUX, L.; PUCHADES, R.; SIMARD, R.E. Size-exclusion HPLC separation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese made with added *Lactobacillus* strains to accelerate ripening. **Journal of Food Science**, 54:1234-1243, 1989.
28. MAPA Orden de 6 de mayo de 1993 por la que se aprueba el reglamento de la denominación de origen "Queso Zamorano" y de su Consejo Regulador. **B.O.E. Nº 120 de 20 de mayo de 1993**, p. 15311-15316.
29. McDONNELL, M.; FITZGERALD, R.; FHAOLAIN, I.N.; JENNINGS, P.V.; O'CUINN, G. Purification and characterization of aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. **Journal Dairy Research**, 64:399-407, 1997.
30. 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**, 3:613-614, 1993.
31. MENÉNDEZ, S.; CENTENO, J.A.; GODÍNEZ, R.; RODRÍGUES-OTERO, J.L. Effects of *Lactobacillus* strains on the repining and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. **International Dairy Journal**, 59:37-46, 2000.
32. MOSSEL, D.A.A.; MENDERINK, W.H.J.; SCHOLTS, H.H. Use of a modified Mc Conkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae. **Journal Bacteriology**, 84:381, 1962.
33. MOSSEL, D.A.A.; KLEYNEN-SEMMELING, A.M.C.; VICENTE, H.M. Oxytetracycline-Glucose- yeast extract agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. **Applied Dairy Microbiology**.33: 454-457, 1970.

34. MOSSEL, D.A.A.; BIJKER, P.G.H.; EELDERING, J. Steptokokken der Lancefield-gruppe D in lebensmitteln und trinkwarrern. Ihre bedeutung, erfassung und bekämpfung. **Arch. F. Lebensmittelhyg.**, 29:121-127, 1978.
35. MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A.L.S.; DESTRO, M.T. A importancia da microbiota adicionada e autóctone na maturação de queijos prato. **Indústria de Laticínios**, 39:59-62, 2002.
36. NÚÑEZ, M.; GUILLÉN, A.M.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M.A.; MARCILLA, A.M.; GAYA, P.; MEDINA, M. Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: the effect of neutral proteinases. **Journal Dairy Science**, 74:4108-4118, 1991.
37. ROGOSA, M.; MITCHELL, J.A.; WISEMAN, R.F. A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. **Journal Bacteriology**, 62:132-133, 1951.
38. SHAKEEL-Ur, R.; BANKS, J.M.; BRECHANY, E.; MUIR, D.D.; McSWEENEY, P.L.H.; FOX, P.F. Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. **International Dairy Journal**, 10:55-65, 2000.
39. SOUSA, M.J.; ARDÖ, Y.; McSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, 11:327-345, 2002.
40. TERZAGHI, B.E.; SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. **Applied Dairy Microbiology**, 29:807-803, 1975.
41. TATINI, S.R.; JEZESKI, J.; MORRIS, H.A.; OLSON, J.C.; CASMAN, E.P. Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. **Journal Dairy Science**, 54:815-825, 1971.
42. WILLIAMS, A.G.; WITHERS, S.E.; BANKS, J.M. Energy sources of no-starters lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, 10:17-23, 2000.

APÊNDICE

Quadro 1 – Valores das contagens em placas para *Lactococcus*, *Lactobacillus* e para a flora mesofílica nos diferentes controles de temperatura

Controle de temperatura	Dias de Maturação	Contagem dos Microrganismos		
		<i>Lactococcus</i> M 17	<i>Lactobacillus</i> ROGOSA	Flora Mesofílica PCAm
A ²	LP+F ¹	1,27x10 ⁵	—	2,38x10 ⁷
	1	3,80x10 ⁶	—	4,08x10 ⁸
	7	4,50x10 ⁶	—	4,80x10 ⁸
	15	6,33x10 ⁶	7,90x10 ²	6,13x10 ⁸
	30	5,10x10 ⁶	1,43x10 ⁴	3,60x10 ⁸
	60	2,15x10 ⁶	4,45x10 ⁵	2,18x10 ⁸
	120	1,20x10 ⁵	3,08x10 ⁵	4,60x10 ⁷
	180	5,33x10 ³	7,87x10 ⁵	2,18x10 ⁶
B	LP+F	1,27x10 ⁵	—	2,38x10 ⁷
	1	3,80x10 ⁶	—	4,08x10 ⁸
	7	4,63x10 ⁶	—	5,13x10 ⁸
	15	4,63x10 ⁶	2,53x10 ²	5,33x10 ⁸
	30	4,88x10 ⁶	2,20x10 ⁴	3,40x10 ⁸
	60	4,58x10 ⁶	7,23x10 ⁵	3,60x10 ⁸
	120	1,65x10 ⁴	4,45x10 ⁶	1,45x10 ⁷
	180	7,75x10 ³	1,13x10 ⁶	2,10x10 ⁶
C	LP+F	1,27x10 ⁵	—	2,38x10 ⁷
	1	3,80x10 ⁶	—	4,08x10 ⁸
	7	4,80x10 ⁶	4,10x10 ²	6,55x10 ⁸
	15	8,00x10 ⁶	1,37x10 ²	6,38x10 ⁸
	30	4,63x10 ⁶	2,13x10 ⁴	4,60x10 ⁸
	60	3,20x10 ⁶	2,85x10 ⁵	3,22x10 ⁸
	120	3,84x10 ⁴	7,03x10 ⁵	1,13x10 ⁷
	180	5,35x10 ²	5,77x10 ⁵	1,58x10 ⁶
D	LP+F	1,27x10 ⁵	—	2,38x10 ⁷
	1	3,80x10 ⁶	—	4,08x10 ⁸
	7	3,58x10 ⁶	1,06x10 ⁵	6,05x10 ⁸
	15	4,38x10 ⁶	2,45x10 ⁶	3,98x10 ⁸
	30	7,00x10 ⁶	3,28x10 ⁷	6,63x10 ⁸
	60	1,68x10 ⁶	2,80x10 ⁷	3,43x10 ⁸
	120	6,75x10 ³	3,10x10 ⁶	2,70x10 ⁷
	180	3,58x10 ²	1,82x10 ⁶	2,25x10 ⁶
E	LP+F	1,27x10 ⁵	—	2,38x10 ⁷
	1	3,80x10 ⁶	—	4,08x10 ⁸
	7	4,45x10 ⁶	5,60x10 ⁵	6,05x10 ⁸
	15	6,75x10 ⁶	4,05x10 ⁵	3,98x10 ⁸
	30	5,05x10 ⁶	7,98x10 ⁶	6,63x10 ⁸
	60	2,23x10 ⁶	4,75x10 ⁷	3,43x10 ⁸
	120	2,83x10 ³	5,33x10 ⁶	2,70x10 ⁷
	180	7,53x10 ¹	3,02x10 ⁶	2,25x10 ⁶

¹ LP+F = leite pasteurizado + fermentado.

² A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 2 – Valores em escala logarítmica das contagens da flora mesofílica total (PCA), presumíveis lactococos (M17) e lactobacilos (ROGOSA) nos diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E)

Valores encontrados no gráfico da Figura 2					
Dias	FLORA AERÓBICA MESOFÍLICA TOTAL				
	A ²	B	C	D	E
(LF+F) ¹	7,38	7,38	7,38	7,38	7,38
1	8,61	8,61	8,61	8,61	8,61
7	8,68	8,71	8,82	8,78	8,67
15	8,79	8,73	8,84	8,74	8,80
30	8,61	8,65	8,66	8,82	8,67
60	8,34	8,56	8,54	8,54	8,62
120	7,66	7,11	7,05	7,43	6,90
180	6,34	6,32	6,19	6,35	6,50
Dias	PRESUMÍVEIS LACTOCOCOS EM M17				
	A	B	C	D	E
(LF+F)	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10
1	8,58	8,58	8,58	8,58	8,58
7	8,65	8,67	8,68	8,55	8,65
15	8,77	8,67	8,90	8,68	8,83
30	8,71	8,69	8,67	8,74	8,54
60	8,33	8,66	8,51	8,23	8,35
120	7,08	6,22	6,58	5,83	5,45
180	5,73	4,89	5,03	4,55	3,88
Dias	LACTOBACILOS EM ROGOSA				
	A	B	C	D	E
(LF+F)	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
7	0	0	2,61	5,03	5,75
15	2,90	2,40	2,83	6,39	5,61
30	4,23	4,34	4,06	7,52	6,90
60	5,65	5,16	5,45	7,45	7,68
120	5,49	6,65	5,85	6,49	6,73
180	5,90	6,21	5,76	6,23	6,48

¹ LF+F = leite pasteurizado + fermentado.

² A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 3 – Valores das contagens em placas para *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* e *Micrococcaceae* nos diferentes controles de temperatura

Controle de temperatura	Dias de Maturação	Contagem dos Microrganismos		
		<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Micrococcaceae</i>
A ²	LP+F ¹	6,50x10 ²	—	—
	1	2,80x10 ⁴	—	—
	7	6,69x10 ³	—	—
	15	2,95x10 ³	1,18x10 ²	—
	30	1,73x10 ³	—	—
	60	—	—	—
B	LP+F	6,50x10 ²	—	—
	1	2,80x10 ⁴	—	—
	7	1,25x10 ⁴	—	—
	15	3,55x10 ³	—	—
	30	1,35x10 ³	1,10x10 ²	—
	60	1,15x10 ²	—	—
C	LP+F	6,50x10 ²	—	—
	1	2,80x10 ⁴	—	—
	7	1,08x10 ⁴	—	—
	15	7,60x10 ³	9,75x10 ¹	—
	30	1,43x10 ³	—	—
	60	1,38x10 ²	—	—
D	LP+F	6,50x10 ²	—	—
	1	2,80x10 ⁴	—	—
	7	7,23x10 ³	1,73x10 ³	7,35x10 ¹
	15	1,70x10 ³	3,98x10 ³	2,55x10 ²
	30	1,16x10 ³	1,00x10 ⁴	3,40x10 ¹
	60	—	—	—
E	LP+F	6,50x10 ²	—	—
	1	2,80x10 ⁴	—	—
	7	8,55x10 ³	1,50x10 ³	1,80x10 ¹
	15	5,25x10 ³	1,00x10 ²	0,75x10 ¹
	30	1,10x10 ³	1,58x10 ³	1,63x10 ¹
	60	—	—	—

¹ LP+ F= leite pasteurizado

² A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS E INFLUÊNCIAS FÍSICO-QUÍMICAS, QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DO QUEIJO ZAMORANO DOP SOB MODIFICAÇÕES DE TEMPERATURA DURANTE A MATURAÇÃO

RESUMO

O queijo Zamorano DOP é queijo de leite de ovelha pasteurizado, de massa dura, comercializado após um período mínimo de 100 dias de maturação e controlado pelo Conselho de Denominação de Origem Protegida (MAPA, 1993). Neste trabalho avaliou-se a elevação da temperatura de maturação sob os aspectos físico-químicos e bioquímicos, controlando-se os períodos de maturação de 1, 7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias, seguindo um protocolo de temperaturas de maturação para os queijos em estudo: controle de temperatura A (10 °C até 180 dias), considerado controle; B (10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias); C (10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias); D (15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias); e E (15 °C até 180 dias). Observou-se aumento ($P < 0,05$) para nitrogênio solúvel, nitrogênio não-protéico e nitrogênio amínico, caracterizando-se o efeito da proteólise ao longo da maturação, principalmente nos queijos que se encontravam sob o controle de temperatura E, verificando-se a importância da maturação a 15 °C para o queijo Zamorano DOP com 180 dias de maturação. Foram determinados os perfis eletroforético e aminoacídico dos diferentes controles de temperatura, constata-se que o aumento da temperatura de maturação acelera os processos proteolíticos dos queijos. Pelos índices de proteólise na extensão (NS/NT) e na profundidade (NNP/NT), concluiu-se que estes índices foram maiores nos queijos submetidos a temperaturas mais elevadas durante a maturação. Observou-se que, nos queijos maturados a 15 °C, foram obtidos em 63 dias os mesmos valores, quando comparados aos queijos maturados a 10 °C por 100 dias. Apesar

de o aumento da temperatura ter sido de apenas 5 °C, ocorreu evidente degradação para a formação de peptídeos maiores, peptídeos menores e aminoácidos, ao longo dos períodos de maturação. Para as frações das caseínas e para as determinações de aminoácidos, concluiu-se que, quanto maior a temperatura de maturação, maior a aceleração da proteólise, podendo neste caso diminuir o período de maturação. Quanto aos aspectos físico-químicos e químicos, ocorreram diferenças em cloretos, umidade, atividade de água, pH e acidez titulável, e eles não influíram na qualidade do queijo ao final de 180 dias de maturação, quando submetidos aos diferentes controles de temperatura.

1. INTRODUÇÃO

Os fenômenos implicados na maturação do queijo são de grande complexidade, especialmente devido à natureza do substrato, à variedade de agentes responsáveis pelas transformações, à diversidade das modificações sofridas pelos constituintes e aos numerosos produtos formados (CHOISY et al., 1987).

Existem diferentes agentes responsáveis pelas reações bioquímicas que ocorrem no queijo: os proteolíticos, influenciados pela plasmina, proteinases nativas do leite, resíduos de agentes coagulantes, sistema de proteinase e peptidases da microflora *starter* e não *starter*, e/ou por agentes lipolíticos, lipases e esterases dos microrganismos componentes ou não de culturas *starters* e de lipases do próprio leite e, ainda, a degradação da lactose e citrato, ocasionada, principalmente pela ação enzimática das culturas adicionadas como fermentos ou nativas do próprio queijo (EL SODA, 1997).

As reações químicas e enzimáticas geralmente são aumentadas quando submetidas a temperaturas elevadas (WILKINSON, 1993), influenciando o *flavor* e a textura do queijo. Essas reações dependem ainda de cada variedade de queijo (FOLKERTSMA et al., 1996) e, especialmente, do tipo de leite (vaca, ovelha, cabra) que é utilizado na sua fabricação (CORSETTI et al., 1998).

Várias mudanças secundárias oriundas da proteólise, lipólise e glicólise ocorrem no queijo e são responsáveis por diferenciações do produto final (FOX et al., 1996). A proteólise contribui para o desenvolvimento do *flavor*, por estar relacionada à degradação da caseína em peptídeos de menor tamanho e aminoácidos livres, produzindo amina, ácidos, tióis e tioésteres, entre outros produtos componentes do *flavor* (FOX et al., 1996). Na maioria das variedades de queijo, especialmente nos duros e semiduros, esse processo requer longo tempo e controle das condições de maturação. Dentre esses fatores destaca-se a temperatura controlada, que onera os custos da maturação (CORSETTI et al., 1998; IZCO et al., 1999). Atualmente, o desenvolvimento de técnicas para reduzir o tempo de maturação é de substancial interesse para as indústrias de queijo (EL SODA, 1997).

Entre os métodos mais empregados para acelerar o processo de maturação encontram-se os aumentos de temperatura, aplicação do sistema *slurry*, adição de fermentos modificados e adição de enzimas exógenas (IZCO et al., 1999).

Muitos estudos têm sido realizados sobre maturação acelerada, principalmente em queijos de leite de vaca, mais concretamente em queijo Cheddar (FOLKERTSMA et al., 1996). Existem poucas aplicações de maturação acelerada em queijos elaborados a partir de leite de ovelha, especialmente devido ao fato de este tipo de queijo estar estritamente controlado pela Denominação de Origem e em razão de as aplicações de certos tratamentos não estarem autorizadas (IZCO et al., 1999). Dentre os queijos de leite de ovelha em que foi utilizado o processo de aceleração destacam-se os queijos Manchego na Espanha (NÚÑEZ et al., 1991), Feta na Grécia (VAFOPOULOU et al., 1989) e Pecorino Umbro na Itália (CORSETTI et al., 1998).

O aumento da temperatura na maturação de queijos é um dos métodos mais econômicos e mais simples, uma vez que acelera os processos bioquímicos que ocorrem no queijo durante a maturação, favorecendo o desenvolvimento do *flavor* (FOX et al., 1996), sem alterar as características no produto final (FERNÁNDEZ GARCIA e LÓPEZ-FANDINO, 1994). Além disso, apresenta vantagens de não apresentar custos adicionais e de não incorporar agentes estranhos ao queijo durante a fabricação (IZCO et al., 1999), sendo um método viável e podendo ser permitido em queijos que apresentem Denominação de Origem Protegida (DOP).

WILKINSON (1993) enumera vários estudos com diferentes combinações de temperatura/tempo, que foram usadas para investigar a influência de temperatura elevada na maturação do queijo, a influência da taxa de proteólise nas frações nitrogenadas do queijo Cheddar (ASTON et al., 1983), a textura (FEDRICK e DULLEY, 1984) e a qualidade (ASTON et al., 1985) do queijo.

O queijo Manchego com 60 dias de maturação, submetido à temperatura de 15 °C, apresentou uma proteólise mais intensa do que os queijos maturados à temperatura controle de 10 °C (NÚÑEZ et al., 1986). Aumento na maturação do queijo de 50% foi constatado por LAW et al. (1979) quando estes estavam à

temperatura de 13 °C, comparado com os queijos a 6 °C no mesmo período, aumentando conseqüentemente a formação do *flavor*. ASTON et al. (1985), em intensivo estudo sobre diferentes temperaturas de maturação no queijo Cheddar, concluíram que a temperatura ideal do queijo para ser estocado seria de 15 °C por 32 semanas, com intensa proteólise sem produzir *off-flavor*. Além disso, o leite empregado para fabricar queijos deve ser de excelente qualidade, para evitar o defeito do *flavor* e o crescimento de patógenos. A elevação da temperatura de maturação não possui barreiras legais e é viável economicamente, apresentando, no entanto, como desvantagem, o risco de crescimento de microrganismos contaminantes (EL SODA, 1993).

O queijo Zamorano DOP é fabricado a partir de leite pasteurizado de ovelhas das raças Churra e Castellana, em diversos municípios da província de Zamora, Comunidade da Castilla e León, Espanha. Apresenta massa firme e compacta, com poucos olhos e distribuídos de forma desigual, com conteúdo de gordura superior a 45% (g/es), extrato seco total de no mínimo 55%, pH variando de 5,1 a 5,8 e maturação mínima de 100 dias (MAPA, 1993).

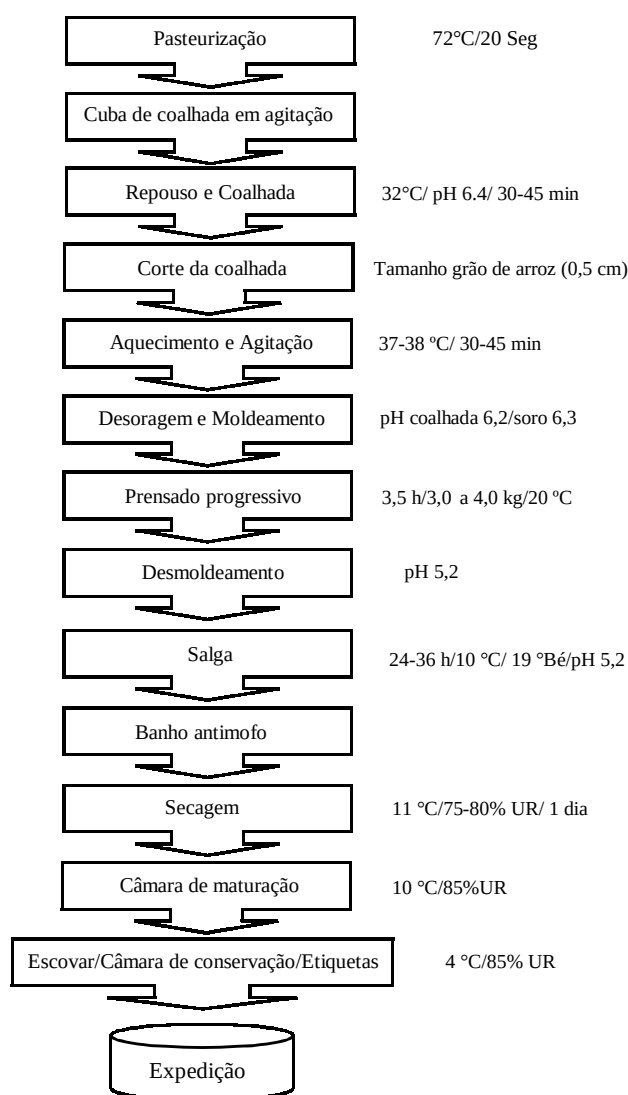
Este trabalho teve por objetivo caracterizar e verificar a influência da temperatura de maturação sobre alguns parâmetros físico-químicos, químicos e bioquímicos, fundamentalmente no processo de proteólise, ao longo da maturação do queijo Zamorano DOP, possibilitando a obtenção de um queijo com qualidade similar ao elaborado mediante o sistema de maturação tradicional, com redução de custos e diminuição do tempo de comercialização.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Elaboração dos queijos

Os queijos foram elaborados na indústria Campostera, na província de Zamora, a partir de leite de ovelha das raças Churra e Castellana pasteurizado, seguindo o processo de elaboração e as condições determinadas pelo Conselho Regulador de Denominação de Origem (MAPA, 1993).

O queijo foi feito de acordo com MAPA (1993), conforme descrito na Figura 1.



Fonte: MAPA (1993).

Figura 1 – Fluxograma da elaboração do queijo Zamorano.

2.2. Diagrama experimental

Os queijos, após a elaboração, foram colocados em câmaras de maturação, de acordo com o diagrama da Figura 2. A partir desse momento, foram retiradas amostras para a realização das análises microbiológicas, físico-químicas, bioquímicas, reológicas e sensoriais. O queijo foi subdividido da seguinte forma: 1/3 para as análises microbiológicas, sensoriais e reológicas e 2/3 para as análises físico-químicas e bioquímicas. A parte correspondente aos 2/3 de cada queijo foi triturada, embalada em pacotes de 30 g cada um e acondicionada e congelada a -30 °C em câmara fria apropriada. Estas amostras foram utilizadas para determinações da proteólise e de outros aspectos físico-químicos, posteriormente, seguindo as normas preconizadas.

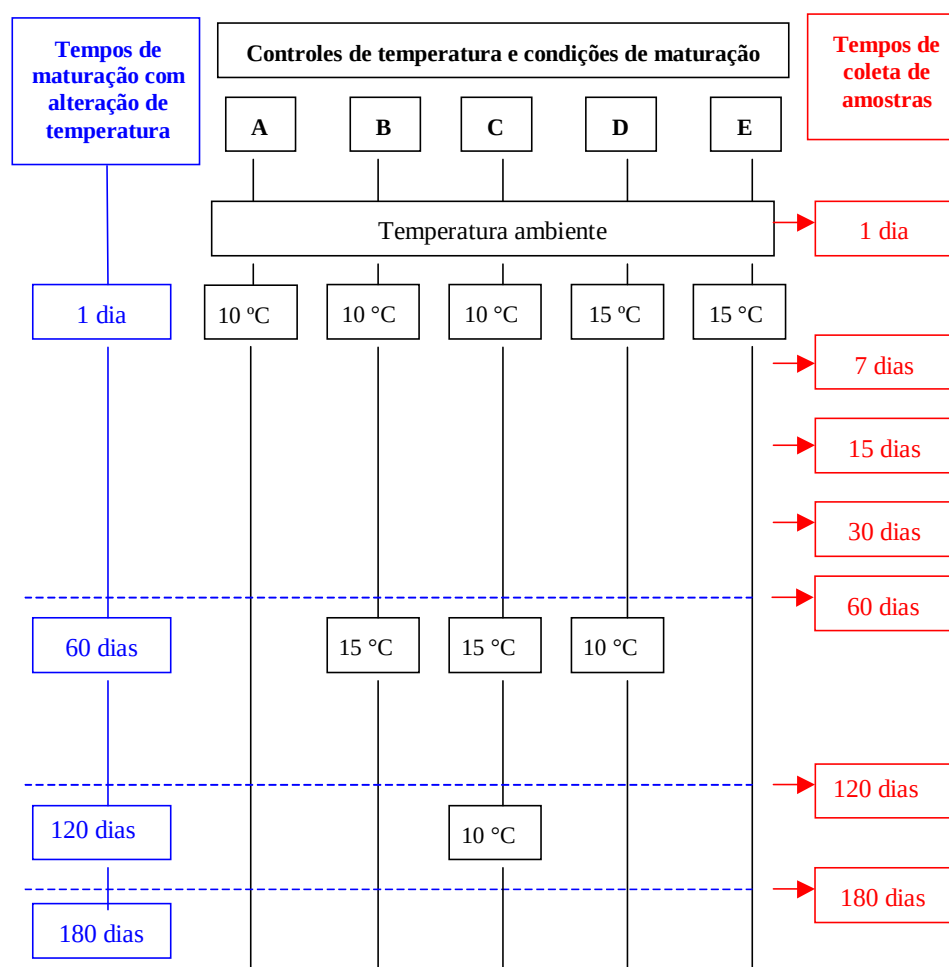


Figura 2 – Diagrama das condições experimentais de maturação do queijo Zamorano.

2.3. Parâmetros físico-químicos

2.3.1. Determinação de pH e acidez titulável

A determinação de pH e acidez titulável do queijo foi realizada segundo os métodos da AOAC 140.22 (1980) e AOAC 920.124 (1990), respectivamente.

2.3.2. Determinação da atividade de água

A determinação da atividade de água foi realizada em aparelho **AQUA LAB** modelo **CX-2 Water Activity Measurement**, da marca **Decagon** (*Pullman, WA, EEUU*). O método empregado se baseia na técnica do ponto de orvalho em um espelho resfriado, aproveitando a tendência natural que tem uma substância para se equilibrar com a umidade relativa do ambiente em que se encontra. A percentagem de umidade relativa em equilíbrio equivale à atividade de água da amostra.

2.4. Parâmetros químicos

2.4.1. Determinação da umidade

A determinação da umidade foi realizada por dessecação em estufa com circulação forçada de ar quente até peso constante, segundo a Norma FIL-IDF 4-A (1982).

2.4.2. Determinação da proteína

A determinação da proteína foi realizada por meio da quantificação do nitrogênio pelo método Kjeldahl em uma unidade de destilação **Kjeltec System-1002** e uma unidade de digestão **System-6-1007 Digester** da marca **Tecator**, segundo a Norma FIL-IDF 20-B (1993). O percentual de proteína foi obtido multiplicando o percentual de nitrogênio total pelo fator 6,38.

2.4.3. Determinação de gordura

A determinação de gordura foi feita pelo método acidobutirométrico de Van Gulik, segundo descrito na Norma FIL-IDF (1996).

2.4.4. Determinação da lactose

A determinação de lactose no queijo foi realizada pelo método gravimétrico de Munson-Walker, por meio de prévia precipitação da matéria protéica com sulfato de zinco e ferrocianeto de potássio, seguindo a Norma FIL-IDF 43 (1967).

2.4.5. Determinação de cloretos

A determinação de cloretos no queijo foi realizada por procedimento descrito por Volhard, segundo a Norma FIL-IDF 17-A (1972).

2.5. Parâmetros indicadores de proteólise

2.5.1. Frações nitrogenadas

2.5.1.1. Determinação do nitrogênio solúvel total

O nitrogênio solúvel total foi determinado pelo método de Johnson, descrito por LINCHSTEIN e OGINSKY (1965), seguindo o procedimento de extração de VAKALERIS e PRICE (1959). O complexo colorido formado pelo nitrogênio presente com o reativo de Nessler em meio alcalino foi lido em uma absorbância de 490 nm diante de uma prova em branco preparada com água destilada. A quantidade de nitrogênio foi calculada referindo-se as leituras espectrofotométricas a um gráfico-padrão preparado com concentrações conhecidas de sulfato amoniacal. As determinações foram realizadas em quadruplicata para cada uma das amostras.

2.5.1.2. Determinação do nitrogênio não-protéico

As determinações de nitrogênio não-protéico foram realizadas pelo método de Johnson, descrito por LINCHSTEIN e OGINSKY (1965), por meio da precipitação das caseínas no homogeneizado preparado para a determinação do nitrogênio solúvel total com ácido tricloroacético a 12%. O complexo colorido formado pelo nitrogênio presente com o reativo de Nessler, em meio alcalino, foi lido sob absorvância de 490 nm diante de uma prova em branco preparada com água destilada. As análises foram realizadas em duplicata.

2.5.1.3. Determinação do nitrogênio amoniacal

O nitrogênio amoniacal (N-NH_3) foi determinado em quadruplicata, em uma suspensão de queijo obtida com solução de Sharp, com prévia precipitação das outras frações nitrogenadas com ácido tricloroacético a 12%, seguindo a técnica descrita por ORDÓÑEZ (1974). O fundamento do método é o mesmo que o descrito para as frações do nitrogênio solúvel total e nitrogênio não-protéico. As leituras espectrofotométricas a 490 nm se referiram ao gráfico padrão utilizado para a determinação do nitrogênio solúvel total e nitrogênio não-protéico.

2.5.1.4. Determinação do nitrogênio aminoacídico

As determinações do nitrogênio aminoacídico (N-NH_2) foram feitas seguindo o método descrito por ORDÓÑEZ (1974), medindo a absorvância a 570 nm do composto colorido que se forma ao reagir os grupos amino com a ninhidrina. O extrato empregado foi o mesmo da determinação de nitrogênio amoniacal. As leituras espectrofotométricas se referiram ao gráfico-padrão obtido com diferentes concentrações de leucina, tratadas da mesma maneira que as amostras.

2.5.1.5. Determinação do nitrogênio protéico, nitrogênio caseínico, nitrogênio polipeptídico e nitrogênio peptídico

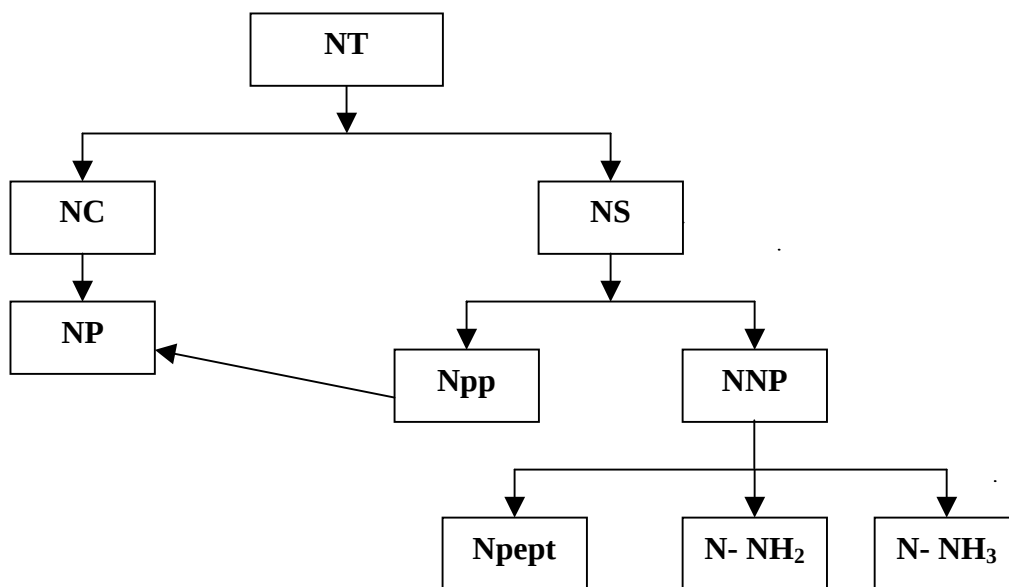
A determinação dessas frações foi baseada em dados obtidos para cada uma das frações nitrogenadas mencionadas anteriormente, de acordo com LENOIR (1963).

O nitrogênio protéico (NP) foi determinado pela diferença entre o nitrogênio total (NT) e o nitrogênio não-protéico (NNP).

O nitrogênio caseínico (NC) foi determinado pela diferença entre o nitrogênio total (NT) e o nitrogênio solúvel total (NST).

O nitrogênio polipeptídico foi determinado pela diferença entre o nitrogênio solúvel total (NST) e o nitrogênio não-protéico (NNP).

O nitrogênio peptídico (Npept) foi determinado pela soma do nitrogênio amoniacal (N-NH₃) com o nitrogênio aminoacídico (N-NH₂) subtraído do nitrogênio não-protéico (NNP).



Fonte: LENOIR (1963).

Figura 3 – Esquema geral do fracionamento químico do nitrogênio utilizado no estudo da proteólise do queijo Zamorano DOP.

2.5.2. Determinação das caseínas

A preparação das amostras foi realizada seguindo a metodologia descrita por FARKYE et al. (1991). A separação e identificação das caseínas e seus produtos de degradação foram realizadas por meio de eletroforese em gel de uréia-poliacrilamida (PAGE), segundo procedimento descrito por ANDREWS (1983). A eletroforese foi realizada em uma unidade **Protean II xi Slab Cell** da Bio-Rad (Richmond, CA, EEUU) alimentada com um equipamento **LKB 2197 Electrofocusing Constant Power Supply** (Bromma, Suécia), utilizando placas de vidro de 16 x 20 cm, com um espaço entre estas de 1–1,5 mm. Para a coloração do gel foi seguida a técnica descrita por BLAKESLEY e BOEZY (1977). Finalmente, a quantificação das bandas eletroforéticas foi realizada mediante um analisador de imagem **PDI The discovery series**, utilizando o software **Diversity One version 1.0**. (New York, NY, EEUU). Os resultados de cada uma das bandas foram expressos como percentual da densidade óptica total.

2.5.3. Determinação dos aminoácidos livres

A separação, identificação e quantificação dos aminoácidos livres foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa, seguindo o procedimento descrito por ALONSO et al. (1994), com algumas modificações.

2.5.3.1. Cromatógrafo

A análises cromatográficas foram realizadas empregando-se um cromatógrafo constituído pelas seguintes partes:

- Módulo de separação **Waters 2690** (Milford, MA, EEUU), que inclui:
 - * Bomba quaternária de baixa pressão.
 - * Seringa de 250 µl.
 - * *Loop* de 10 a 100 µl.
 - * Injetor automático.

- Forno aquecedor da coluna **Spectra-Physics** mod. **SP8792** (*San Jose, CA, EEUU*).
- Coluna de fase reversa C18 **Symmetry**[®] de **Waters**[™] (*Milford, MA, EEUU*) com 5 µm de poro (4,6 x 250 mm).
- Detector UV/VIS por matriz de fotodiodos **Waters 996 Photodiode Array** (*Milford, MA, EEUU*).
- Programa informático **Millenium**³² ® **Chromatography Manager** de **Waters**[™] (*Milford, MA, EEUU*).

2.5.3.2. Extração de aminoácidos livres

Seguindo a metodologia de ALONSO et al. (1994) com algumas modificações, foram misturados 3 g de queijo com ácido perclórico 0,6 N em um mixer da marca **Omni**. A mistura foi centrifugada a 1.790 g durante 20 minutos e o sobrenadante, uma vez retirada a fração lipídica superior, foi filtrado através de papel **Whatman N° 541** (*Maidstone, Reino Unido*). O pH do filtrado foi ajustado a um valor de $7,0 \pm 0,2$ com solução de hidróxido de potássio a 30% (p/v) e refrigerada a uma temperatura de 2 °C durante toda a noite. Durante esse período os extratos obtidos foram filtrados através de filtro **Millipore** (*Molsheim, Francia*) de 0,45 µm de diâmetro de poro - para retirar os sais precipitados – e guardados em tubos **Eppendorf** no freezer a -30 °C, até sua análise.

2.5.3.3. Derivatização das amostras

As amostras, após terem sido extraídas, foram dessecadas por meio de corrente de nitrogênio à temperatura ambiente em alíquotas de 0,1 a 0,5 mL. Uma vez evaporadas, foram derivatizadas, adicionando-se 20 µL de agente derivatizante (mistura de etanol, água Milli-Q, Trietilamina y fenilisotiocianato em uma proporção de 7:1:1:1). Após mistura conveniente com a amostra, esta foi mantida à temperatura ambiente por cinco minutos, na ausência de luz. Decorrido esse tempo, a amostra foi evaporada em presença de gás nitrogênio.

2.5.3.4. Diluição das amostras

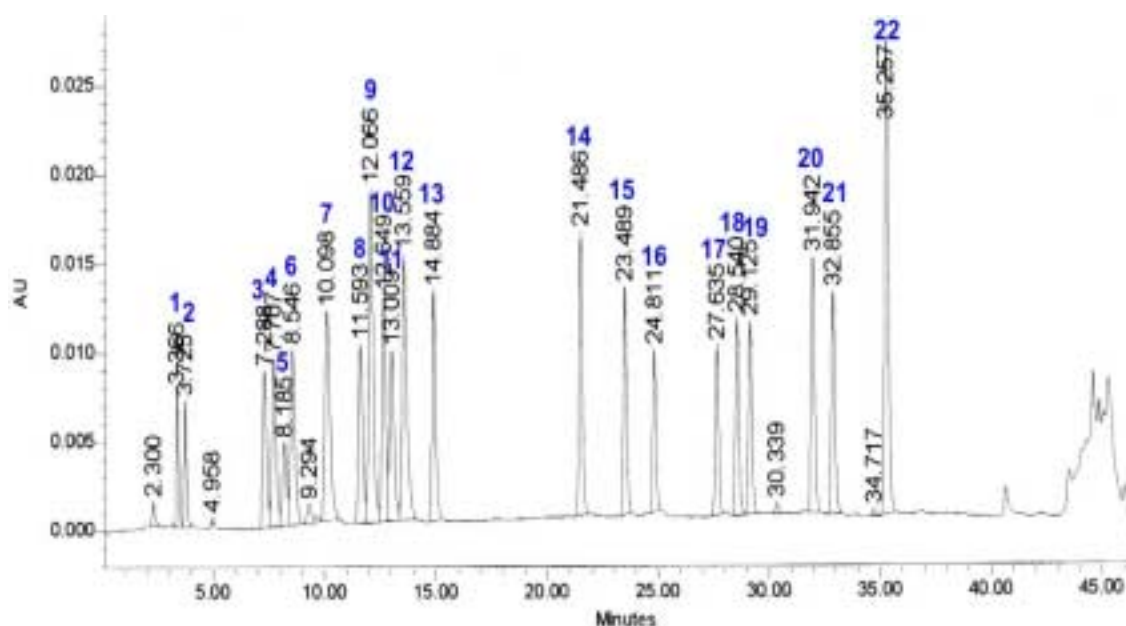
As amostras derivatizadas foram ressuspensas em 1 mL de diluente (fosfato ácido dissódico, pH 7,40, misturado com acetonitrila para HPLC na proporção de 19:1) e agitadas em intervalos até sua completa ressuspensão. Depois se utilizou um microcentrífuga *Eppendorf 5414 (Hamburgo, Alemanha)* para centrifugar as amostras durante cinco minutos. Finalmente, as amostras foram colocadas nos tubos do injetor automático para se proceder à sua análise, injetando-se 20 µL de cada amostra.

2.5.3.5. Preparação dos padrões

Com o objetivo de proceder à quantificação dos aminoácidos livres, foram preparadas 22 soluções-padrão de aminoácidos com as seguintes concentrações: 12,5 mM para a tirosina (Tyr) e 25 mM para os aminoácidos ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), glutamina (Gln), glicina (Gly), histidina (His), arginina (Arg), taurina (Tau), ácido γ-aminobutírico (Gaba), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), valina (Val), metionina (Met), cisteína (Cys), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) e lisina (Lys).

A partir das soluções-padrão de cada aminoácido foram tomados volumes diferentes, com o objetivo de preparar uma solução-padrão que fosse representativa de perfil de aminoácidos presente no queijo estudado, as quais foram derivatizadas nas mesmas condições que as amostras de queijo e injetadas no cromatógrafo, obtendo-se as correspondentes curvas de calibração para cada aminoácido. Estas curvas-padrão permitiram a quantificação dos aminoácidos livres do queijo pelo método do padrão externo.

Um perfil do cromatograma padrão característico está representado na Figura 4, com as áreas correspondentes a cada tempo de retenção (RT).



1 Asp 2 Glu 3 Asn 4 Ser 5 Gln 6.Gly 7.His 8.Tau 9. Gaba 10. Arg 11. Thr 12. Ala 13. Pro 14. Tyr 15. Val 16. Met 17. Cys 18. Ile 19. Leu 20. Phe 21.Trp 22. Lys

Figura 4 – Perfil do cromatograma-padrão para os aminoácidos.

2.5.3.6. Desenvolvimento cromatográfico

Para o desenvolvimento cromatográfico foi utilizado um gradiente de eluição da fase móvel A (dissolução do acetato sódico, pH 6,65, misturado com acetonitrila grau HPLC em uma proporção de 94:6 (v/v)) e fase B (mistura de água grau HPLC e acetonitrila grau HPLC em uma proporção de 40:60 (v/v)). A composição da fase móvel durante o tempo de análise, o fluxo e a curva de gradiente utilizada são mostrados no Quadro 1.

A coluna permaneceu com temperatura de 50 ± 1 °C, controlada por termostato durante toda a análise, e o comprimento de onda do detector foi ajustado para 254 nm.

Os cromatogramas resultantes foram processados utilizando-se o programa informático **Millenium**^{32®} de **Waters**TM (Milford, MA, EEUU).

Quadro 1 – Condições cromatográficas utilizadas na análise cromatográfica

Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	% Fase A	% Fase B	Curva
0	0,90	100	0	---
5,00	0,80	100	0	8
20,00	0,75	78	22	6
40,00	0,80	54	46	6
42,00	1,00	0	100	6
43,00	1,00	0	100	6
44,00	1,00	100	0	6
46,00	1,50	100	0	6
47,00	0,90	100	0	6

2.6. Análise estatística

O delineamento aplicado foi o inteiramente casualizado com duas repetições para as características físico-químicas, caseínas e aminoácidos e quatro repetições para as frações nitrogenadas, de acordo com o esquema em parcelas subdivididas, sendo o fator controle de temperatura – com cinco níveis (A, B, C, D e E) – casualizado nas parcelas e o fator períodos de maturação – com seis níveis (7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias) – nas subparcelas, além da testemunha, que se refere às avaliações realizadas no queijo sem armazenamento no primeiro dia de sua fabricação.

Para as análises das características físico-químicas, químicas, frações nitrogenadas, caseínas e aminoácidos foram realizadas análises de variância, com posterior aplicação do teste de Tukey para comparar as médias dos controles de temperatura dentro de cada um dos seis períodos de maturação a 5% de significância, e análise de regressão em função dos seis períodos de maturação dentro de cada um dos cinco controles de temperatura, a 5% ou 1% de significância. Além disso, foi realizado o teste de Dunnett para comparar as médias dos períodos de maturação dentro de cada controle de temperatura com o primeiro dia de armazenamento a 5% de significância.

Para analisar os 22 aminoácidos foi utilizada a análise de fatores, antes das análises de variância, com o objetivo de diminuir o número de variáveis a serem analisadas, as quais foram os próprios fatores. Realizou-se também um estudo descritivo, representando-se a média de percentagem de aminoácidos total em um histograma expresso em mg de aminoácidos por extrato seco total do queijo, para os diferentes tempos de maturação (7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias). Em se tratando do aminoácido ácido glutâmico, realizou-se um estudo de regressão em função dos períodos de maturação para cada controle de temperatura.

Com base nas médias dos tratamentos, foram calculadas as correlações entre as características físico-químicas e químicas entre as frações nitrogenadas, entre as caseínas, características físico-químicas e químicas com frações nitrogenadas, físico-químicas e químicas com caseínas, físico-químicas e químicas com o ácido glutâmico, frações nitrogenadas com caseínas, frações nitrogenadas com ácido glutâmico e caseínas com ácido glutâmico, a 5% ou 1% de significância, para cada um dos cinco controles de temperatura. Todas as análises foram realizadas no programa SAEG 8.0 (RIBEIRO JÚNIOR, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Aspectos físico-químicos e químicos do queijo Zamorano

3.1.1. Determinação de pH, acidez e atividade de água

Os valores médios de pH, acidez titulável e atividade de água (A_w) para o queijo Zamorano DOP estão apresentados no Quadro 2. O pH é particularmente determinante no desenvolvimento microbiano e na atividade enzimática (CHOISY et al., 1987). Os valores encontrados para o pH do queijo (Quadro 2) estão compreendidos entre 5,46 e 5,85, estando de acordo com os valores estabelecidos pelo MAPA (1993), de 5,1 a 5,8. Observou-se que não ocorreram diferenças ($P>0,05$) entre os controles de temperatura A, B e C após 15 dias de maturação, o mesmo acontecendo para os controles de temperatura D e E, porém apresentando valores menores do que nos controles anteriores até os 120 dias de maturação.

Quadro 2 – Evolução dos parâmetros pH, acidez e atividade de água (a_w) do queijo Zamorano DOP submetido a diferentes controles de temperatura durante a maturação

Parâmetro	CT ¹	Período de maturação (dias)						
		1	7	15	30	60	120	180
pH	A	5,85B	5,78 a B	5,67 a A	5,62 a A	5,61 a A	5,53 a A	5,55 a A
	B		5,75 ab B	5,67 a A	5,64 a A	5,60 a A	5,51 a A	5,54 a A
	C		5,74 b B	5,65 a A	5,63 a A	5,61 a A	5,53 a A	5,56 a A
	D		5,62 c A	5,56 b A	5,52 b A	5,54 b A	5,46 b A	5,54 a A
	E		5,61 c A	5,57 b A	5,53 b A	5,54 b A	5,47 b A	5,54 a A
ACIDEZ	A	1,18 B	1,25 c A	1,42 d A	1,60 b A	1,73 cd A	1,92 d A	1,99 d A
	B		1,26 c A	1,50 c A	1,60 b A	1,76 c A	1,95 cd A	2,09 c A
	C		1,32 b A	1,39 d A	1,62 b A	1,71 d A	1,96 c A	2,14 b A
	D		1,49 a A	1,68 a A	1,81 a A	1,99 b A	2,09 b A	2,11 bc A
	E		1,47 a A	1,63 b A	1,78 a A	2,06 a A	2,17 a A	2,21 a A
AW	A	0,98 B	0,98 a A	0,97 a A	0,97 a A	0,95 a A	0,94 a A	0,93 ab A
	B		0,97 a A	0,97 a A	0,96 a A	0,96 a A	0,93 a A	0,92 b A
	C		0,98 a A	0,97 a A	0,96 a A	0,96 a A	0,94 a A	0,92 b A
	D		0,97 a A	0,97 a A	0,97 a A	0,95 a A	0,94 a A	0,93 ab A
	E		0,97 a A	0,97 a A	0,97 a A	0,95 a A	0,94 a A	0,94 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula da média referente ao tempo de um dia, na linha, não diferem desta pelo teste de Dunnett ($P > 0,05$).

¹ CT = Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Esses valores de pH são compatíveis com as reações químicas e enzimáticas que ocorrem no queijo. É comum para este tipo de queijo de massa dura manter um pH próximo de 5,5, diferindo de outros tipos de queijo (CHOISY et al., 1987). Os valores encontrados para o pH ao longo da maturação e nos diferentes controles de temperatura foram semelhantes aos encontrados por POMAR et al. (2001a), sendo superior aos descritos por GONZÁLEZ-VIÑAS et al. (1999) para queijos de leite de ovelha de características semelhantes. Outros autores, como CORSETTI et al. (1998) e SERRANO et al. (1997), também encontraram valores semelhantes em estudos feitos com queijo de leite de ovelha na Itália e Espanha, respectivamente. Desse modo, pode-se maturar o queijo a 15 °C, sem prejuízos para a avaliação do pH.

Para os valores médios encontrados na determinação da acidez, observa-se que aos 30 dias de maturação os controles de temperatura A, B e C não diferiram ($P>0,05$) entre si, bem como os controles de temperatura D e E. A partir dos 60 dias de maturação, o controle de temperatura E, submetido a 15 °C durante todo o período de maturação, diferiu ($P<0,05$) dos demais, indicando que a temperatura de maturação é importante no controle da flora microbiana dos queijos (FOLKERTSMA et al., 1996) e influenciando diretamente na produção de ácido láctico e na liberação de H^+ no meio (YAZICI e DERVISOGLU, 2002).

Os valores observados para a acidez aos 120 dias de maturação nos controles de temperatura D e E, mostrados no Quadro 2, foram de 2,09 e 2,17 g de ácido láctico/100 g de extrato seco, respectivamente. Essas diferenças na acidez do queijo Zamorano DOP, segundo POMAR et al. (2000a), estão relacionadas com a umidade, a concentração de sal e a atividade de água (A_w), que influenciam o crescimento e a atividade da flora microbiana do queijo, principalmente a flora láctica secundária. A produção de ácido favorece a redução do pH e, conseqüentemente, impede o desenvolvimento de bactérias deteriorantes, além de influenciar o sabor do queijo (CHOISY et al., 1987; EL SODA, 1997).

Para os valores médios da atividade de água (A_w), observa-se que não ocorreram diferenças ($P>0,05$) quando submetidos a diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E), em todos os períodos de maturação, com exceção

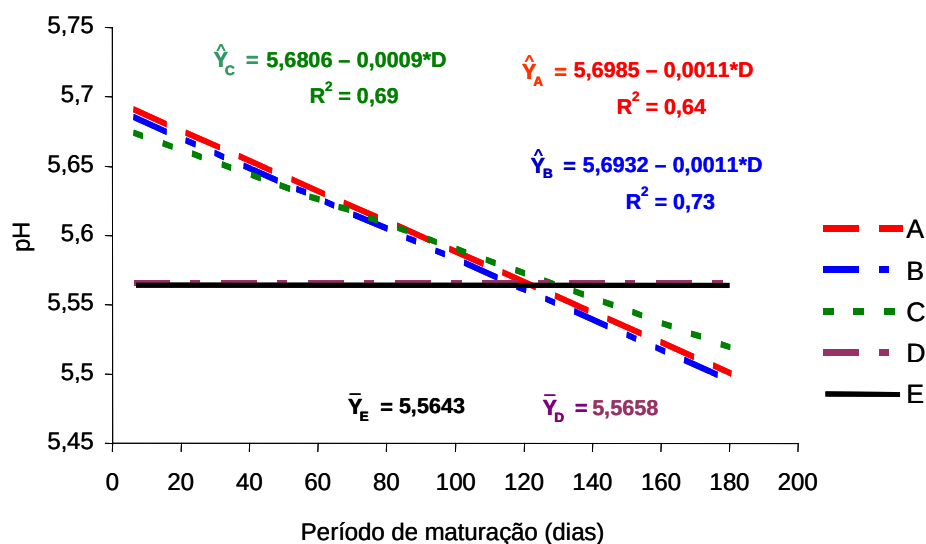
de pequenas diferenças ($P < 0,05$) evidenciadas aos 180 dias de maturação. A atividade de água no queijo é influenciada por dois parâmetros fundamentais: o teor de água e o teor de sal do queijo (CHOISY et al., 1987; DUMAIS et al., 1991). A A_w influencia as reações bioquímicas e o desenvolvimento dos microrganismos (FURTADO, 1991).

Conforme se observa na Figura 5, os valores de pH ao longo da maturação nos controles de temperatura A, B e C tiveram diminuição ($P < 0,05$), enquanto para os controles de temperatura D e E nos diferentes tempos de maturação eles se mantiveram constantes, indicando a semelhança ($P > 0,05$) entre os seus valores aos 180 dias (Quadro 2).

O efeito do pH está intimamente relacionado com a umidade, o sal e o conteúdo de cálcio (LAWRENCE et al., 1987). Com concentração de sal na umidade abaixo de 5% o pH decresce, presumivelmente devido à ação das bactérias *starter* presentes no queijo (YAZICI e DERVISOGLU, 2002). Esse decréscimo de pH pode ser devido à conversão do resíduo da lactose para ácido láctico e formação de íons H^+ (MADKOR et al., 1987). O decréscimo do pH no início da estocagem também foi observado por PRASAD e ALVAREZ (1999), o que pode explicar o efeito da diminuição do pH no queijo Zamorano DOP ao longo da maturação, para os queijos dos controles de temperatura A, B e C.

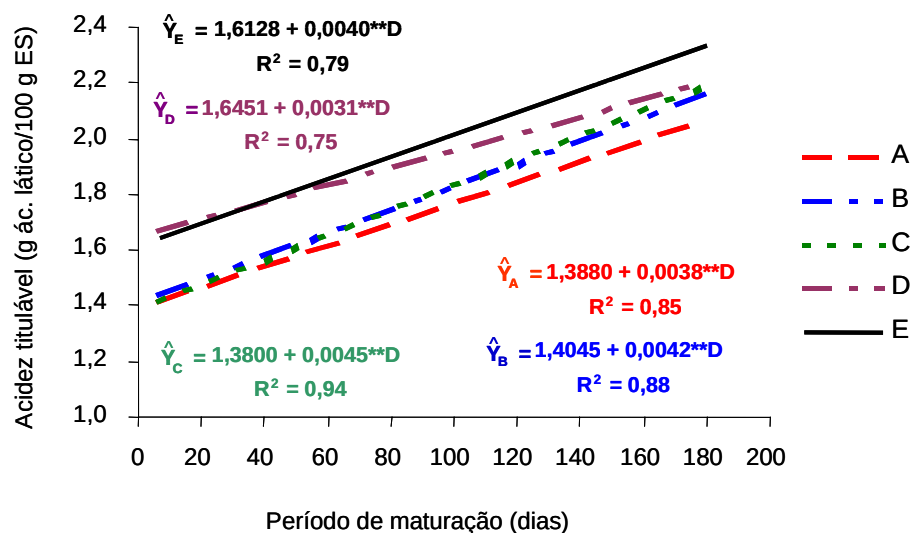
Conforme a análise de regressão em função dos períodos de maturação, a acidez aumenta ($P < 0,01$) em todos os controles de temperatura, o que está inversamente proporcional ao efeito do pH (Figura 6).

Na Figura 7 observa-se diminuição ($P < 0,01$) da A_w durante todo o período de maturação do queijo para os diferentes controles de temperatura, ocorrida provavelmente em razão do grau de penetração do sal para o interior do queijo e das reações proteolíticas que contribuíram para o aumento dos grupamentos iônicos capazes de fixar água (POMAR et al., 2001a). A A_w representa um fator importante para o crescimento dos microrganismos e influencia as reações enzimáticas que ocorrem no queijo durante a maturação (DUMAIS et al., 1991).



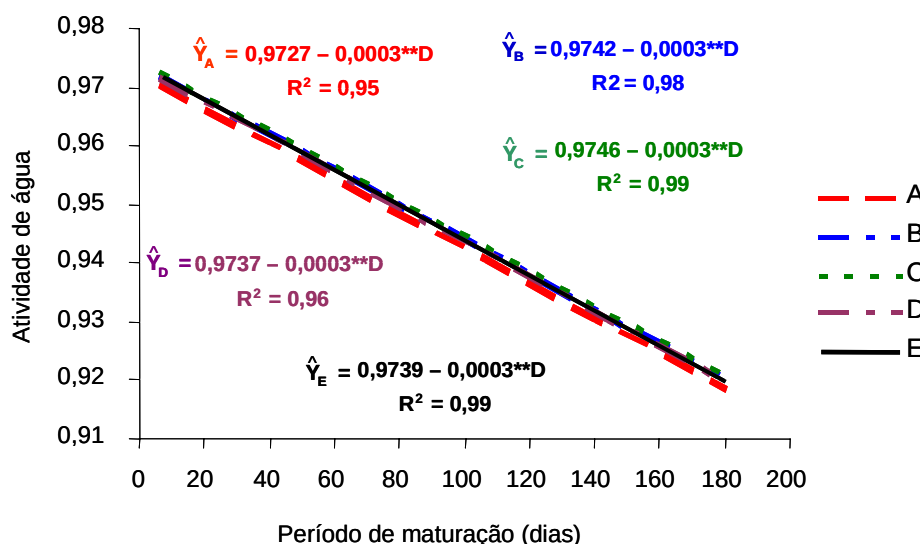
* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

Figura 5 – Estimativas do pH do queijo Zamorano DOP em função do período de maturação (dias), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 6 – Estimativas da acidez titulável (g de ácido lático/100 g de extrato seco) do queijo Zamorano DOP em função dos períodos de maturação (dias), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 7 – Estimativa da atividade de água do queijo Zamorano DOP em função dos períodos de maturação (dias) para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

3.1.2. Determinações de extrato seco (ES), proteínas, gordura, lactose e umidade (expressa em % de extrato seco total) e cloretos na umidade e no extrato seco total

No Quadro 3 são apresentados os valores de extrato seco (expresso em 100 g de queijo), proteínas, gordura, lactose e cloretos no extrato seco e na umidade (expressos em % de extrato seco total) e umidade. A quantidade de extrato seco (ES) aumentou ($P < 0,01$) com a evolução da maturação em todos os controles de temperatura, provavelmente influenciada pela evaporação e pelo aumento da concentração de sal na umidade do queijo. Quando se comparam os controles de temperatura dentro de cada período de maturação, observa-se que os valores de extrato seco são superiores ($P < 0,05$) nos controles D e E em relação aos controles A, B e C, aos 7 e 15 dias. Nos períodos seguintes, ou não ocorreram diferenças ($P < 0,05$) ou ocorreram diferenças pequenas ($P < 0,05$) entre eles. Esses dados foram semelhantes aos obtidos para o queijo Fiore Sardo

Quadro 3 – Composição média dos principais componentes do queijo Zamorano DOP ao longo da maturação, sob modificações na temperatura de maturação

Composição Química	CT ¹	Períodos de maturação (dias)						
		1	7	15	30	60	120	180
ES	A	60,20 B	60,95 b B	61,80 b A	63,73 b A	67,00 a A	69,82 ab A	71,55 b A
	B		60,85 b B	61,90 b A	63,40 b A	66,95 a A	70,15 a A	73,06 a A
	C		60,54 b B	61,96 b A	63,48 b A	66,89 a A	69,71 ab A	72,40 ab A
	D		62,84 a A	63,79 a A	64,18 b A	66,77 a A	69,05 b A	72,40 ab A
	E		62,52 a A	63,50 a A	65,29 a A	66,89 a A	70,43 a A	72,76 a A
Proteína	A	38,82 B	37,44 a A	36,77 a A	36,55 b A	34,31 b A	33,93 a A	33,40 ab A
	B		37,39 a A	37,13 a A	36,24 b A	36,09 a A	33,70 a A	32,88 b A
	C		37,42 a A	37,09 a A	35,99 b A	34,19 b A	34,00 a A	33,49 ab A
	D		37,21 a A	36,51 a A	37,35 a A	34,18 b A	34,33 a A	33,62 ab A
	E		36,88 a A	36,78 a A	36,07 b A	34,24 b A	33,80 a A	33,97 a A
Gordura	A	55,32 B	56,28 ab A	56,43 ab A	56,25 ab B	55,97 a B	55,57 ab B	56,67 a A
	B		56,75 a A	56,88 a A	56,89 a A	55,95 a B	55,45 ab B	54,37 c B
	C		56,74 a A	55,44 bc B	56,63 ab A	55,91 a B	55,73 ab B	55,80 ab B
	D		56,09 ab B	55,26 c B	56,33 ab A	56,16 a B	56,38 a A	55,73 ab B
	E		55,60 b B	55,17 c B	55,64 b B	56,21 a B	55,30 b B	55,59 b B
Lactose	A	1,44 B	1,12 b A	0,94 a A	0,73 a A	0,46 a A	-	-
	B		1,04 c A	0,87 a A	0,63 b A	0,38 b A	-	-
	C		1,20 a A	0,90 a A	0,63 b A	0,40 ab A	-	-
	D		0,82 d A	0,69 b A	0,52 c A	-	-	-
	E		0,82 d A	0,65 b A	0,47 c A	-	-	-
Cloretos/ES	A	1,43 B	1,95 a A	2,06 ab A	2,33 b A	2,45 b A	2,60 a A	2,69 ab A
	B		1,96 a A	2,09 a A	2,44 a A	2,58 a A	2,63 a A	2,73 a A
	C		1,90 ab A	2,05 ab A	2,31 bc A	2,06 d A	2,58 a A	2,62 b A
	D		1,87 ab A	1,99 b A	2,11 d A	2,28 c A	2,60 a A	2,67 ab A
	E		1,84 b A	2,03 ab A	2,22 c A	2,34 c A	2,56 a A	2,74 a A
Cloretos/Umidade	A	2,16 B	2,62 c A	3,33 b A	4,10 bc A	5,44 a A	6,02 ab A	6,77 c A
	B		3,06 ab A	3,39 ab A	4,27 ab A	5,43 a A	6,18 a A	7,41 a A
	C		2,92 b A	3,33 b A	4,02 c A	5,37 a A	5,94 bc A	6,87 bc A
	D		3,17 a A	3,49 ab A	3,78 d A	4,78 b A	5,79 c A	7,01 b A
	E		3,06 ab A	3,52 a A	4,29 a A	4,73 b A	6,09 ab A	7,30 a A
Umidade	A	39,80 B	39,80 aB	38,21 a A	36,27 a A	33,01 a A	30,18 ab A	28,46 a A
	B		39,15 a B	38,10 a A	36,61 a A	33,06 a A	29,85 b A	26,94 b A
	C		39,47 a B	38,04 a A	36,53 a A	33,12 a A	30,30 ab A	27,60 ab A
	D		37,17 b A	36,21 b A	35,82 a A	33,23 a A	30,95 a A	27,60 ab A
	E		37,48 b A	36,50 b A	34,72 b A	33,12 a A	29,57 b A	27,24 b A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula da média referente ao tempo de um dia, na linha, não diferem desta pelo teste de Dunnett (P > 0,05).

¹ CT = Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

(PIREDDA et al., 1998), Roncal (MILLÁN et al., 1992), Manchego (SERRANO et al., 1997), todos elaborados a partir de leite de ovelha. Desse modo, pode-se usar o controle de temperatura E sem alterar os valores de extrato seco do queijo, aos 120 dias de maturação.

Os valores da proteína apresentaram diminuição ($P<0,05$) em função dos períodos de maturação para todos os controles de temperatura (A, B, C, D e E), havendo diferenças maiores ($P<0,05$) nos 120 e 180 dias de maturação, com maior perda ocorrendo no controle B, cuja média foi inferior ($P<0,05$) à dos demais, aos 180 dias. A proteína em relação ao ES (extrato seco) e a gordura devem manter-se uniforme durante os períodos de maturação. No entanto, os valores encontrados neste experimento apresentaram diminuição ao longo dos períodos de maturação, especialmente para os valores de proteínas (Quadro 3); isso deve ter ocorrido devido provavelmente à possível falta de homogeneização da massa no momento da amostragem.

Os valores determinados para gordura, expressos em percentagem de extrato seco (Quadro 3), não apresentaram mudanças ($P<0,01$) ao longo dos períodos de maturação, com exceção do controle de temperatura B, cujos valores diminuíram ($P<0,05$) em função dos períodos de maturação. Os valores para gordura no extrato seco foram em torno de 55 a 57%, estando de acordo com o estabelecido para o queijo Zamorano (MAPA, 1993).

O teor de lactose no queijo diminuiu ($P<0,01$) em função dos períodos de maturação, para os controles de temperatura A, B e C até os 60 dias e para os controles de temperatura D e E até os 30 dias de maturação, conforme mostra o Quadro 3. Aos 7, 15 e 30 dias de maturação, os valores encontrados nos controles D e E foram os menores ($P<0,05$). Isso indica que nos queijos, estando em temperaturas de 10 °C, como nos controles A, B e C, ocorrem comportamentos diferenciados, influenciados pelos microrganismos neles presentes e, portanto, com poucas reações enzimáticas para o desdobramento da lactose em ácido láctico. Por outro lado, nos queijos armazenados nos controles de temperatura D e E, submetidos a temperaturas de 15 °C, houve aceleração das reações enzimáticas. Esses valores não estão de acordo com os encontrados por

ROMÁN-BLANCO et al. (1999) para o queijo Castelhana, nos quais constataram a presença de lactose até mais de três meses de maturação, diferindo da maioria dos queijos, em que geralmente a lactose desaparece após uma semana de maturação (CHOISY et al., 1987).

A evolução dos conteúdos de cloretos, expressos como porcentagens de extrato seco nos queijos submetidos a diferentes controles de temperatura durante a maturação (Quadro 3), mostrou que há uma relação semelhante aos valores obtidos para os cloretos na umidade. Esses resultados indicam que o teor de cinzas pode ser influenciado pela alta quantidade de sal no queijo (YAZICI e DERVISOGLU, 2002). Do mesmo modo, o conteúdo de cloretos aumentou ($P<0,01$) em função dos períodos de maturação, e, aos 180 dias, maiores valores foram encontrados para os controles A, D e E.

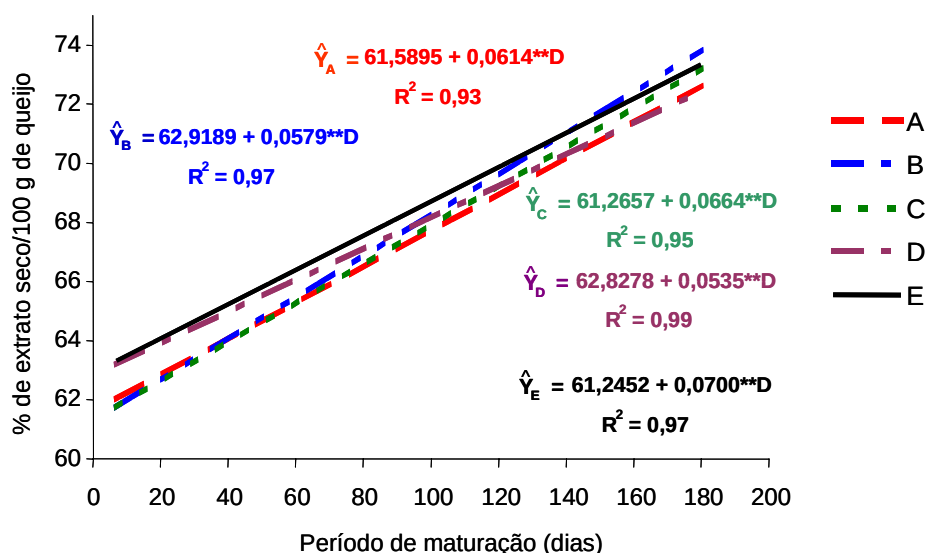
Com referência aos valores médios para a determinação de sal na umidade (Quadro 3), observou-se que aos 60 dias de maturação os controles de temperatura A, B e C não diferiram ($P>0,05$) entre si, bem como os controles de temperatura D e E. Aos 120 dias, os controles A, B e E não diferiram ($P>0,05$) entre si. Aos 180 dias de maturação, os maiores valores foram encontrados para os controles de temperatura B e E ($P<0,05$), demonstrando assim que temperaturas constantes de 15 °C após 60 dias de maturação acarretaram maior concentração de sal na umidade do queijo. Portanto, maiores temperaturas após 60 dias fazem com que a solubilidade na matriz do queijo seja maior. A quantidade de sal na massa do queijo aumentou ($P<0,01$) até 180 dias de maturação para todos os controles de temperatura, em função do aumento da pressão osmótica entre a umidade e o sal, explicado pelo fato de que os fenômenos osmóticos realizam-se na fase aquosa do queijo; portanto, quanto maior o teor de umidade, maior será a quantidade de sal absorvida. Por isso, queijos duros – tipo Zamorano DOP – salgam-se muito lentamente. A água difundida no queijo restaura o equilíbrio da pressão osmótica (GUINEE e FOX, 1993). Essas altas concentrações de sal encontradas nas amostras dos queijos estão relacionadas diretamente com a perda de umidade do queijo.

A determinação da umidade apresentada no Quadro 3 mostra que os valores foram inversamente proporcionais aos valores do extrato seco. Portanto, diminuindo o conteúdo de água, aumenta-se o extrato seco total do queijo. A duração da maturação é inversamente proporcional ao conteúdo de umidade do queijo e, obviamente, à intensidade do *flavor* desejável (EL SODA, 1997).

Os teores máximos de umidade e o mínimo de gordura no extrato seco são as principais características controladas por lei, o que acaba estabelecendo a uniformidade na produção de queijo (FURTADO, 1991). Baseado no fato de que o extrato seco e o teor de umidade são fatores indispensáveis para comercialização dos queijos, respectivamente na Europa e no Brasil, e pressupondo-se que a comercialização do queijo Zamorano DOP se dá aos 100 dias de maturação, segundo o controle de temperatura A, estima-se, com base nas equações de regressões (Figuras 8 e 9), que os valores de extrato seco e de umidade são, respectivamente, iguais a 67,73% e 32,33%. Desse modo, considerando-se que eles são ideais para comercialização, estes valores foram obtidos no controle de temperatura E, aos 83 e 82 dias de maturação, respectivamente. Conseqüentemente, pode-se reduzir 17 dias de maturação aplicando o controle de temperatura E (15 °C), sem prejudicar a qualidade dessas duas características.

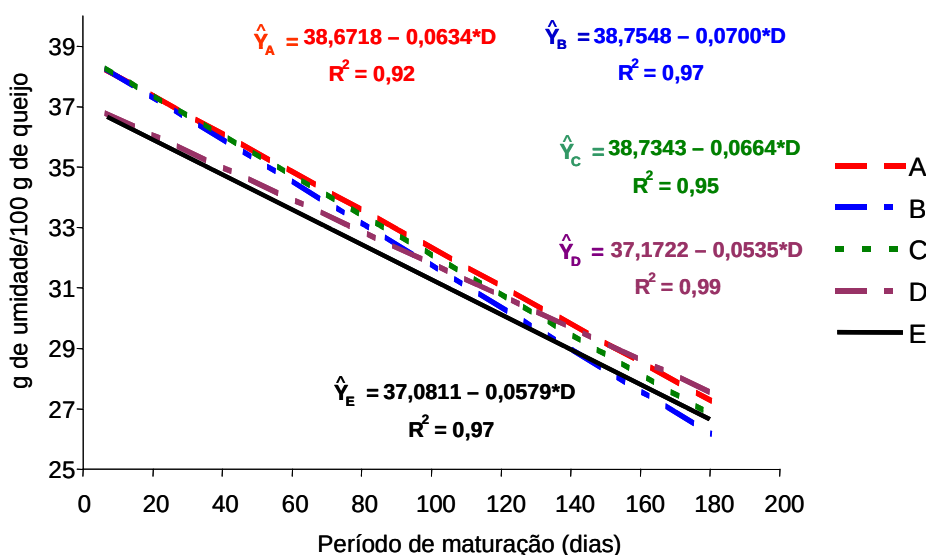
A determinação da gordura (Figura 10) no queijo ao longo dos períodos de maturação se manteve constante ($P>0,05$), com exceção do queijo submetido ao controle de temperatura B, que provocou decréscimo ($P<0,01$) nos valores da gordura. Pelos dados observados, esse valor pode não expressar relação de causa e efeito (WERKEMA, 1995), visto que a regressão pode ter sido devida a uma queda brusca aos 180 dias, fazendo com que ajustasse uma reta com declividade negativa em relação a todos os outros valores dos períodos anteriores, que não apresentaram tendência à diminuição.

O conteúdo de lactose expresso em percentagem de extrato seco, conforme expressa a curva de regressão da Figura 11, teve declividade negativa para todos os controles de temperatura, porém, para os controles de temperatura A, B e C, isso ocorreu até os 60 dias de maturação, ao passo que para os controles D e E foram obtidos valores até os 30 dias, o que indica a influência do aumento da temperatura durante a maturação, acelerando os processos enzimáticos da microbiota do queijo e, conseqüentemente, ocorrendo maior degradação da lactose.



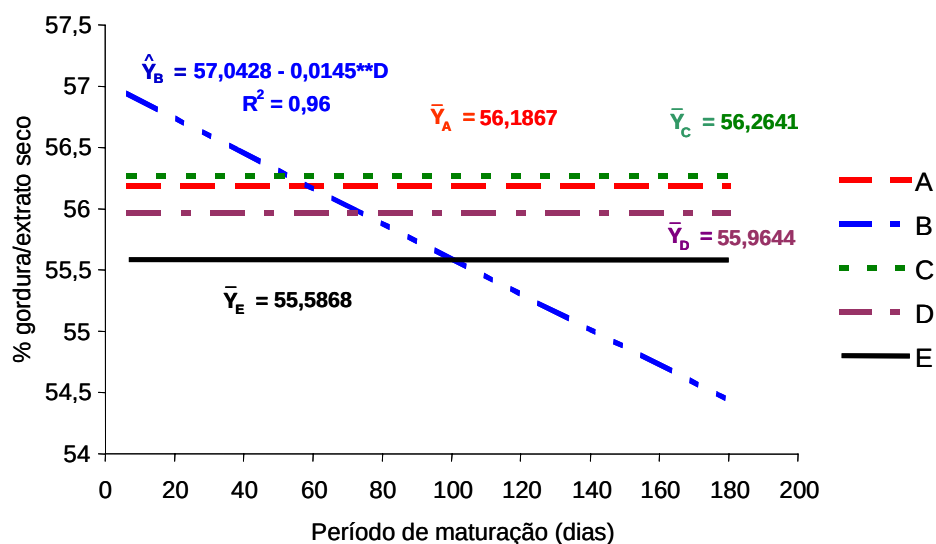
** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 8 – Estimativas do extrato seco expresso em 100 g de queijo Zamorano DOP em função dos períodos de maturação (dias), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



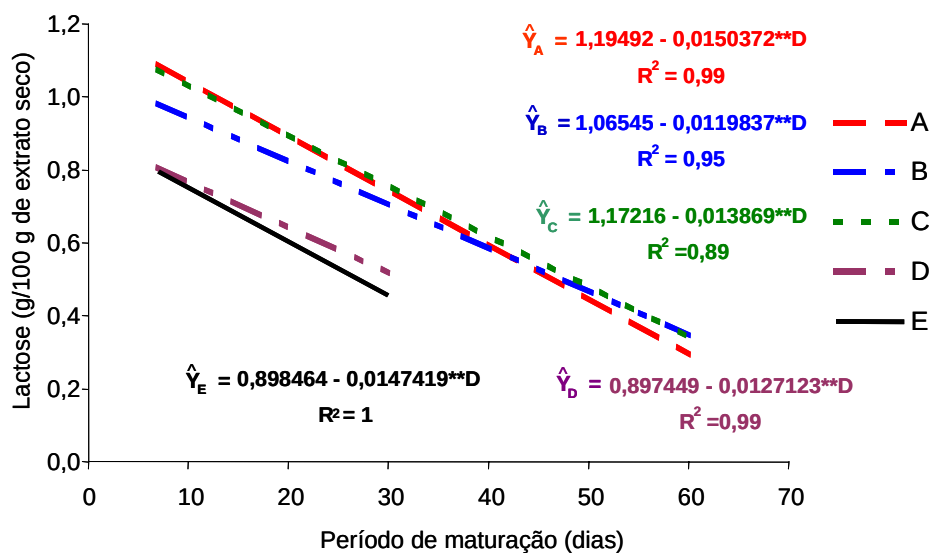
** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 9 – Estimativas da umidade expressa em 100 g de queijo Zamorano DOP em função dos períodos de maturação (dias), nos diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

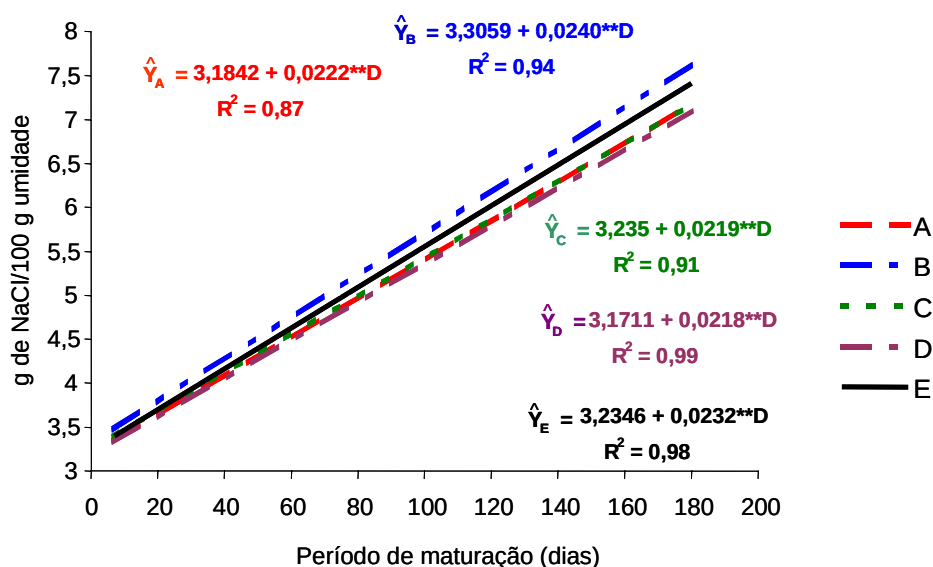
Figura 10 – Estimativas da gordura no queijo Zamorano DOP em função dos períodos de maturação (dias), submetido a diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 11 – Estimativas do conteúdo de lactose presente no queijo Zamorano DOP em função dos períodos de maturação (dias), submetido a diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

A evolução do conteúdo de sal na umidade do queijo é muito importante, pelo fato de este ser um regulador das reações enzimáticas, influenciado pelo teor de gordura e umidade do queijo (MISTRY e KASPERSON, 1998). Pela equação de regressão (Figura 12), observa-se aumento ($P < 0,01$) da quantidade sal na umidade do queijo ao longo dos períodos de maturação em todos os controles de temperatura, sendo mais evidente nos controles B e E, provavelmente influenciado pela maior temperatura de maturação aplicada durante o experimento (15 °C), ocorrendo maior perda de umidade e maior concentração de sal.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 12 – Estimativa do conteúdo de cloretos na umidade do queijo Zamorano DOP em função dos períodos de maturação (dias), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Os valores para cloretos no extrato seco demonstraram a mesma linearidade que cloretos na umidade do queijo, sendo que foram apresentados apenas (Figura 13) para observar a quantidade de sal sobre a matéria seca do queijo em termos de proporções percentuais.

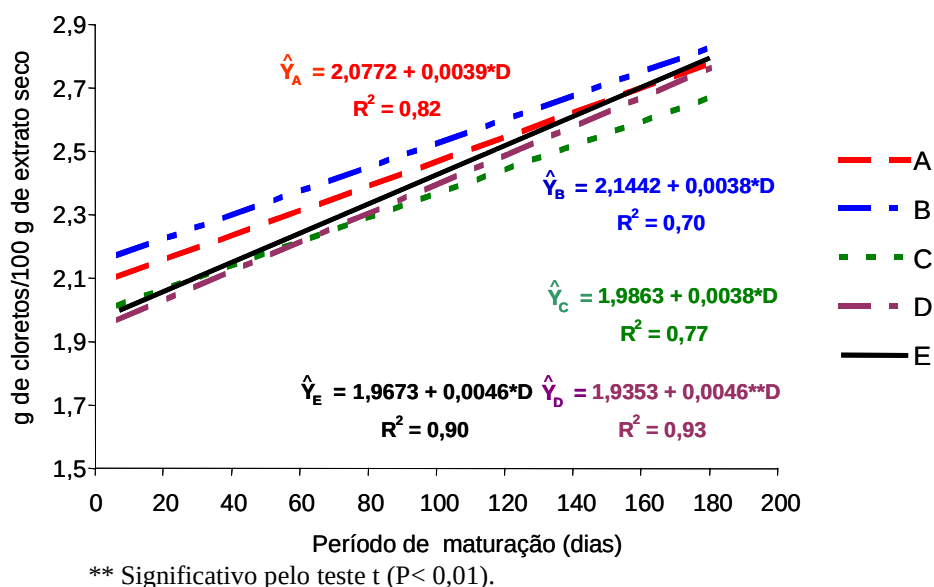


Figura 13 – Estimativas do conteúdo de cloretos no extrato seco do queijo Zamorano DOP em função dos períodos de maturação (dias), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

3.1.3. Correlações entre os aspectos físico-químicos

Os fatores físico-químicos correlacionaram-se entre si ($P < 0,01$), com exceção da gordura, o que indica baixo grau de associação entre a percentagem de gordura e os outros parâmetros avaliados. No entanto, a gordura correlacionou-se com as demais características no controle de temperatura B, o que contrariou a resposta esperada. Esse fato pode ter ocorrido em função de uma queda mais acentuada do valor da gordura dos 120 aos 180 dias (Quadro 4). Apesar de essa significância ter ocorrido, o coeficiente de correlação pode não estar implicado necessariamente na relação (WERKEMA, 1995). Nestes casos, o valor para a gordura aos 180 dias, que é um período bastante distante dos demais, pode ter gerado a tendência de linearidade, sem, no entanto, esta ter sido apresentada nos demais períodos.

Quadro 4 – Correlações entre os aspectos físico-químicos dos controles de temperatura A, B, C, D e E

	ACIDEZ	AW	ES	UMID	GORD	PROT	LACT	CLUM	CLES
A									
pH	-0,96*	0,86*	-0,88**	0,91**	0,30	0,86*	0,93**	-0,91**	-0,94**
ACIDEZ		-0,97**	0,98**	-0,99**	-0,21	-0,96**	-0,99**	0,99**	0,99**
AW			-0,99**	0,99**	0,11	0,98**	0,98**	-0,96**	-0,96**
ES				-0,99**	-0,18	-0,98**	-0,99**	0,99**	0,97**
UMID					0,18	0,98**	0,99**	-0,99**	-0,98**
GORD						0,23	0,27	-0,17	-0,21
PROT							0,96**	-0,98**	-0,95**
LACT								-0,98**	-0,97**
Cl/UM									-0,98**
B									
pH	-0,96**	0,91**	-0,92**	0,92**	0,78*	0,90**	0,98**	-0,91**	-0,93**
ACIDEZ		-0,96**	0,97**	-0,97**	-0,89**	-0,95**	-0,98**	0,98**	0,95**
AW			-0,99**	0,99**	0,96**	0,99**	0,97**	-0,98**	-0,89**
ES				-1,00**	-0,96**	-0,97**	-0,97**	0,99**	0,91**
UMID					0,96**	0,97**	0,97**	-0,99**	-0,91**
GORD						0,93**	0,88**	-0,95**	-0,79*
PROT							0,95**	-0,96**	-0,86*
LACT								-0,97**	-0,95**
Cl/UM									0,94**
C									
pH	-0,91**	0,87*	-0,90**	0,90**	0,60	0,89**	0,97**	-0,90**	-0,88*
ACIDEZ		-0,98**	0,99**	-0,99**	-0,38	-0,95**	-0,97**	0,98**	0,92**
AW			-0,98**	0,98**	0,45	0,91**	0,94**	-0,97**	-0,89**
ES				-1,00**	-0,47	-0,96**	-0,97**	0,99**	0,86*
UMID					0,47	0,96**	0,97**	-0,99**	-0,86*
GORD						0,40	0,48	-0,44	-0,32
PROT							0,96**	-0,98**	-0,77*
LACT								-0,97**	-0,90**
Cl/UM									-0,83*
D									
pH	-0,77*	0,58	-0,52	0,52	-0,41	0,48	0,69	-0,55	-0,71
ACIDEZ		-0,92**	0,90**	-0,90**	0,23	-0,88**	-0,97**	0,91**	0,95**
AW			-0,99**	0,99**	-0,12	0,93**	0,91**	-0,99**	0,98**
ES				-1,00**	0,04	-0,90**	-0,87*	1,00**	0,97**
UMID					-0,04	0,90**	0,87*	-1,00**	-0,97**
GORD						-0,04	-0,30	0,08	0,20
PROT							0,93**	-0,90**	-0,88**
LACT								-0,88*	-0,92**
Cl/UM									0,98**
E									
pH	-0,76*	0,58	-0,65	0,65	0,12	0,73	0,73*	-0,62	-0,70
ACIDEZ		-0,92**	0,94**	-0,94**	0,23	-0,98**	-0,99**	0,93**	0,97**
AW			-0,99**	0,99**	-0,03	0,89**	0,86*	-0,99**	-0,97**
ES				-1,00**	0,04	-0,91**	-0,88**	0,99**	0,98**
UMID					-0,04	0,91**	0,88**	-0,99**	-0,98**
GORD						-0,31	-0,35	0,03	0,10
PROT							0,98**	-0,88**	-0,92**
LACT								-0,86*	-0,92**
Cl/UM									0,98**

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Outro aspecto que merece destaque foi com relação ao pH para os controles de temperatura D e E, que não se correlacionou ($P>0,05$) com as demais características, com exceção da acidez titulável e da lactose.

3.2. Parâmetros proteolíticos

3.2.1. Evolução das frações nitrogenadas

A) Determinações das frações nitrogenadas no queijo Zamorano DOP

No Quadro 5, observa-se que ao longo dos períodos de maturação ocorreram diferenças ($P<0,05$) entre os controles de temperatura para o NS em pH 4,6, NNP em TCA 12% e fração amínica ($N-NH_2$) e com relação ao nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$). Aos 60 dias de maturação não houve diferença ($P>0,05$) entre os controles de temperatura A, B e C, porém os valores foram menores ($P<0,05$) em relação aos encontrados nos controles D e E, que se encontravam a 15 °C. Aos 120 dias de maturação já era mais evidente a proteólise em todos os controles de temperatura, sendo mais acentuada ($P<0,05$) para os queijos que se encontravam nos controles de temperatura D e E, cujo aumento de temperatura favoreceu as reações enzimáticas e acelerou o processo de maturação, possivelmente pelo aumento da solubilidade da caseína. A percentagem de nitrogênio solúvel no queijo de um dia foi de 6,55% do NT, apresentando diferença em relação aos 180 dias de maturação para o controle de temperatura A de 18,56 e para o controle de temperatura E de 23,50 pontos percentuais do NS/NT.

Os valores encontrados para o NS do queijo Zamorano, no controle de temperatura A, foram semelhantes aos encontrados para o queijo Manchego por POVEDA et al. (1999); os controles de temperatura B e E foram semelhantes aos obtidos por GAYA et al. (1990) e superiores aos encontrados por ORDÓÑEZ et al. (1998) para o queijo Idiazábal, em relação a todos os períodos de maturação.

Quadro 5 – Médias de nitrogênio solúvel (NS), nitrogênio não-protéico (NNP), nitrogênio amínico (NH₂) e nitrogênio amoniacal (NH₃) no queijo Zamorano DOP, submetido a diferentes condições de temperatura durante a maturação

Componentes Nitrogenados	CT ¹	Período de maturação (dias)						
		1	7	15	30	60	120	180
NS	A	6,55 B	8,49 a A	9,43 c A	12,72 c A	18,86 c A	23,21 e A	25,11 d A
	B		7,67 b A	8,92 d A	12,91 bc A	18,62 c A	25,47 c A	32,83 a A
	C		8,74 a A	9,48 c A	13,23 b A	18,93 c A	25,02 d A	29,74 b A
	D		8,74 a A	13,16 a A	16,70 a A	23,14 a A	26,89 b A	28,63 c A
	E		8,83 a A	11,89 b A	16,78 a A	22,67 b A	27,72 a A	30,05 b A
NNP	A	3,25 B	4,23 b A	4,60 b A	6,69 b A	9,27 c A	12,06 d A	15,79 d A
	B		4,25 abA	4,52 b A	6,94 b A	9,86 c A	15,12 c A	19,54 b A
	C		4,15 b A	4,38 b A	6,38 c A	9,77 c A	15,29 c A	17,30 c A
	D		4,50 a A	5,73 a A	9,19 a A	12,01 b A	16,18 b A	17,35 c A
	E		4,36 abA	5,68 a A	9,29 a A	13,24 a A	17,39 a A	19,87 a A
N-NH ₃	A	0,62 B	0,52 c A	0,54 b A	0,53 c A	0,57 b A	0,55 d A	0,58 b A
	B		0,54 c A	0,54 b A	0,52 c A	0,56 b A	0,60 bc B	0,61 b B
	C		0,55 bcA	0,54 b A	0,54 c A	0,57 b A	0,59 c A	0,58 b A
	D		0,58 b A	0,59 a A	0,60 b B	0,58 b A	0,63 b B	0,58 b A
	E		0,65 a A	0,62 a B	0,68 a A	0,70 a A	0,72 a A	0,66 a A
N-NH ₂	A	0,33 B	0,54 bcA	1,46 c A	1,65 b A	2,19 d A	5,84 c A	5,94 e A
	B		0,58 b A	1,42 c A	1,53 c A	2,26 cd A	6,00 b A	7,74 b A
	C		0,46 bcA	1,39 c A	1,45 c A	2,33 c A	5,68 d A	6,85 d A
	D		0,73 a A	2,19 a A	2,54 a A	4,06 b A	5,84 c A	7,15 c A
	E		0,69 a A	2,01 b A	2,48 a A	4,21 a A	7,14 a A	8,62 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula da média referente ao tempo de um dia, na linha, não diferem da mesma pelo teste de Dunnett (P > 0,05).

¹ CT= Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

O índice de maturação do queijo pode ser observado através dos valores do NS em percentagem do nitrogênio total (Quadro 5). Esses valores refletem a extensão da proteólise, que se caracteriza pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis acumuladas durante o processo (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989), a qual foi mais evidenciada nos queijos que foram submetidos, de alguma forma, à temperatura de 15 °C. Essa aceleração da proteólise influenciada pela temperatura se deve mais especificamente à ação das enzimas proteolíticas do coalho e proteases provenientes da flora ácido-lática do queijo (ASTON et al., 1983, 1985).

Os valores do nitrogênio não-protéico (NNP), conforme apresentado no Quadro 5, não diferiram ($P>0,05$) para os controles de temperatura A, B e C, mas diferiram ($P<0,05$) entre os controles D e E, aos 60 dias de maturação. Aos 120 dias, não ocorreram diferenças ($P>0,05$) para os controles B e C, e estes diferiram ($P<0,05$) dos demais. Aos 180 dias, observou-se que os valores mais altos ($P<0,05$) foram para os controles de temperatura B e E, respectivamente de 19,54 e 19,87% do NT, indicando a grande influência do aumento da temperatura na proteólise do queijo, que proporcionou aos grupos de microrganismos a liberação de peptidases (endo e exopeptidases) ativas capazes de degradar em peptídeos de grande e pequeno tamanho e, até mesmo, aminoácidos livres (FOX et al., 1993).

A profundidade da proteólise abrange as substâncias de baixo peso molecular acumuladas durante o processo. Compostos característicos são os aminoácidos, oligopeptídeos, aminas e outros. A profundidade pode ser quantificada pelo teor de nitrogênio não-protéico (NNP) solúvel em ácido tricloroacético ou pela determinação direta dos aminoácidos produzidos e expressos como percentual da proteína total (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989). Geralmente utiliza-se o percentual do teor em NNP em relação ao nitrogênio solúvel total. Portanto, pode-se verificar que os queijos com maior índice de maturação em profundidade foram os obtidos nos controles de temperatura C, D e E com 61,11, 60,17 e 62,73%, respectivamente, para o período de maturação de 120 dias.

O nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) reflete a capacidade de desaminação exercida sobre os aminoácidos livres pela flora microbiana (PRIETO, 1999). Os valores obtidos para os diferentes controles de temperatura durante todo o período de maturação foram baixos. O maior valor médio ($P<0,05$) encontrado para o $N-NH_3$ foi de 0,72% do NT, para os queijos sob o controle de temperatura E aos 120 dias de maturação.

O nitrogênio amínico ($N-NH_2$), expresso em nitrogênio total (Quadro 5), apresentou maiores valores ($P<0,05$) para os queijos armazenados no controle de temperatura E, com exceção do período de maturação de 15 dias. Nesta fração nitrogenada encontram-se os aminoácidos livres obtidos pela intensa atividade

enzimática peptidolítica da flora ácido-lática liberada, principalmente quando ocorre a lise da célula depois de sua morte (CHOISY et al., 1987). As enzimas intracelulares liberadas difundem-se na matriz do queijo, observando-se aumento do número de aminoácidos ao final da maturação (FOX et al., 1993). O efeito da temperatura no controle do crescimento de microrganismo é bem conhecido, influenciando na liberação de enzimas e podendo ser usado para acelerar a maturação em função do aumento da temperatura de estocagem de 8°C para 16°C (FOLKERTSMA et al., 1996). O aumento de peptídeos pequenos e aminoácidos livres foi observado por vários autores ao aumentaram a temperatura de maturação (ASTON et al., 1983, 1985; FEDRICK et al., 1983; GAYA et al., 1990; FOLKERTSMA et al., 1996), e o mesmo também ocorreu neste trabalho com o queijo Zamorano DOP.

As frações nitrogenadas apresentadas no Quadro 6 foram obtidas a partir dos valores apresentados no Quadro 5, conforme proposto por LENOIR (1963). Os valores para o nitrogênio caseínico (Quadro 6) decresceram ($P < 0,01$) ao longo dos períodos de maturação, devido à maior degradação da caseína, que ocorreu à medida que se aumentaram os períodos de maturação (Figura 18). Observa-se que a maior degradação ocorreu nos controles de temperatura B e E, sendo altamente influenciada pelo aumento ($P < 0,05$) da temperatura a que foram submetidos os queijos durante a maturação. A fração caseínica foi inversamente proporcional ao nitrogênio amínico e ao nitrogênio peptídico.

Na fração do nitrogênio protéico (NP) foi observado o mesmo efeito ocorrido com o nitrogênio caseínico (NC), apesar de nesta fração estarem incluídas as proteínas do soro presentes no queijo.

Presente no nitrogênio solúvel, a fração proteose-peptona é formada principalmente pela ação da plasmina sobre a β -caseína. Pode-se observar, no Quadro 6 e na Figura 20, que houve aumento destas frações para todos os controles de temperatura, em função dos períodos de maturação. Essa degradação torna os compostos nitrogenados mais simples e mais solúveis (DUMAIS et al., 1991).

Quadro 6 – Evolução do conteúdo de nitrogênio caseínico (NC), nitrogênio protéico (NP), nitrogênio proteose-peptona (Npp), nitrogênio peptídico (Npept) no queijo Zamorano DOP, submetido a diferentes condições de temperatura durante a maturação

Componentes Nitrogenados	CT ¹	Período de maturação (dias)						
		1	7	15	30	60	120	180
NC	A	93,45 B	91,51 b A	90,57 b A	87,28 a A	81,14 a A	76,79 a A	74,88 aA
	B		92,33 a A	91,07 a A	87,09 ab A	81,38 a A	74,53 c A	67,17 dA
	C		91,26 b A	90,52 b A	86,76 b A	81,07 a A	74,98 b A	70,25 cA
	D		91,26 b A	86,84 d A	83,30 c A	76,86 c A	73,11 d A	71,37 bA
	E		91,17 b A	88,11 c A	83,22 c A	77,33 b A	72,28 e A	69,95 cA
NP	A	97,43 B	95,77 a A	95,40 a A	93,30bA	90,73 a A	87,93 a A	84,20 aA
	B		95,75 ab A	95,48 a A	93,00bA	90,14 b A	84,88 b A	80,46 cA
	C		95,85 a A	95,62 a A	93,62 a A	90,23 b A	84,71 b A	82,70 bA
	D		95,50 b A	94,27 b A	90,80 c A	87,99 c A	83,82 c A	82,65 bA
	E		95,64 ab A	94,32 b A	90,71 c A	86,76 d A	82,61 d A	80,13 dA
Npp	A	3,98 B	4,26 a A	4,83 cd A	6,03 c A	9,58 b A	11,14 a A	9,32 a A
	B		3,42 b A	4,40 d A	5,97 c A	8,76 c A	10,35 b A	13,29 aA
	C		4,59 a A	5,09 c A	6,86 b A	9,16 bc A	9,73 c A	12,45 bA
	D		4,23 a A	7,42 a A	7,51 a A	11,13 a A	10,71 abA	11,28 cA
	E		4,47 a A	6,22 b A	7,49 a A	9,43 b A	10,32 b A	10,18 dA
Npept	A	1,62 B	3,16 a A	2,60 b A	4,51 c A	6,51 d A	5,67 d A	9,27 d A
	B		3,13 a A	2,56 b A	4,88 b A	7,04 c A	8,51 c A	11,20 aA
	C		3,14 a A	2,46 b A	4,39 c A	6,87 c A	9,01 b A	9,86 c A
	D		3,20 a A	2,95 a A	6,06 a A	7,36 b A	9,71 a A	9,62 c A
	E		3,02 a A	3,04 a A	6,13 a A	8,33 a A	9,54 a A	10,58 bA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula da média referente ao tempo de um dia, na linha, não diferem da mesma pelo teste de Dunnett ($P > 0,05$).

¹ CT= Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

No que se refere à evolução das frações do nitrogênio não-protéico (LENOIR, 1963), a fração peptídica aumentou ($P<0,01$) ao longo dos períodos de maturação (Figura 21), apresentando diferenças ($P<0,05$) entre os controles de temperatura e maior percentagem em relação ao nitrogênio total, nos controles de temperatura submetidos a maiores temperaturas, como pode ser evidenciado no Quadro 6 para o controle de temperatura E, conduzido durante todo o experimento a 15 °C até os 120 dias de maturação, e para o controle B, aos 180 dias.

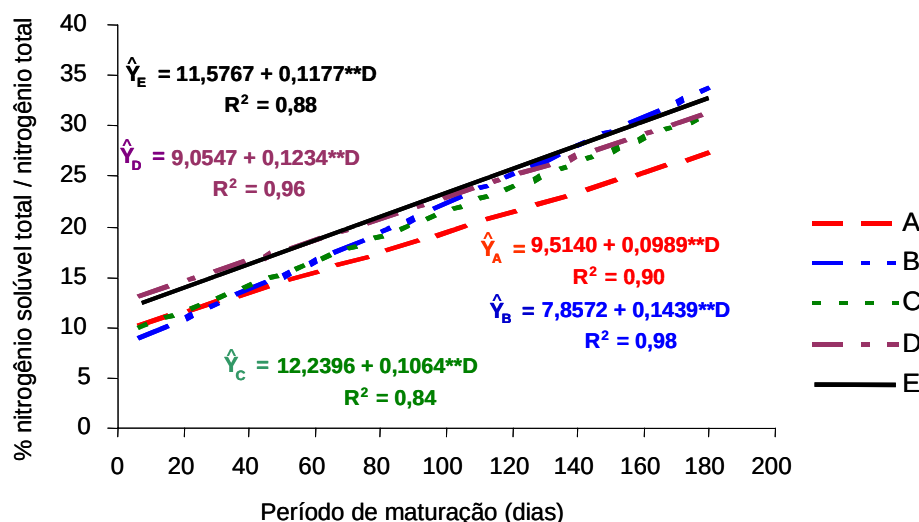
Todos os controles de temperatura influenciaram ($P<0,01$) um incremento na proteólise com o aumento do período de maturação com base no índice de maturação (NS/NT) (Figura 14). Outros estudos têm claramente demonstrado que o aumento da quantidade dos peptídeos solúveis se deve à ação

da renina, inicialmente nos primeiros períodos de maturação, na qual a α_{s1} -I caseína formada é degradada pelo resíduo do coalho e por outras proteinases (SOUSA et al., 2001). No entanto, proteinases de *starter* são mais importantes na fase secundária da proteólise, tornando solúveis os peptídeos de menor tamanho e os aminoácidos (GRAPPIN et al., 1985).

O queijo submetido ao controle de temperatura A apresentou aos 100 dias de maturação uma estimativa de 19,40% de nitrogênio solúvel em 100 g de nitrogênio total. No entanto, pode-se verificar que os queijos sob os outros controles de temperatura podem apresentar este mesmo índice de maturação em menor tempo, quando forem aplicadas modificações de temperaturas. Para os controles de temperatura D e E, obtém-se este valor aos 67 dias, para o B, aos 80 dias, e para o C, aos 83 dias. Conseqüentemente, pode-se reduzir em 33 dias a maturação quando aplicados os controles de temperatura D e E, sem, no entanto, prejudicar a qualidade desta característica. Resultados semelhantes ocorreram com queijo Fynbo (LABORDA e RUBIOLO, 1999).

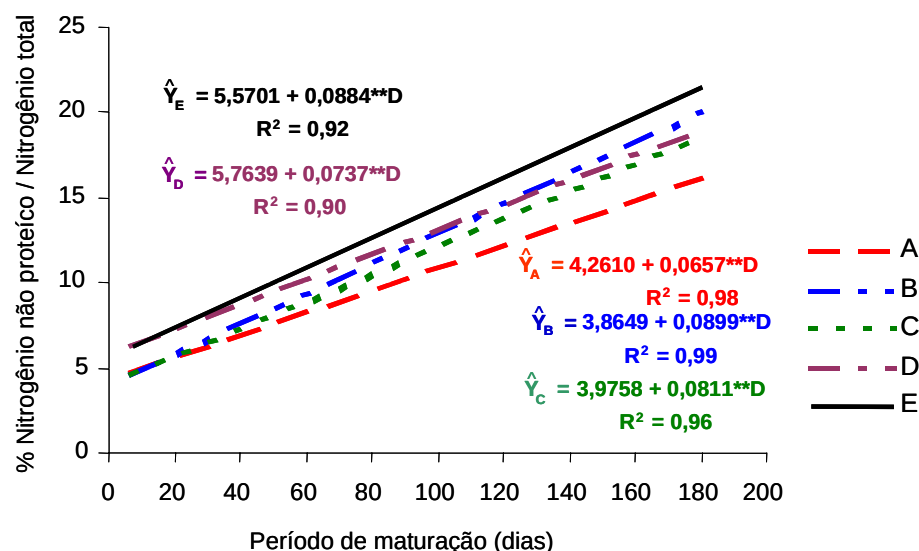
De acordo com a Figura 16, observa-se que as determinações do nitrogênio não-protéico (NNP) aumentaram ($P < 0,01$) em função dos períodos de maturação, para todos os controles de temperatura. Esse aumento é justificado em função do aumento de compostos nitrogenados solúveis, estimulado pelas proteinases e peptidases dos microrganismos *starters* e não *starters* e de enzimas do coalho, que promoveram a quebra de peptídeos maiores em menores e em aminoácidos livres (SHAKEEL-Ur et al., 2000).

O nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) apresentou, para os controles de temperatura A, B e C, aumento significativo em função dos períodos de maturação; para os controles de temperatura D e E não houve influência ($P > 0,05$) dos períodos sobre a manifestação dos valores de $N-NH_3$. Apesar dos resultados encontrados para os controles A, B e C, os valores de $N-NH_3$ no queijo Zamorano pareceram não sofrer muita influência do aumento da temperatura, pois eles variaram muito pouco em todos os períodos de maturação (Figura 16). A produção de $N-NH_3$ ocorre em função da desaminação dos aminoácidos livres (DUMAIS et al., 1991). Esses resultados parecem ser compatíveis com este tipo de queijo, onde não ocorre desaminação acentuada que produza grandes quantidades de $N-NH_3$.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 14 – Estimativas dos teores de nitrogênio solúvel total (NS) em função dos períodos de maturação em dias (7, 15, 30, 60, 120 e 180), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

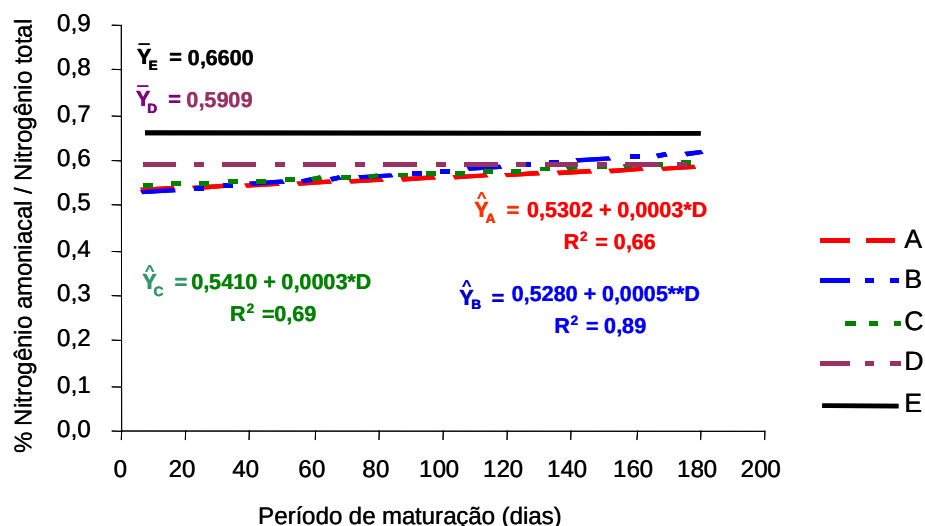


** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 15 – Estimativas dos teores de nitrogênio não-proteico (NNP) em função dos períodos de maturação em dias (7, 15, 30, 60, 120 e 180), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

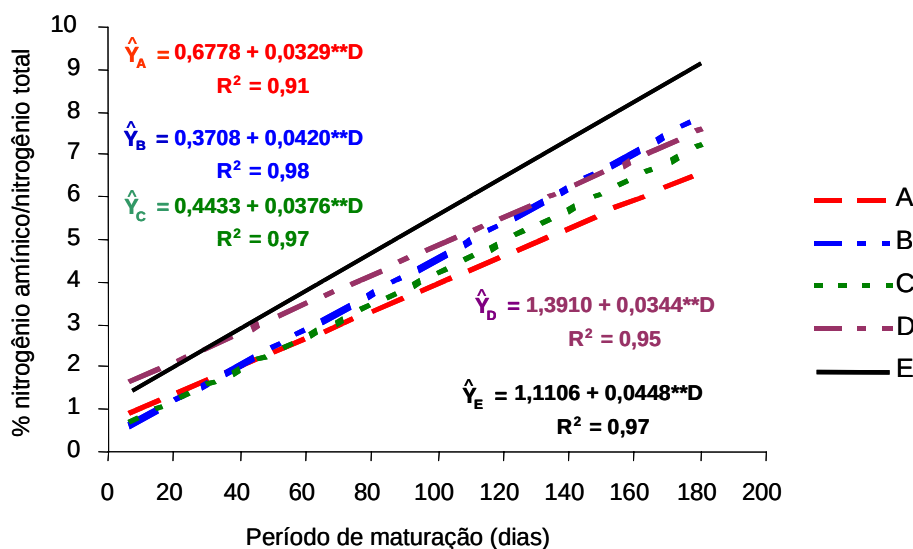
As equações de regressões para o nitrogênio amínico ($N-NH_2$) estão apresentadas na Figura 17. Foi constatado aumento ($P<0,01$) em função dos períodos de maturação para todos os controles de temperatura, destacando-se o aumento nos queijos submetidos ao controle de temperatura E, indicando provavelmente que, quanto maior o tempo de exposição a uma maior temperatura de maturação, maior a degradação dos peptídeos em aminoácidos. Esses resultados são equivalentes aos obtidos nas determinações de cromatografia de alta eficiência (HPLC), em que a maior percentagem de aminoácidos foi obtida para o queijo submetido ao controle de temperatura E. A estimativa da percentagem do nitrogênio amínico em nitrogênio total para o controle de temperatura A ($10\text{ }^{\circ}\text{C}$) aos 100 dias de maturação corresponde a 3,97% do NT. Neste caso, o queijo submetido ao controle de temperatura E pode ser comercializado 36 dias antes do prazo estabelecido pelo MAPA (1993), por apresentar o mesmo percentual do nitrogênio amínico em nitrogênio total.

O teor de nitrogênio caseínico apresentou relação negativa ($P<0,01$) em função dos períodos de maturação para todos os controles de temperatura, conforme indicado na Figura 18. Essa diminuição dos valores foi ocasionada pela degradação da caseína por ação das enzimas do coalho e proteinases provenientes da microbiota durante a maturação (SHAKEEL-Ur et al., 2000). No momento em que se determina o nitrogênio caseínico, a parte do nitrogênio solúvel já está eliminada, fazendo com que, quanto maiores os teores de nitrogênio solúvel, menores serão as frações caseínicas presentes no queijo. Por serem estes teores altamente influenciados pelo efeito da temperatura de maturação, conforme constatado por outros autores em queijo Cheddar (ASTON et al., 1983; FOLKERTSMA et al., 1996) e em queijo Manchego (NÚÑEZ et al., 1991), pode-se também observar que trocas de temperaturas durante a maturação influenciaram a ação das enzimas proteolíticas e peptidolíticas (GAYA et al., 1990), conforme se verificou pela menor queda dos valores do nitrogênio protéico para o controle de temperatura A.



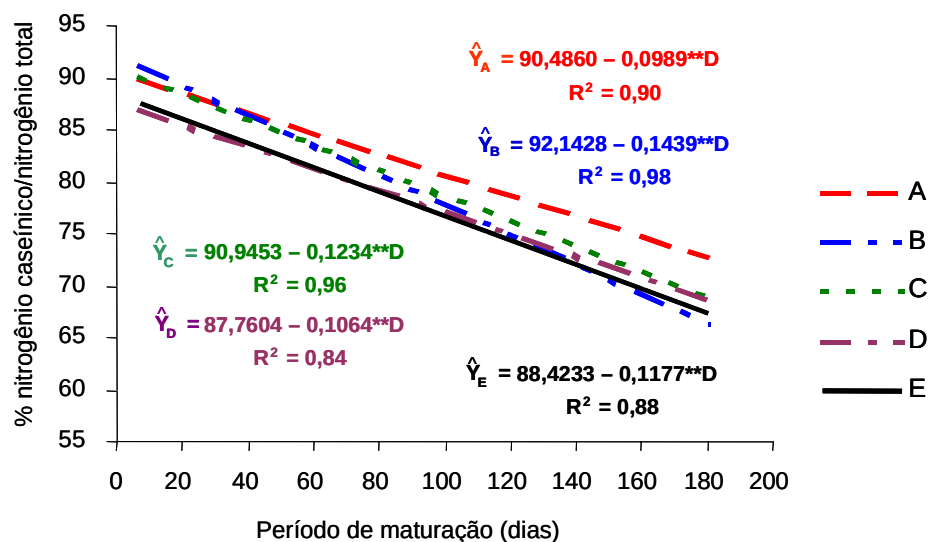
** Significativo pelo teste t (P < 0,01).

Figura 16 – Estimativas dos teores de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) em função dos períodos de maturação em dias (7, 15, 30, 60, 120 e 180), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



** Significativo pelo teste t (P < 0,01).

Figura 17 – Estimativas dos teores de nitrogênio amínico (N-NH₂) em função dos períodos de maturação em dias (7, 15, 30, 60, 120 e 180), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

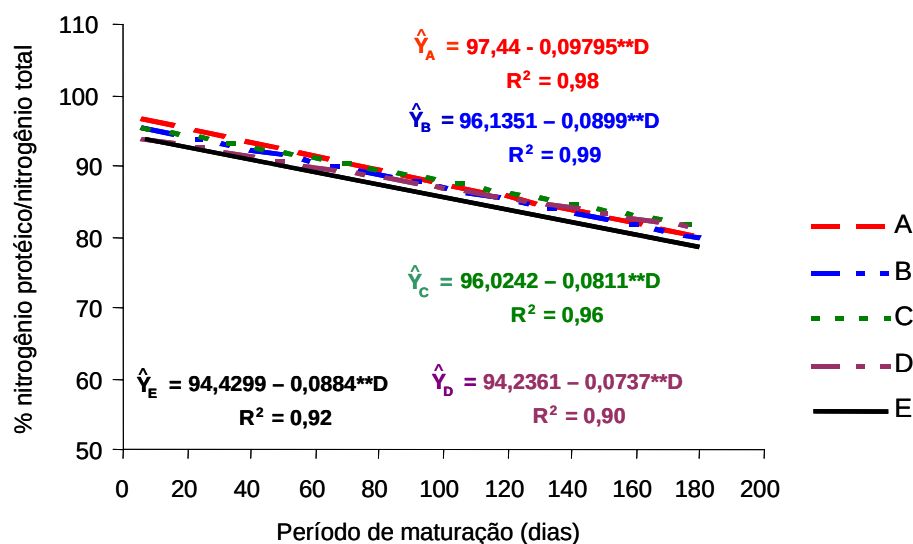


** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 18 – Estimativas dos teores de nitrogênio caseínico (NC) em função dos períodos de maturação em dias (7, 15, 30, 60, 120 e 180), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

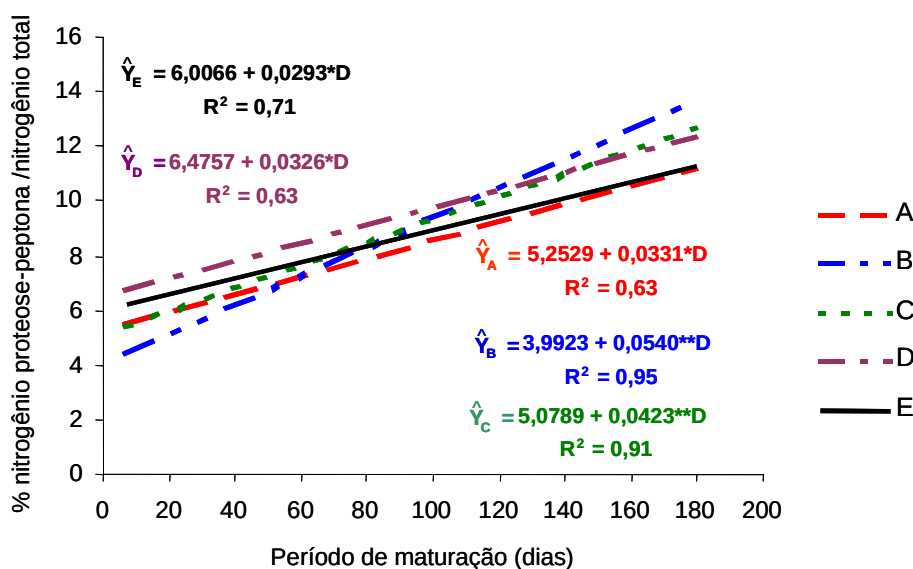
O teor de nitrogênio protéico apresentou relação negativa ($P < 0,01$) em função dos períodos de maturação para todos os controles de temperatura, mas as declividades das retas foram relativamente as mesmas e menores, quando comparadas às declividades das retas dos teores de nitrogênio caseínico, visto que nesse cálculo não se levaram em consideração os teores de nitrogênio não-protéico (NNP) sobre os valores do nitrogênio total (NT), o que dá uma idéia do total de nitrogênio presente no queijo que ainda não sofreu a degradação durante o período de maturação (Figura 19).

A quantidade em percentagem de nitrogênio proteose-peptona é apresentada na Figura 20. Para todos os controles de temperatura, houve aumento significativo dos valores em função dos períodos de maturação. As frações proteoses-peptonas encontram-se dentro das frações de nitrogênio solúvel, como compostos solúveis, e são resultados dos processos proteolíticos que ocorrem no queijo durante a maturação.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

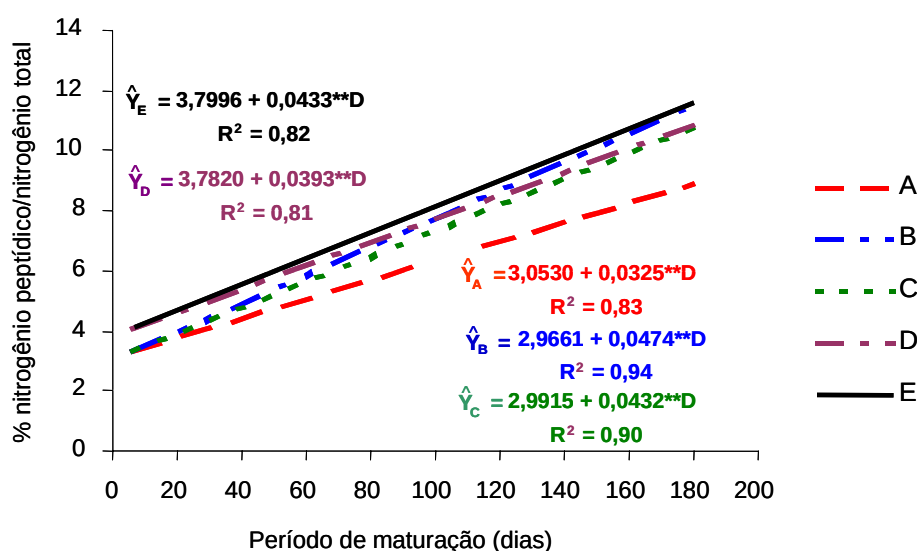
Figura 19 – Estimativas dos teores de nitrogênio protéico (NP) em função dos períodos de maturação em dias (7, 15, 30, 60, 120 e 180), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$) e* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

Figura 20 – Estimativas dos teores de nitrogênio proteose-peptona (Npp) em função dos períodos de maturação em dias (7, 15, 30, 60, 120 e 180), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

A fração do nitrogênio peptídico (Npept) aumentou ($P < 0,01$) ao longo dos períodos de maturação (Figura 21). Visualmente, o controle de temperatura A foi o que apresentou menor aumento sob o processo proteolítico. Essa fração demonstra a quantidade de peptídeos de menor tamanho que ainda não foram degradados a aminoácidos por enzimas peptidolíticas e que se encontram incluídos dentro dos teores de NNP, mas que influem na profundidade da maturação.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$) e* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

Figura 21 – Estimativas dos teores de nitrogênio peptídico (Npept) em função dos períodos de maturação em dias (7, 15, 30, 60, 120 e 180), para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

B) Correlações entre as frações nitrogenadas do queijo Zamorano DOP sob os diferentes controles de temperatura

De acordo com o Quadro 7, pode-se observar que as frações nitrogenadas são altamente correlacionadas, como já mencionado em discussões anteriores. De maneira geral, essas correlações se apresentam similares nos controles de temperatura A, B e C, onde todas as frações nitrogenadas foram correlacionadas

Quadro 7 – Correlações entre as frações nitrogenadas do queijo Zamorano DOP submetido a diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E), durante os períodos de maturação (7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias)

	NNP	NH ₃	NH ₂	NC	NP	Npp	Npept
A ²							
NS ¹	0,98**	0,83*	0,93**	-1,00**	0,94**	-0,98**	0,91**
NNP		0,85*	0,94**	-0,98**	0,85*	-1,00**	0,95**
N-NH ₃			0,69	-0,83*	0,73*	-0,85*	0,90**
N-NH ₂				-0,93**	0,83*	-0,94**	0,77*
NC					-0,94**	0,98**	-0,91**
NP						-0,85*	0,76*
Npp							-0,94**
B							
NS	1,00**	0,93**	0,97**	-1,00**	0,99**	-1,00**	1,00**
NNP		0,94**	0,98**	-1,00**	0,98**	-1,00**	0,98**
N-NH ₃			0,96**	-0,93**	0,90**	-0,94**	0,90**
N-NH ₂				-0,97**	0,94**	-0,98**	0,93**
NC					-0,99**	1,00**	-0,99**
NP						-0,98**	0,99**
Npp							-0,98**
C							
NS	0,99**	0,89**	0,97**	-1,00**	0,98**	-0,99**	0,99**
NNP		0,91**	0,98**	-0,99**	0,96**	-1,00**	0,99**
N-NH ₃			0,85*	-0,89**	0,83*	-0,91**	0,93**
N-NH ₂				-0,97**	0,92**	-0,98**	0,94**
NC					-0,98**	0,99**	-0,99**
NP						-0,96**	0,97**
Npp							-0,99**
D							
NS	0,99**	0,31	0,98**	-1,00**	0,96**	-0,99**	0,97**
NNP		0,33	0,98**	-0,99**	0,90**	-1,00**	0,99**
N-NH ₃			0,25	-0,31	0,25	-0,33	0,38
N-NH ₂				-0,98**	0,90**	-0,98**	0,94**
NC					-0,96**	0,99**	-0,97**
NP							

entre si, a 5 ou 1% de probabilidade. Portanto, a maturação de queijos nesses controles acarretaria valores altos para algumas frações e baixos para outras, conforme os sinais das correlações. Nesses controles de temperatura parece ter havido equilíbrio entre os valores das frações nitrogenadas ao longo da maturação dos queijos.

Para os controles D e E, verificou-se que o N-NH_3 não se correlacionou ($P>0,05$) com as demais frações nitrogenadas, sugerindo que o aumento de temperatura para 15 °C no início e durante todo o período de maturação não acarretou mudanças nos valores de N-NH_3 proporcionais às mudanças ocorridas nas outras frações nitrogenadas. Neste caso, valores altos ou baixos de uma fração nitrogenada não parecem sugerir se os valores de N-NH_3 serão altos ou baixos, pois isso só poderia influenciar se ocorresse muita desaminação de aminoácidos ao longo da maturação, o que parece não refletir na fração de nitrogênio não-protéico, na qual ela está inserida.

C) Correlações entre os aspectos físico-químicos e as frações nitrogenadas do queijo Zamorano DOP sob diferentes controles de temperatura

Correlações positivas ($P<0,01$) entre os aspectos físico-químicos e os valores de NS, NNP e N-NH_2 foram observadas no Quadro 8, indicando que o processo de proteólise é lento nos queijos duros. O pH apresentou correlação negativa ($P<0,01$) com as frações nitrogenadas mais importantes (NS e NNP), principalmente para os controles A, B e C. Para os controles D e E a maturação foi influenciada pelo aumento de temperatura, principalmente nos primeiros meses de maturação, em que a atuação das enzimas do coalho é mais evidente do que no processo de proteólise secundária, em que a maior parte da proteólise se deve às proteinases e peptidases da microbiota presente no queijo (VISSER, 1993; SOUSA et al., 2001).

A atividade de água para todas as frações teve altas correlações negativas ($P<0,01$) com as frações nitrogenadas influenciadas pelo pH e, principalmente, pela concentração de sal na umidade do queijo. Correlações positivas e significativas foram encontradas com relação à quantidade de sal com as frações mais

Quadro 8 – Correlações entre as análises físico-químicas e as frações nitrogenadas do queijo Zamorano DOP submetido a diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E), durante os períodos de maturação de 7, 15, 30, 60, 120 e 180

	NS ¹	NNP	NH ₃	NH ₂	NC	NP	Npp	Npept
A								
pH	-0,88*	-0,83*	-0,68	-0,86*	0,88*	-0,87*	0,83*	-0,71
Ac/ES	0,98**	0,95**	0,81*	0,92**	-0,98**	0,92**	-0,95**	0,87*
aw	-0,99**	-0,99**	-0,87*	-0,95**	0,99**	-0,90**	0,99**	-0,92**
ES	1,00**	0,99**	0,84*	0,94**	-1,00**	0,92**	-0,99**	0,91**
Umid	-1,00**	-0,98**	-0,85*	-0,94**	1,00**	-0,92**	0,98**	-0,91**
Gord	-0,23	-0,03	0,14	-0,18	0,23	-0,52	0,03	0,12
Prot	-0,98**	-0,95**	-0,89**	-0,89**	0,98**	-0,95**	0,95**	-0,90**
lacts	-0,99**	-0,96**	-0,78*	-0,96**	0,99**	-0,94**	0,96**	-0,85*
Cl/Um	0,99**	0,97**	0,84*	0,91**	-0,99**	0,92**	-0,97**	0,92**
Cl/ES	0,97**	0,95**	0,80*	0,89**	-0,97**	0,91**	-0,95**	0,90**
B								
pH	-0,90**	-0,88**	-0,83*	-0,87**	0,90**	-0,91**	0,88**	-0,86*
Ac/ES	0,97**	0,96**	0,86*	0,93**	-0,97**	0,98**	-0,95**	0,95**
aw	-0,99**	-1,00**	-0,94**	-0,98**	0,99**	-0,98**	1,00**	-0,98**
ES	1,00**	0,99**	0,94**	0,96**	-1,00**	1,00**	-0,99**	0,99**
Umid	-1,00**	-0,99**	-0,94**	-0,96**	1,00**	-1,00**	0,99**	-0,99**
Gord	-0,97**	-0,97**	-0,95**	-0,95**	0,97**	-0,96**	0,97**	-0,96**
Prot	-0,98**	-0,99**	-0,93**	-0,99**	0,98**	-0,96**	0,99**	-0,95**
lacts	-0,96**	-0,95**	-0,89**	-0,92**	0,96**	-0,97**	0,95**	-0,95**
Cl/Um	0,99**	0,98**	0,90**	0,94**	-0,99**	1,00**	-0,98**	0,99**
Cl/ES	0,90**	0,88**	0,73*	0,80*	-0,90**	0,93**	-0,88**	0,92**
C								

importantes (NS e NNP), que indicam o índice de proteólise do queijo. O abaixamento da atividade de água representa diminuição do teor de água livre disponível para as reações e os fenômenos biológicos que necessitam de uma fase aquosa para ocorrer e, portanto, aumento do teor de sal na umidade do queijo (FURTADO, 1991). Uma interessante correlação foi observada entre o teor de nitrogênio não-protéico e a atividade de água, sendo um fator determinante no índice de maturação, especialmente na profundidade de maturação do queijo (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989).

A rapidez de crescimento dos microrganismos é afetada pela A_w em diferentes espécies, pois tanto o crescimento microbiano como as atividades enzimáticas são controlados pela atividade de água no queijo. Todos os microrganismos influenciam a maturação de vários tipos de queijo, daí a importância de se controlar adequadamente o teor de sal do produto (FURTADO, 1991).

A gordura foi a única que não se correlacionou com as frações nitrogenadas, porém uma exceção ocorreu no controle de temperatura B, onde todas as frações nitrogenadas foram significativamente correlacionadas com a gordura, o que contrariou a resposta esperada. Esse fato pode ter ocorrido em função de uma queda mais acentuada do valor da gordura nos períodos de 120 aos 180 dias (Quadro 3). Apesar de essa significância ter ocorrido, o coeficiente de correlações pode não estar implicado necessariamente na relação (WERKEMA, 1995). Nesses casos, o valor para a gordura aos 180 dias, que é um período bastante distante dos demais, pode ter gerado a tendência de linearidade, conforme explica a Figura 10, sem, no entanto, esta ter sido apresentada nos demais períodos.

3.3. Perfil eletroforético das caseínas

As Figuras 22, 23, 24, 25 e 26 mostram o eletroforetograma das frações da caseína α_s , β e γ e outros peptídeos, durante a maturação do queijo Zamorano DOP submetido a diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E), em diferentes períodos de maturação (1, 7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias) e tendo como base um padrão de caseinato de leite de ovelha.

Como se pode observar, foram obtidos os grandes grupos de caseínas (β e α_s -caseínas) e seus produtos de degradação em função da mobilidade que apresentaram no perfil eletroforético através do gel de uréia-poliacrilamida, (PAGE) conforme determinado por MACEDO e MALCATA (1997) para queijo de leite de ovelha. Claramente foi observada a degradação de α_s e β -caseína e o acúmulo de γ -caseína e outros peptídeos, que aumentaram em função do período e da temperatura de maturação.

A primeira fração compreendeu um grupo de bandas de baixa mobilidade que está basicamente integrada pelos distintos tipos de γ -caseína (γ_1 , γ_2 e γ_3 -caseínas), que foram liberados como consequência da hidrólise da β -caseína durante a maturação do queijo. Em seguida, observa-se uma banda importante de mobilidade ligeiramente superior às anteriores, constituída pela β -caseína. Esta fração em caseína de ovinos apresenta duas variantes – β_1 e β_2 -caseína – as quais se diferenciam unicamente em seu grau de fosforilação. Neste estudo as variantes não se apresentaram bem diferenciadas.

Com uma mobilidade superior à da β -caseína aparece uma banda pequena, que está integrada pela β -I-caseína. Após esta banda apareceu um grupo de bandas com maior mobilidade, que corresponde às diferentes variantes da α_s -caseína (α_{s1} , α_{s2} e α_{s3} -caseína). As frações α_s e de β -caseína constituem as duas principais frações de caseína presentes no leite de ovelha (LUQUET, 1985).

Finalmente, pode-se comprovar, pelo perfil das figuras do eletroforetograma (Figuras 22, 23, 24, 25 e 26), que houve em todos os controles de temperatura aumento durante os períodos de maturação na intensidade de um grupo de bandas com maior mobilidade que as α_s -caseínas, entre as quais se encontram a α_s -I-caseína. Este grupo de bandas foi denominado pré α_s -aseína por ser originário da α_s -caseína e por apresentar mobilidade superior à anterior.

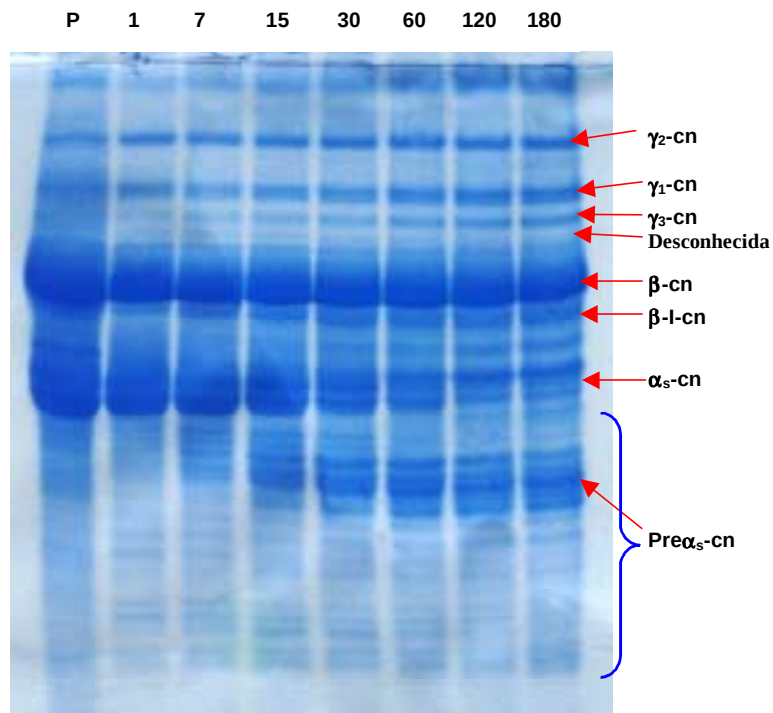


Figura 22 – Perfil eletroforético das caseínas do queijo Zamorano DOP submetido ao controle de temperatura A (10 °C até 180 dias de maturação).

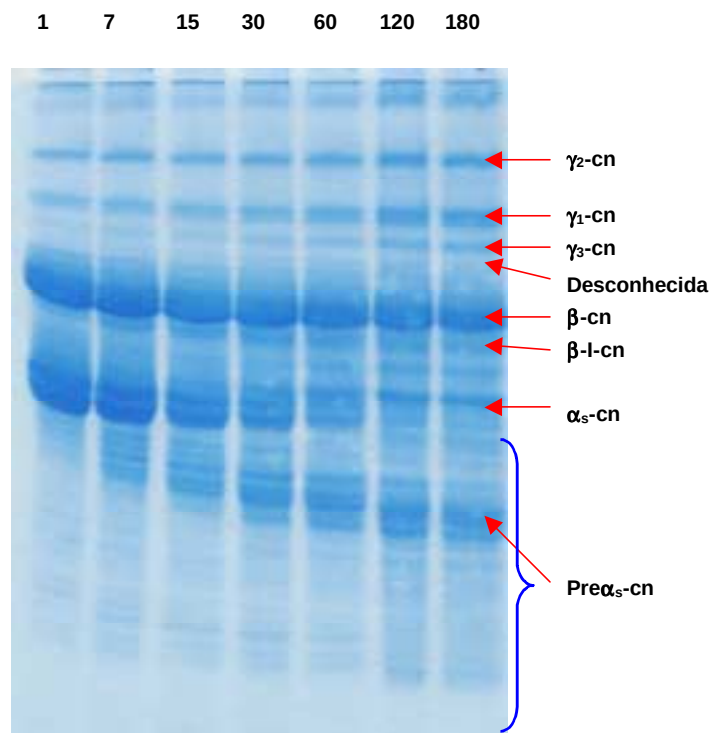


Figura 23 – Perfil eletroforético das caseínas do queijo Zamorano DOP submetido ao controle de temperatura B (10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias).

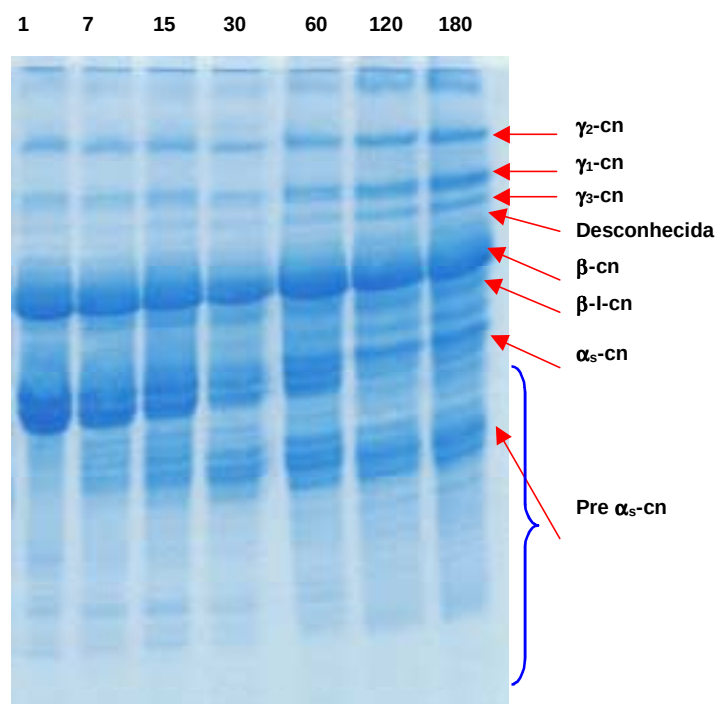


Figura 24 – Perfil eletroforético das caseínas do queijo Zamorano DOP submetido ao controle de temperatura C (10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias).

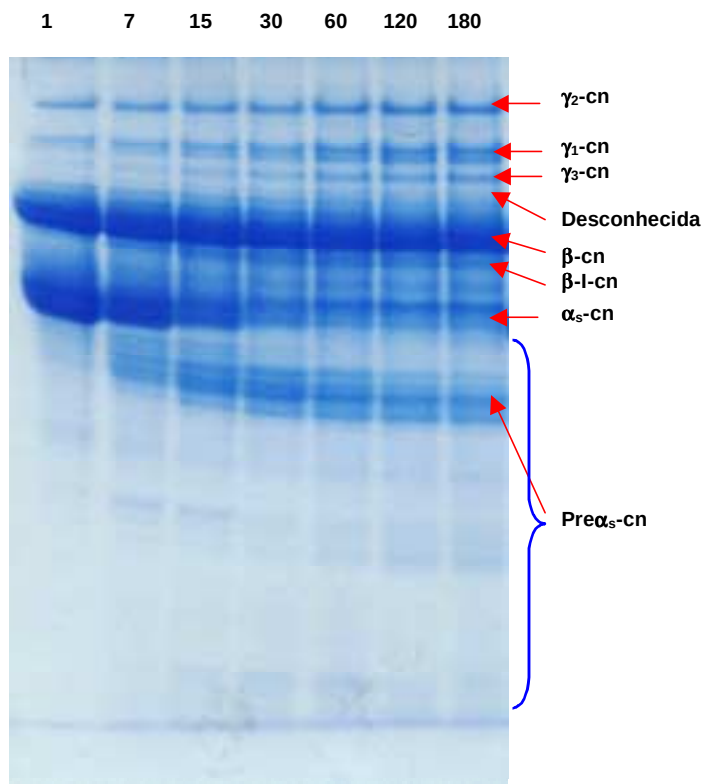


Figura 25 – Perfil eletroforético das caseínas do queijo Zamorano DOP submetido ao controle de temperatura D (15 °C até 60 e 10 °C de 60 até 180 dias).

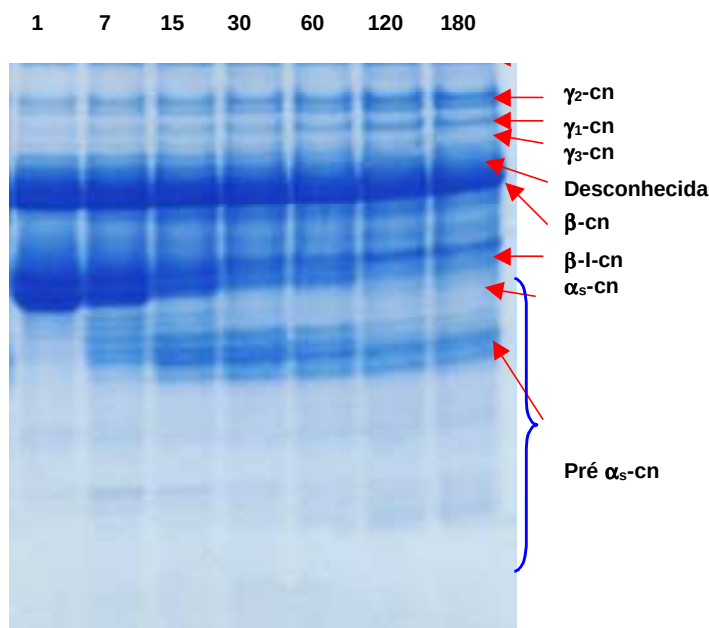
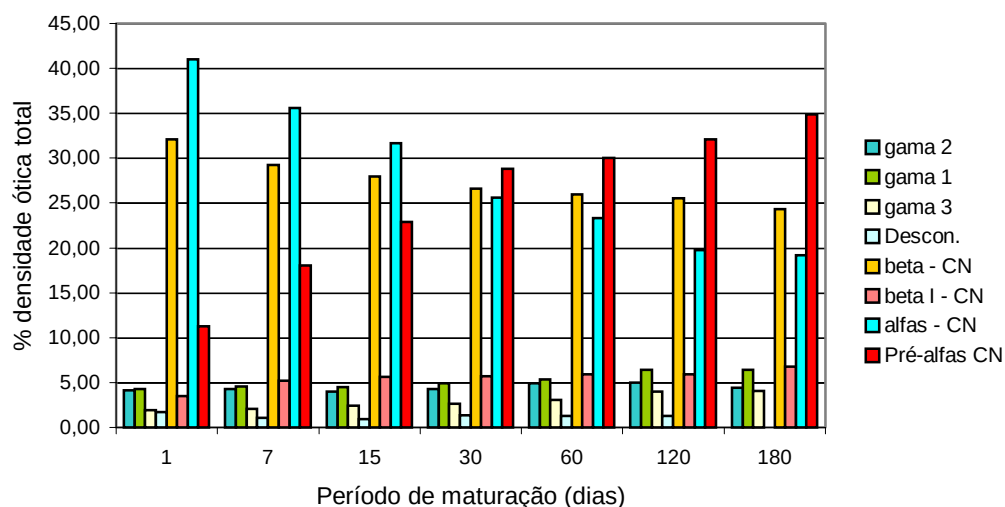


Figura 26 – Perfil eletroforético das caseínas do queijo Zamorano DOP submetido ao controle de temperatura E (15 °C até 180 dias de maturação).

A degradação das frações α_s -caseína e β -caseína foi muito similar em todos os controles de temperatura durante a maturação do queijo Zamorano DOP. No entanto, em todos os controles de temperatura a fração α_s -caseína foi hidrolisada de maneira mais intensa que a β -caseína. Também foram observadas diferenças quanto à velocidade de degradação das frações durante os períodos de maturação, ocasionadas provavelmente pelas condições de temperatura de maturação.

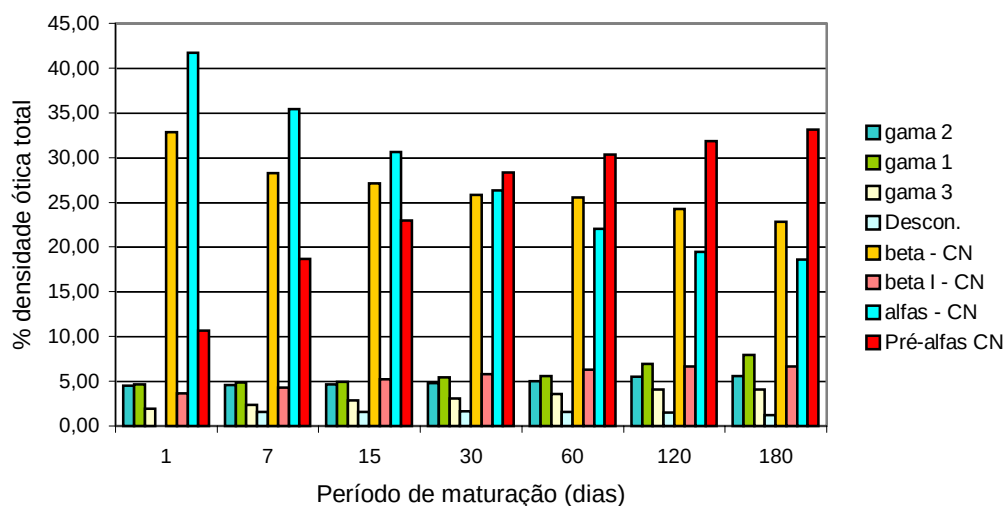
As Figuras 27, 28, 29, 30 e 31 apresentam a quantificação relativa da proteólise do queijo Zamorano DOP, através da evolução da densitometria expressa em porcentagem das frações da caseína de acordo com a sua degradação e formação de peptídeos ao longo dos períodos de maturação nos diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E).

A intensidade das bandas correspondentes à fração β -caseína diminuiu ligeiramente ao longo de toda a maturação em todos os controles de temperatura. Essa diminuição foi constatada em torno de 25 a 30% com relação ao queijo no primeiro dia. Conseqüentemente, se produziu aumento dos produtos de sua degradação: γ_1 , γ_2 e γ_3 - caseínas.



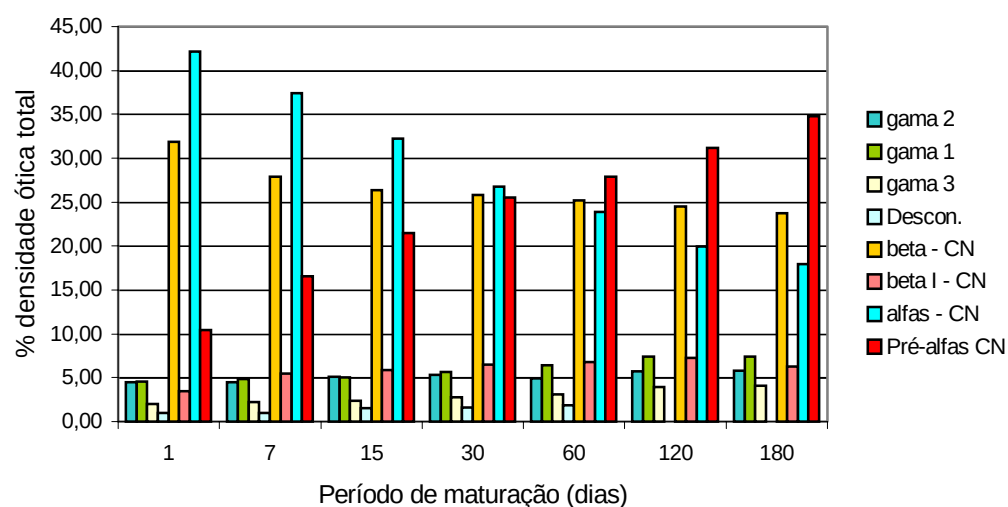
Gama 2 (γ_2 -caseína), gama 1 (γ_1 -caseína), gama 3 (γ_3 -caseína), beta-CN (β -caseína), beta-I-CN (β -I-caseína), alfa-CN (α -caseína), pré-alfas-CN (pré- α -caseína).

Figura 27 – Perfil das caseínas do queijo Zamorano DOP obtidos nas curvas de densidade óptica, no controle de temperatura A (10 °C até 180 dias de maturação).



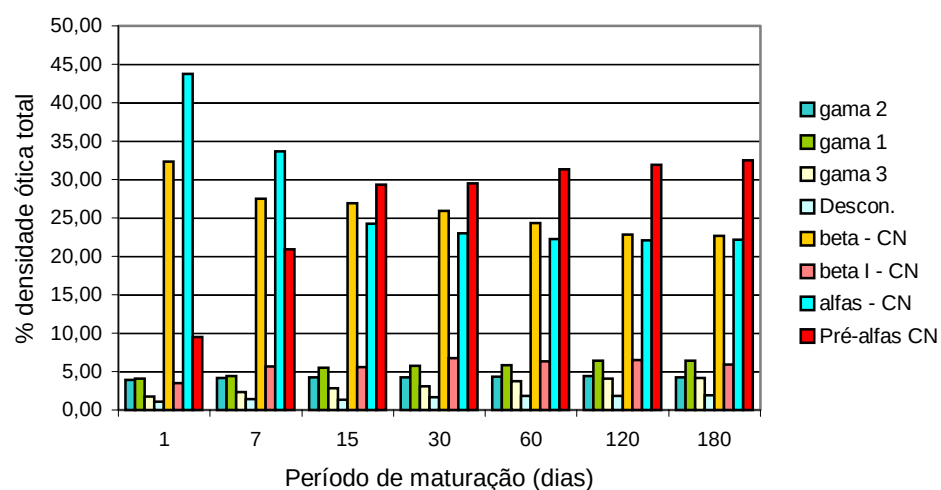
Gama 2 (γ_2 -caseína), gama 1 (γ_1 -caseína), gama 3 (γ_3 -caseína), beta-CN (β -caseína), beta-I-CN (β -I-caseína), alfa-CN (α -caseína), pré-alfas-CN (pré- α -caseína).

Figura 28 – Perfil das caseínas do queijo Zamorano DOP obtido nas curvas de densidade óptica, no controle de temperatura B (10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias).



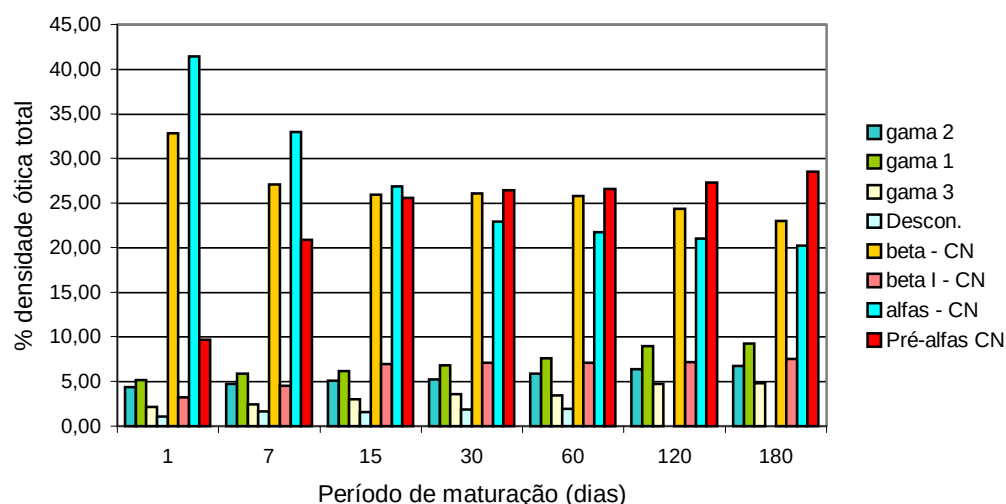
Gama 2 (γ_2 -caseína), gama 1 (γ_1 -caseína), gama 3 (γ_3 -caseína), beta-CN (β -caseína), beta-I-CN (β -I-caseína), alfa-CN (α -caseína), pré-alfas-CN (pré- α -caseína).

Figura 29 – Perfil das caseínas do queijo Zamorano DOP obtido nas curvas de densidade óptica, no controle de temperatura C (10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias).



Gama 2 (γ_2 -caseína), gama 1 (γ_1 -caseína), gama 3 (γ_3 -caseína), beta-CN (β -caseína), beta-I-CN (β -I-caseína), alfa-CN (α -caseína), pré-alfas-CN (pré- α -caseína).

Figura 30 – Perfil das caseínas do queijo Zamorano DOP obtido nas curvas de densidade óptica, no controle de temperatura D (15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias).



Gama 2 (γ_2 -caseína), gama 1 (γ_1 -caseína), gama 3 (γ_3 -caseína), beta-CN (β -caseína), beta-I-CN (β -I-caseína), alfa-CN (α -caseína), pré-alfas-CN (pré- α -caseína).

Figura 31 – Perfil das caseínas do queijo Zamorano DOP obtido nas curvas de densidade óptica, no controle de temperatura E (15 °C até 180 dias de maturação).

As frações gamas caseínas, assim como outros peptídeos, são produtos da degradação da β -caseína hidrolisada principalmente pela ação da plasmina (protease alcalina do leite), originando γ_1 -CN (f29-209), γ_2 -CN (f106-209) e γ_3 -CN (f108-209), assim como algumas proteose-peptonas (SOUSA et al., 2001). A plasmina apresenta aumento na atividade quando o leite destinado à fabricação de queijo é pasteurizado, como consequência da inativação dos inibidores da plasmina e da ativação do plasminogênio (GRUFFERTY e FOX, 1988; VISSER, 1993; ENRIGHT e KELLY, 1999; SOUSA et al., 2001). Portanto, o aumento observado na intensidade das bandas γ -caseína do queijo Zamorano DOP durante a maturação está relacionado com a ação da plasmina sobre a β -caseína. No entanto, como este queijo foi elaborado com leite pasteurizado, os valores poderiam ser maiores, quando comparados aos observados por outros autores (BASTIAN et al., 1997). Provavelmente isso tenha ocorrido devido à influência do pH, da A_w e da concentração de sal, pois nos períodos iniciais da maturação a A_w apresentou-se na faixa ideal de atuação da plasmina. Nos períodos mais

avancados da maturação, valores destas frações começaram a diminuir, como consequência do aumento de sal na fase aquosa do queijo, dificultando a ação da plasmina sobre a β -caseína.

Uma banda de mobilidade ligeiramente superior à fração da β -caseína foi detectada, a qual se incrementou de maneira importante na primeira semana de maturação em todos os controles de temperatura, mantendo-se constante. Esta banda, denominada β -I-caseína, provavelmente corresponde ao fragmento (f1-192), que se origina a partir da ação da quimosina sobre a β -caseína (LYNCH et al., 1997).

A degradação mais importante das frações caseínicas durante a maturação, nos diferentes controles de temperatura, correspondeu à da α_s -caseína. Esta diminuição da intensidade da banda foi de 50 a 57% a partir do primeiro dia até o final da maturação. Foi observado que a hidrólise mais avançada ocorreu para os controles de temperatura D e E, principalmente nos primeiros dias da maturação, pelo favorecimento do aumento de temperatura (15 °C).

A intensidade de degradação da α_s -caseína correspondeu principalmente aos primeiros meses de maturação, levando à formação de pré- α_s -caseína, integrada aos peptídeos maiores de grande peso molecular e à α_s -I-caseína, bem como a outros peptídeos de tamanho médio. Conforme observado no controle de temperatura E (Figura 30), a fração α_s -caseína apresentou menor valor em virtude do aumento de temperatura, o que proporcionou a liberação de mais polipeptídeos. No entanto, o aumento da temperatura também facilitou a degradação destes polipeptídeos que integraram a fração pré- α_s -caseína composta de peptídeos menores e aminoácidos livres, os quais não são identificados por eletroforese em gel de acrilamida.

Em estudos sobre caseína bovina realizados por diversos pesquisadores em laboratório (MULVIHILL e FOX, 1977, 1978; McSWEENEY et al., 1993; EXTERKATE et al., 1995), foi verificado que o coalho é um dos principais responsáveis pela proteólise primária nos queijos; sua ação dirige-se principalmente sobre a α_s -caseína, originando diversos peptídeos de tamanhos moleculares variáveis, enquanto a atividade sobre a β -caseína é menor, mas resulta em dois peptídeos, um de grande tamanho aminoterminal (f1-192), que corresponde à

banda β -I-caseína, e outro de menor tamanho, carboxiterminal (f193-209), que é mais resistente à hidrólise pela quimosina, mas sofrendo degradação posteriormente, estando associada à produção de sabores amargos no queijo (DUMAIS et al., 1991). Este problema não foi constatado no queijo Zamorano DOP quando submetido ao painel de degustadores treinados, possivelmente por esta fração não ter sofrido degradação importante, mesmo quando submetida a maiores temperaturas de maturação.

EXTERKATE et al. (1997) comprovaram, em queijo Gouda, que a ação da quimosina sobre a α_s -caseína e β -caseína, em condições similares às utilizadas *in vitro* (pH 5 e % sal/umidade do queijo), foi inferior à detectada em laboratório. Portanto, a proteólise do queijo depende, além dos parâmetros físico-químicos (pH, A_w e a relação sal/umidade), também da natureza e atividade específica das enzimas, assim, das condições de maturação. Estudos de laboratório nem sempre podem ser extrapolados em sua totalidade, o que realmente ocorre no queijo durante a maturação.

Durante a maturação do queijo Zamorano DOP, sob condições de maturação acelerada por aumento de temperatura, observou-se que os valores de pH apresentaram-se em torno de 5,6 a 5,4 e os de sal na umidade na faixa de 2,6% a 7,41%. Estes valores estão de acordo com os estabelecidos por MULVIHILL e FOX (1980) e explica a ação da quimosina sobre a α_s -caseína, o que favoreceu a hidrólise desta fração nos primeiros meses de maturação no queijo.

A estabilização observada na degradação da α_s -caseína sob condições de maturação acelerada do queijo durante os primeiros quatro meses pode ser devido aos altos valores da relação sal/umidade (6 -7%), que atuou reduzindo a quantidade de água livre e, portanto, dificultando as reações entre as enzimas e os substratos (CHOISY et al., 1987). Em controvérsia, as condições da relação sal/umidade no queijo não pareceram favorecer a hidrólise pela quimosina da β -caseína. Neste caso, a distribuição de sal unido ao efeito exercido pelo caseinato de cálcio sobre a água de hidratação determinou maior estruturação desta última e, portanto, aumento na hidrofobicidade do meio. Isso levará a dois efeitos, quais sejam: redução da solubilidade da β -caseína e estabelecimento de interações hidrofóbicas entre as cadeias de β -caseína, com conseguinte mascaramento das

zonas suscetíveis à ação da quimosina e das proteases da parede celular das bactérias lácticas (HERTMANNI et al., 1991). Resultados muito similares foram também obtidos para outras variedades de queijo (EXTERKATE et al., 1997; KRISTIANSEN et al., 1999).

Pelos valores encontrados no perfil eletroforético, expressos em percentagem de densidade óptica, observou-se que o principal responsável pela proteólise primária no queijo Zamorano DOP foi o coalho, seguido pela ação da plasmina, influenciando e mantendo estes efeitos sobre a proteólise secundária através das atividades enzimáticas das bactérias presentes no queijo (LYNCH et al., 1997), que foram estimuladas pelo aumento de temperatura durante a maturação.

A hidrólise de β -caseína contribuiu para a formação das frações gamas, conforme demonstrado por GAIASCHI et al. (2000) para queijo Grana Padano. Estas frações são bem evidentes ao longo dos períodos de maturação, sendo influenciadas pela atuação da proteinase do leite (plasmina). Neste estudo, estas frações foram bem evidenciadas e apresentaram aumento em função dos períodos de maturação e nos controles que sofreram aumento de temperatura durante a maturação. A mais influenciada (Quadro 9) foi a γ_1 , especialmente no controle de temperatura E, onde a temperatura aplicada de 15 °C foi contínua ao longo da maturação, mostrando assim que a temperatura influenciou a degradação da fração β -caseína. De acordo com as equações de regressão, todas as frações gamas apresentaram aumento ($P < 0,01$) ao longo da maturação, com exceção da gama 2 nos controles A e D, cujos valores se mantiveram semelhantes ($P > 0,05$).

Na fração β -caseína, a diminuição ($P < 0,05$) foi muito evidente para todos os controles de temperatura ao longo dos períodos de maturação, mas menos intensa que a α_s -caseína. Em contrapartida, os valores de β -I-caseína aumentaram em função dos períodos de maturação até um certo valor ($P < 0,01$), influenciado pela maior degradação da β -caseína. Após este valor, a hidrólise desta fração se manteve constante. Ainda de acordo com o Quadro 9, o controle de temperatura que provocou, mais rapidamente, aumento ($P < 0,05$) da fração β -I-caseína foi o D, cujo período foi de aproximadamente 9 dias. Do mesmo modo, os controles de temperatura A e C também apresentaram valores próximos a 9 dias.

Quadro 9 – Valores obtidos em % de densidade óptica das frações das caseínas do queijo Zamorano DOP e equações de regressões em função dos períodos de maturação (dias), para os diferentes controles de temperatura

CT ¹		Período de Maturação (dias)						
		1	7	15	30	60	120	180
GAMA 2	A	4,15	4,29	3,99	4,31	4,94	5,01	4,42
	B	4,53	4,58	4,68	4,76	5,03	5,48	5,56
	C	4,48	4,51	5,13	5,37	4,91	5,69	5,80
	D	3,93	4,13	4,23	4,29	4,35	4,41	4,27
	E	4,37	4,73	5,11	5,26	5,91	6,41	6,73
	A	$\bar{Y} = 4,4443$						
	B	$\hat{Y} = 4,58312 + 0,00614562**D$ ($R^2 = 0,9501$)						
	C	$\hat{Y} = 4,74118 + 0,00654183**D$ ($R^2 = 0,6950$)						
	D	$\bar{Y} = 4,2300$						
	E	$\hat{Y} = 4,77761 + 0,0122923**D$ ($R^2 = 0,8960$)						
CT		1	7	15	30	60	120	180
GAMA 1	A	4,27	4,55	4,50	4,94	5,34	6,42	6,39
	B	4,66	4,84	4,94	5,41	5,55	6,91	7,91
	C	4,60	4,88	5,00	5,63	6,39	7,43	7,41
	D	4,07	4,40	5,46	5,72	5,84	6,38	6,41
	E	5,15	5,88	6,16	6,84	7,57	8,97	9,26
	A	$\hat{Y} = 4,45411 + 0,0126665**D$ ($R^2 = 0,9153$)						
	B	$\hat{Y} = 4,68758 + 0,0179344**D$ ($R^2 = 0,9901$)						
	C	$\hat{Y} = 4,92469 + 0,0166275**D$ ($R^2 = 0,8877$)						
	D	$\hat{Y} = 4,81879 + 0,0110133*D$ ($R^2 = 0,6579$)						
	E	$\hat{Y} = 5,81458 + 0,0221016**D$ ($R^2 = 0,9089$)						
CT		1	7	15	30	60	120	180
GAMA 3	A	1,94	2,080	2,45	2,66	3,04	3,98	4,05
	B	1,94	2,35	2,86	3,09	3,61	4,08	4,07
	C	1,99	2,25	2,38	2,81	3,07	3,96	4,07
	D	1,76	2,34	2,86	3,12	3,73	4,05	4,15
	E	2,17	2,43	3,01	3,55	3,47	4,74	4,82
	A	$\hat{Y} = 2,16957 + 0,012138**D$ ($R^2 = 0,9191$)						
	B	$\hat{Y} = 2,50361 + 0,0108347**D$ ($R^2 = 0,7763$)						
	C	$\hat{Y} = 2,24226 + 0,011705**D$ ($R^2 = 0,9220$)						
	D	$\hat{Y} = 2,46588 + 0,0114985**D$ ($R^2 = 0,7464$)						
	E	$\hat{Y} = 2,61387 + 0,0142686**D$ ($R^2 = 0,8623$)						
CT		1	7	15	30	60	120	180
BETA	A	32,12	29,22	27,93	26,60	25,95	25,54	24,32
	B	32,86	28,24	27,14	25,84	25,54	24,23	22,84
	C	31,85	27,91	26,38	25,80	25,19	24,50	23,70
	D	32,35	27,51	26,88	25,90	24,35	22,82	22,66
	E	32,80	27,11	25,95	26,05	25,80	24,36	22,97
	A	$\hat{Y} = 29,2393 - 0,0314654*D$ ($R^2 = 0,6482$)						
	B	$\hat{Y} = 28,9484 - 0,0386162*D$ ($R^2 = 0,6380$)						
	C	$\hat{Y} = 28,2542 - 0,0301437*D$ ($R^2 = 0,5535$)						
	D	$\hat{Y} = 28,4143 - 0,0397828*D$ ($R^2 = 0,6394$)						
	E	$\hat{Y} = 28,4255 - 0,0337489*D$ ($R^2 = 0,5337$)						

Continua...

Quadro 9, cont.

CT ¹		Período de Maturação (dias)						
		1	7	15	30	60	120	180
BETA I	A	3,50	5,19	5,66	5,70	5,95	5,91	6,76
	B	3,62	4,31	5,19	5,78	6,32	6,63	6,67
	C	3,48	5,51	5,88	6,51	6,78	7,30	6,30
	D	3,52	5,64	5,59	6,76	6,34	6,50	5,93
	E	3,25	4,48	6,95	7,11	7,06	7,18	7,49
	A	$\hat{Y} = 3,2183 + 0,2817D$ ($1 \leq D \leq 9,8615$) e $\bar{Y} = 5,996$ ($9,8615 \leq D \leq 180$)						
	B	$\hat{Y} = 3,7548 + 0,0732D$ ($1 \leq D \leq 38,0381$) e $\bar{Y} = 6,54$ ($38,0381 \leq D \leq 180$)						
	C	$\hat{Y} = 3,1417 + 0,3383D$ ($1 \leq D \leq 10,0857$) e $\bar{Y} = 6,554$ ($10,0857 \leq D \leq 180$)						
	D	$\hat{Y} = 3,1667 + 0,3533D$ ($1 \leq D \leq 8,6528$) e $\bar{Y} = 6,224$ ($8,6528 \leq D \leq 180$)						
	E	$\hat{Y} = 3,045 + 0,205D$ ($1 \leq D \leq 20,0634$) e $\bar{Y} = 7,158$ ($20,0634 \leq D \leq 180$)						
CT		1	7	15	30	60	120	180
ALFA	A	41,00	35,58	31,66	25,60	23,34	19,77	19,17
	B	41,72	35,42	30,65	26,31	22,06	19,43	18,63
	C	42,15	37,42	32,23	26,73	23,93	19,93	17,91
	D	43,77	33,70	24,29	23,00	22,23	22,09	22,18
	E	41,43	32,99	26,87	22,91	21,69	21,02	20,18
	A	$\hat{Y} = 34,1208 - 0,103452**D$ ($R^2 = 0,7050$)						
	B	$\hat{Y} = 34,0596 - 0,107015**D$ ($R^2 = 0,6936$)						
	C	$\hat{Y} = 35,5037 - 0,116769**D$ ($R^2 = 0,7582$)						
	D	$\hat{Y} = 44,4984 - 1,3798D$ ($1 \leq D \leq 16,0338$) e $\bar{Y} = 22,375$ ($16,0338 \leq D \leq 180$)						
	E	$\hat{Y} = 41,6227 - 1,0251D$ ($1 \leq D \leq 19,6781$) e $\bar{Y} = 21,45$ ($19,6781 \leq D \leq 180$)						
CT		1	7	15	30	60	120	180
PRÉ-ALFA	A	11,27	18,05	22,92	28,79	30,04	32,09	34,89
	B	10,68	18,69	22,99	28,34	30,32	31,87	33,09
	C	10,45	16,52	21,50	25,52	27,89	31,19	34,81
	D	9,52	20,91	29,33	29,51	31,30	31,90	32,50
	E	9,65	20,84	25,56	26,44	26,57	27,31	28,55
	A	$\hat{Y} = 19,4213 + 0,10194*D$ ($R^2 = 0,6611$)						
	B	$\hat{Y} = 19,6027 + 0,0938525*D$ ($R^2 = 0,5978$)						
	C	$\hat{Y} = 17,4963 + 0,109941**D$ ($R^2 = 0,7616$)						
	D	$\hat{Y} = 7,6217 + 1,8983D$ ($1 \leq D \leq 12,2667$) e $\bar{Y} = 30,908$ ($12,2667 \leq D \leq 180$)						
	E	$\hat{Y} = 7,785 + 1,865D$ ($1 \leq D \leq 10,2418$) e $\bar{Y} = 26,886$ ($10,2418 \leq D \leq 180$)						

* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

¹ CT = Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

As frações das α_s -caseínas foram as mais expressivas na hidrólise da caseína, principalmente nos primeiros dias de maturação, para os controles D e E, indicando a influência do aumento da temperatura e contrariando os estudos de LÓPEZ-FANDIÑO et al. (1991), que não encontraram diferenças significativas na degradação de α_s e β caseínas sob temperaturas elevadas de maturação. As enzimas residuais do coalho favorecem a hidrólise desta fração nos primeiros dias de maturação (GAIASCHI et al., 2000), sendo evidenciada a diminuição ($P < 0,01$) desta fração para todos os controles de temperatura.

As frações pré- α_s -caseínas apresentaram aumento significativo ao longo dos períodos de maturação para os queijos armazenados nos controles de temperatura A, B e C; nos controles de temperatura D e E esse aumento ocorreu até os 12 e os 10 primeiros dias de maturação, respectivamente, mantendo-se, após, constante até 180 dias de maturação.

A fração β -caseína promoveu através da sua hidrólise a formação das gamas caseínas, conforme observado no Quadro 10. A γ_2 -caseína não apresentou correlação ($P > 0,05$) com as demais frações no controle de temperatura A. As frações γ_1 -caseína e γ_3 -caseína foram altamente correlacionadas entre si. A fração α_s -caseína apresentou correlação significativa negativa com as demais frações, o mesmo acontecendo com a fração β -caseína. As frações β -I e pré- α_s -caseína apresentaram correlações positivas com as demais frações, por serem produtos de degradação de suas precursoras β e α_s -caseína, respectivamente. A fração β -caseína apresentou correlação negativa com as frações γ_1 , γ_2 e γ_3 -caseínas. A fração α_s -caseína não apresentou correlação com a β -caseína no controle de temperatura D.

As correlações obtidas entre as frações nitrogenadas e as frações caseínicas, apresentadas no Quadro 11, mostram que todas as frações caseínicas mantiveram associações com o nitrogênio solúvel (NS), as quais fazem parte da sua composição, indicando o índice de proteólise do queijo ao longo da maturação, principalmente em função da ação do coalho residual agindo sobre a fração α_s -caseína (DUMAIS et al., 1991). Não ocorreram correlações entre as frações amoniacaís ($P > 0,05$) e as frações γ_1 , γ_2 e γ_3 -caseínas, quando avaliadas nos controles de temperatura A, C, D e E. Do mesmo modo, não houve correlações ($P < 0,05$) entre as frações nitrogenadas e a fração β -I-caseína nos controles C, D e E.

Quadro 10 – Correlações entre as frações caseínicas do queijo Zamorano DOP submetido a diferentes controles de temperatura, durante os períodos de maturação

	γ_1 -cn ¹	γ_3 -cn	β -cn	β -I-cn	α -cn	pré α -cn
A ¹						
γ_2 -cn ¹	0,66	0,60	-0,53	0,26	-0,66	0,56
γ_1 -cn		0,99**	-0,88**	0,79*	-0,91**	0,87*
γ_3 -cn			-0,92**	0,84*	-0,94**	0,91**
β -cn				-0,92**	0,98**	-0,99**
β -I-cn					-0,83*	0,88*
α -cn						-0,99**
B						
γ_2 -cn	0,96**	0,96**	-0,95**	0,89**	-0,92**	0,87*
γ_1 -cn		0,88*	-0,95**	0,81*	-0,85*	0,82**
γ_3 -cn			-0,95**	0,98**	-0,99**	0,96**
β -cn				-0,94**	0,96**	-0,95**
β -I-cn					-0,99**	0,99**
α -cn						-0,99**
C						
γ_2 -cn	0,79*	0,85*	-0,88*	0,61	-0,86*	0,87*
γ_1 -cn		0,99**	-0,93**	0,77*	-0,96**	0,95**
γ_3 -cn			-0,93**	0,71	-0,95**	0,95**
β -cn				-0,72	0,99**	-1,00**
β -I-cn					-0,79*	0,72
α -cn						-0,99**
D						
γ_2 -cn	0,83*	0,81*	-0,77*	0,74*	-0,83*	0,82*
γ_1 -cn		0,95**	-0,91**	0,52	-0,92**	0,96**
γ_3 -cn			-0,99**	0,46	-0,81*	0,88*
β -cn				-0,43	0,71	-0,80*
β -I-cn					-0,57	0,48
α -cn						-0,98**
E						
γ_2 -cn	0,82*	0,95**	-0,94**	0,70	-0,86*	0,83*
γ_1 -cn		0,97**	-0,93**	0,65	-0,83*	0,80*
γ_3 -cn			-0,94**	0,74	-0,87*	0,86*
β -cn				-0,70	0,78*	-0,82*
β -I-cn					-0,93**	0,97**
α -cn						-0,97**

** Significativo pelo teste t (P < 0,01).

* Significativo pelo teste t (P < 0,05).

¹ A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

² γ_2 -cn (γ_2 -caseína), γ_1 -cn (γ_1 -caseína), γ_3 -cn (γ_3 -caseína), β -cn (β -caseína), β -I-cn (β -I-caseína), α -cn (α -caseína), pré α -cn (α -caseína).

Quadro 11 – Correlações entre frações nitrogenadas e frações caseínicas do queijo Zamorano DOP submetido a diferentes controles de temperatura, durante os períodos de maturação

	γ_2 -cn ¹	γ_1 -cn	γ_3 -cn	β -cn	β -I-cn	α -cn	pré α -cn
A ²							
NS ³	0,69	0,98**	0,98**	-0,94**	0,85*	-0,95**	0,92**
NNP	0,53	0,96**	0,96**	-0,94**	0,92**	-0,91**	0,90**
NH ₃	0,42	0,71	0,77*	-0,85*	0,92**	-0,77*	0,80*
NH ₂	0,51	0,98**	0,98**	-0,86*	0,80*	-0,87*	0,84*
NC	-0,69	-0,98**	-0,98**	0,94**	-0,85*	0,95**	-0,92**
NP	0,87*	0,91**	0,90**	-0,85*	0,67	-0,92**	0,86*
Npp	-0,53	-0,96**	-0,96**	0,94**	-0,92**	0,91**	-0,90**
Npept	0,49	0,83*	0,83*	-0,91**	0,92**	-0,85*	0,86*
B							
NS	0,98**	0,98**	0,94**	-0,97**	0,88*	-0,92**	0,88*
NNP	0,98**	0,99**	0,93**	-0,96**	0,85*	-0,90**	0,86*
NH ₃	0,96**	0,93**	0,87*	-0,84*	0,75*	-0,80*	0,71
NH ₂	0,97**	0,99**	0,89**	-0,93**	0,80*	-0,84*	0,79*
NC	-0,98**	-0,98**	-0,94**	0,97**	-0,88*	0,92**	-0,88*
NP	0,97**	0,96**	0,95**	-0,98**	0,91**	-0,94**	0,91**
Npp	-0,98**	-0,99**	-0,92**	0,96**	-0,85*	0,90**	-0,86*
Npept	0,96**	0,96**	0,92**	-0,96**	0,87*	-0,92**	0,89**
C							
NS	0,79*	0,98**	0,98**	-0,94**	0,64	-0,94**	0,96**
NNP	0,80*	0,98**	0,99**	0,92**	0,65	-0,93**	0,94**
NH ₃	0,56	0,93**	0,90**	-0,76*	0,73	-0,80*	0,78*
NH ₂	0,85*	0,94**	0,97**	-0,90**	0,57	-0,89**	0,91**
NC	-0,79*	-0,98**	-0,98**	0,94**	-0,64	0,94**	-0,96**
NP	0,75*	0,95**	0,95**	-0,95**	0,62	-0,95**	0,97**
Npp	-0,80*	-0,98**	-0,99**	0,92**	-0,65	0,93**	-0,94**
Npept	0,73	0,99**	0,98**	-0,90**	0,69	0,93**	0,93**
D							
NS	0,79*	0,94**	1,00**	-0,99**	0,45	-0,78*	0,86*
NNP	0,74*	0,91**	0,98**	-1,00**	0,45	-0,71	0,79*
NH ₃	0,69	0,44	0,33	-0,35	0,55	-0,39	0,36
NH ₂	0,67	0,91**	0,97**	-0,98**	0,30	-0,72	0,81*
NC	-0,79*	0,94**	-1,00**	0,99**	-0,45	0,78*	-0,86*
NP	0,83*	0,92**	0,97**	-0,92**	0,42	-0,87*	0,93**
Npp	-0,74*	-0,91**	-0,98**	1,00**	-0,45	0,71	-0,79*
Npept	0,77*	0,88*	0,96**	-0,98**	0,56	-0,68	0,75*
E							
NS	0,99**	0,99**	0,96**	-0,91**	0,72	-0,90**	0,85*
NNP	0,99**	0,99**	0,96**	-0,93**	0,68	-0,86*	0,82*
NH ₃	0,51	0,56	0,52	-0,24	0,33	-0,59	0,39
NH ₂	0,99**	0,99**	0,97**	-0,97**	0,66	-0,81*	0,81*
NC	-0,99**	0,99**	-0,96**	0,91**	-0,72	0,90**	-0,85*
NP	0,95**	0,94**	0,92**	-0,83*	0,80*	-0,95**	0,89**
Npp	-0,99**	-0,99**	-0,96**	0,93**	-0,68	0,86*	-0,82*
Npept	0,96**	0,97**	0,92**	-0,85*	0,67	-0,88**	0,81*

** Significativo pelo teste t (P < 0,01); * Significativo pelo teste t (P < 0,05).

¹ γ_2 -cn(γ_2 -caseína), γ_1 -cn (γ_1 -caseína), γ_3 -cn (γ_3 -caseína), β -cn (β -caseína), β -I-cn (β -I-caseína), α -cn(α -caseína), pré α -cn(α -caseína).

² A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

³ NS (nitrogênio solúvel), NNP (nitrogênio não-protéico), NH₃ (nitrogênio amoniacal), NH₂ (nitrogênio amínico), NC (nitrogênio caseínico), NP (nitrogênio protéico), Npp (nitrogênio proteose-peptona), Npept (nitrogênio peptídico).

3.4. Perfil aminoacídico

3.4.1. Teor de aminoácidos no queijo Zamorano DOP

Segundo FANELON et al. (2000), as características do queijo (Aw, pH, sal/umidade) afetam a proteólise e se refletem no perfil dos compostos solúveis, principalmente na formação de peptídeos e aminoácidos, sendo estes envolvidos diretamente na textura e no *flavor* e indiretamente na formação de ácidos graxos livres. O atributo organoléptico é muito importante na qualidade do queijo, principalmente no que se refere ao sabor (McSWEENEY e FOX, 1997; SOUSA et al., 2001).

ENGELS e VISSER (1994) analisaram frações de nitrogênio solúvel (NS) dos queijos Cheddar, Edam, Gouda e Parmesão e sugeriram que compostos de baixo peso molecular (< 500 Da), como peptídeos pequenos e aminoácidos livres, produtos da quebra da caseína, são os responsáveis pelo sabor básico do queijo. A relativa proporção dos aminoácidos individuais é muito importante, desenvolvendo papel fundamental no *flavor* (ENGELS e VISSER, 1994; MOLINA et al., 1999).

As Figuras 32, 33, 34, 35 e 36 representam as percentagens de aminoácidos presentes no queijo Zamorano DOP, para os diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E), durante os 7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias de maturação. Os seis aminoácidos que apresentaram maior quantidade durante toda a maturação foram ácido glutâmico (Glu), leucina (Leu), prolina (Pro), lisina (Lys), asparagina (Asn) e fenilalanina (Phe), para os controles de temperatura A, B, C e D. No controle de temperatura E, a prolina aparece em quarto lugar, após a lisina, sugerindo que com o aumento de temperatura a liberação da prolina foi dificultada.

Resultados semelhantes foram obtidos por WILKINSON et al. (1992), em um experimento com queijo Cheddar, utilizando peptidases para acelerar a maturação. Os aminoácidos que apareceram em maior concentração foram semelhantes aos do queijo Zamorano DOP: ácido glutâmico, leucina, lisina e fenilalanina.

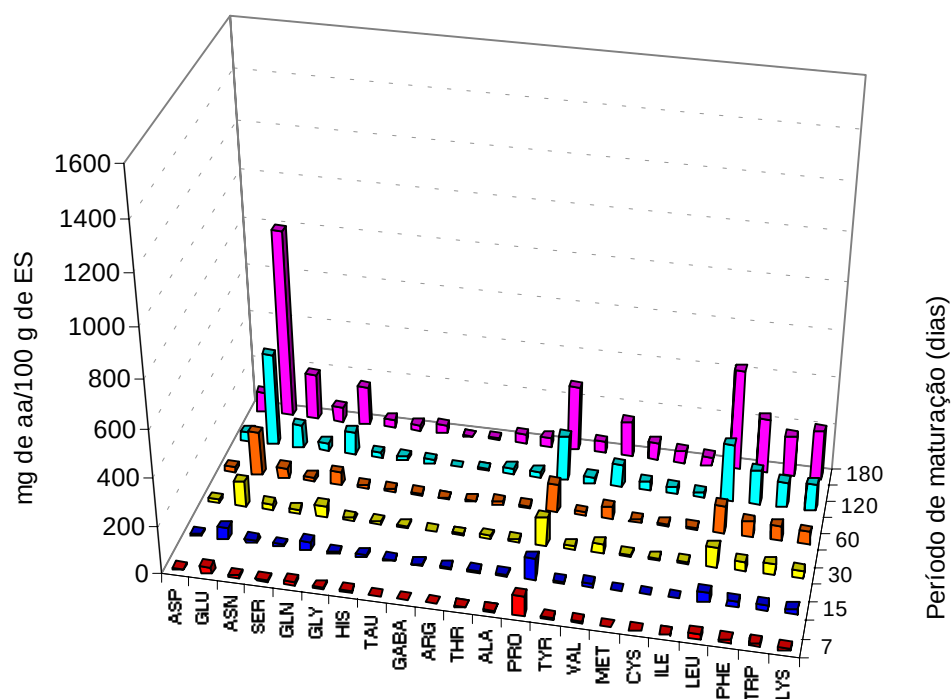


Figura 32 – Teores de aminoácidos em mg/100 g de ES (extrato seco) do queijo Zamorano DOP submetido ao controle de temperatura A (10 °C até os 180 dias de maturação).

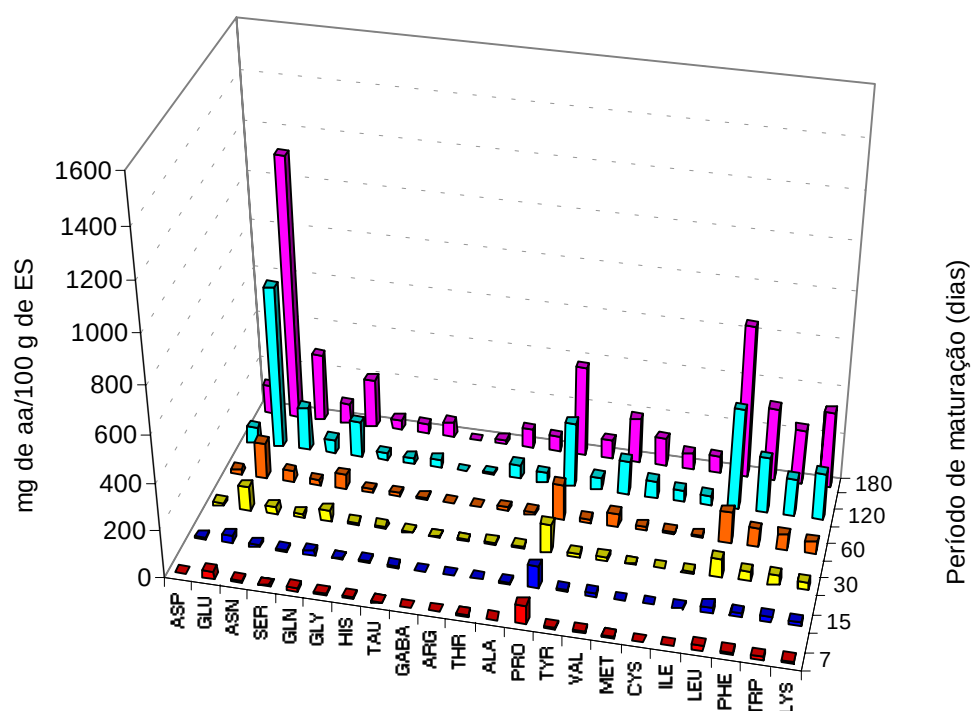


Figura 33 – Teores de aminoácidos em mg/100 g de ES (extrato seco) do queijo Zamorano DOP submetido ao controle de temperatura B (10 °C até 60 dias e 15°C de 60 até 180 dias de maturação).

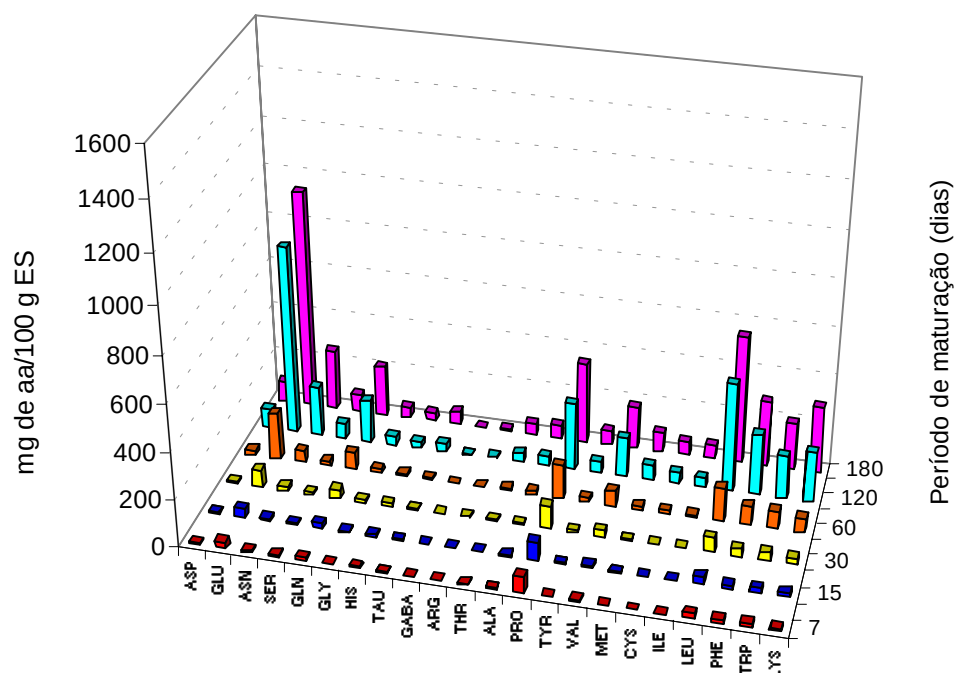


Figura 34 – Teores de aminoácidos em mg/100 g de ES (extrato seco) do queijo Zamorano DOP submetido ao controle de temperatura C (10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias de maturação).

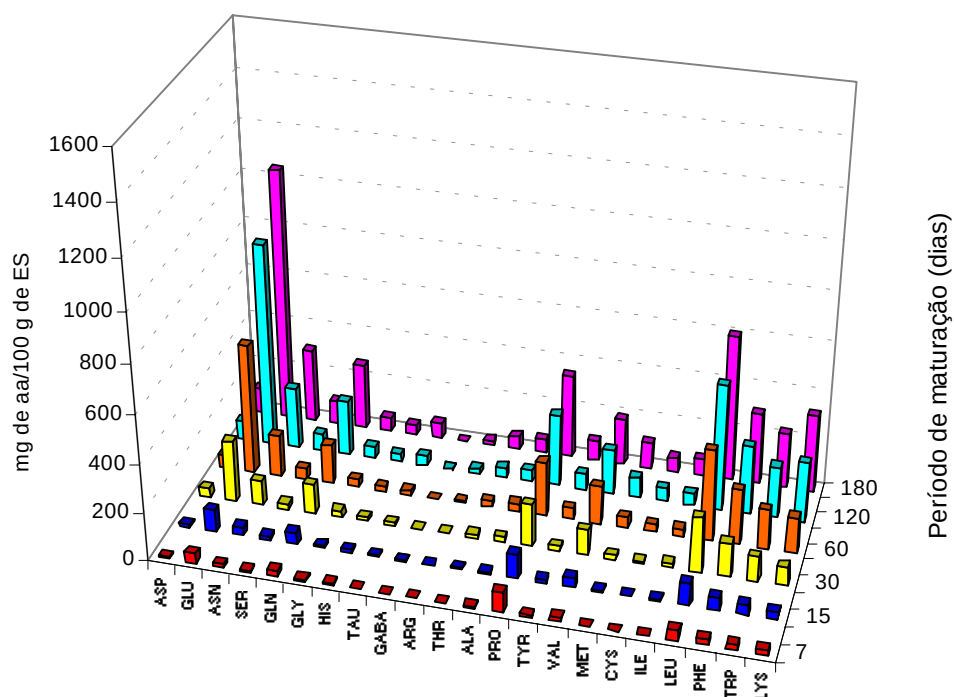


Figura 35 – Teores de aminoácidos em mg/100 g de ES (extrato seco) do queijo Zamorano DOP submetido ao controle de temperatura D (15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias de maturação).

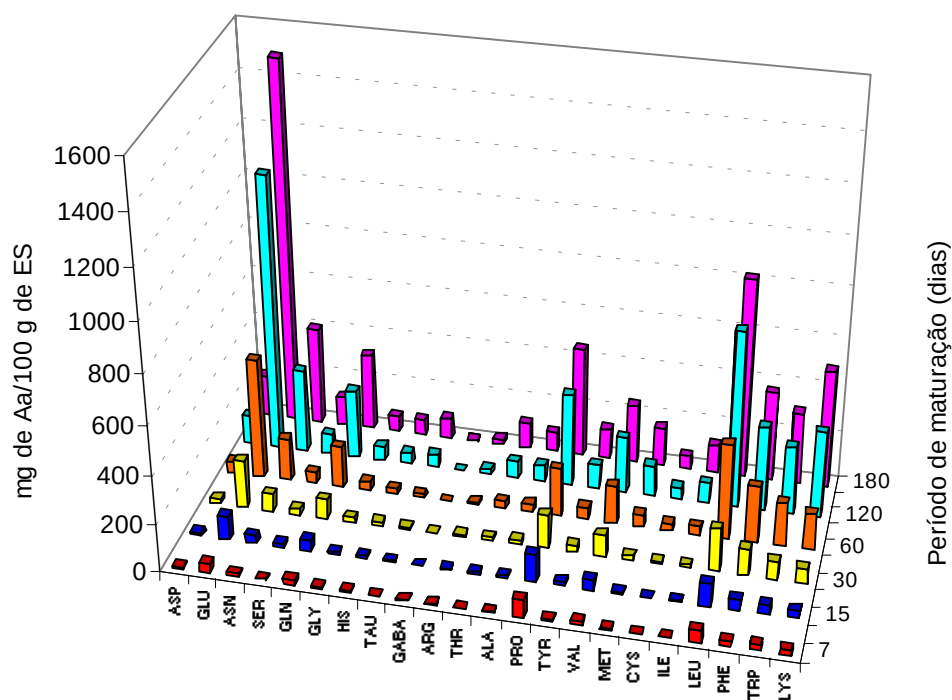


Figura 36 – Teores de aminoácidos em mg/100 g de ES (extrato seco) do queijo Zamorano DOP submetido ao controle de temperatura E (15 °C até os 180 dias de maturação).

Em estudos realizados com queijo de leite de ovelha (ORDÓÑEZ et al., 1998) para verificar o efeito dos períodos de lactação sobre a proteólise foram encontradas maiores quantidades de ácido glutâmico, leucina, valina, lisina e fenil alanina. VICENTE et al. (2000), quando verificavam a influência das culturas *starter* e do tipo de coalho na maturação do queijo Idiazábal, feito com leite de ovelha, constataram maior conteúdo dos aminoácidos leucina, ácido glutâmico, valina e fenilalanina. MENDIA et al. (2000) encontraram para o mesmo queijo Idiazábal altos valores de ácido glutâmico, ornitina, ácido aspártico e prolina. O ácido glutâmico é o aminoácido que mais apareceu durante a maturação dos queijos, como mencionado anteriormente.

Certos aminoácidos encontram-se presentes nos queijos, mas não nas caseínas, como é o caso do GABA, detectado em diferentes tipos de queijo, muitas vezes em doses apreciáveis. No queijo Zamorano, este aminoácido se comportou de forma diferente da dos demais 21 aminoácidos. Essa diferença de comportamento pode ser devida à assimilação, à excreção ou à lise microbiana,

mas também pode ser resultado das manipulações e degradações profundas dos aminoácidos (CHOISY et al., 1987).

Alguns aminoácidos podem contribuir para o sabor amargo dos queijos, como é o caso da arginina (ORTIGOSA et al., 2001) e dos aminoácidos hidrofóbicos, como, por exemplo, a isoleucina (SOUSA et al., 2001). Enquanto os aminoácidos prolina, serina e asparagina têm sido relatados como os responsáveis pelo sabor doce (ORTIGOSA et al., 2001), ácido glutâmico, histidina e ácido aspártico são os responsáveis pelo sabor azedo do queijo (SOUSA et al., 2001). Por outro lado, metionina e cistina produzem compostos que são essenciais na formação do componente do *flavor* do queijo Cheddar (URBACH, 1993).

O ácido glutâmico, juntamente com a prolina, provavelmente são os responsáveis pelo sabor característico do queijo Zamorano, além da importância das quantidades destes aminoácidos no queijo para a produção do *flavor*. Estes aminoácidos estão relacionados com o aumento de nitrogênio solúvel, sendo, portanto, um indicador da proteólise que influencia diretamente a textura do queijo. Cada variedade ou o mesmo cada tipo de queijo apresenta um perfil característico de aminoácidos livres, os quais vão ser responsáveis pelo seu *flavor* específico, dependendo especificamente do tipo de tratamento atribuído ao queijo.

O Quadro 12 apresenta valores dos principais aminoácidos que apareceram no queijo Zamorano DOP aos 180 dias de maturação. O controle de temperatura E (15 °C) apresentou praticamente o dobro do valor em mg de aa/ES, quando comparado com o controle de temperatura A (10 °C), indicando que a proteólise foi mais intensa com o aumento de temperatura. Este efeito pode ser devido aos altos níveis de peptidases no queijo durante a maturação e à alta temperatura (ASTON et al., 1983, 1985; FEDRICK et al., 1983; LAWRENCE e GILLES, 1993). O aumento de apenas 3 °C na temperatura de maturação acelerou a proteólise; conseqüentemente, a aceleração da maturação de queijos através do aumento da temperatura tem sido um método atrativo (ROSENBERG e ALTEMUELLER, 2001). Extensa revisão foi realizada por WILKINSON (1993), indicando ser a temperatura um excelente método para desenvolver atributos de qualidade no queijo.

Quadro 12 – Principais aminoácidos presentes no queijo Zamorano DOP e média de seus teores expressa em mg/100 g de ES (extrato seco), nos diferentes controles de temperatura, aos 180 dias de maturação

aas ¹	Controle de Temperatura ²				
	A	B	C	D	E
Glu	800,20	1.117,94	934,81	1.042,74	1.485,20
Leu	427,06	647,30	550,62	606,51	821,93
Lys	208,48	326,18	290,04	321,23	484,75
Pro	274,95	382,59	342,43	345,78	451,80
Asn	191,61	289,34	257,15	251,54	400,71
Phe	231,60	311,91	284,80	298,30	369,66
Gln	165,24	209,38	214,73	268,95	315,26
Tyr	169,99	233,40	204,04	226,87	295,14
Val	148,80	189,93	180,07	191,82	240,24
Asp	83,66	118,94	87,47	102,94	171,40

¹ aas = aminoácidos; Glu = ácido glutâmico; Leu = leucina; Lys = lisina; Pro = prolina; Asn = asparagina; Phe = fenilalanina; Gln = glicina; Tyr = tirozina; Asp = ácido aspártico.

² CT = Controles de temperatura: A = 10 °C até os 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até os 180 dias.

3.4.2. Análise de fatores para aminoácidos

A exemplo da análise por componentes principais e por variáveis canônicas, a análise de fatores também tem por objetivos a estruturação e a simplificação de dados originais, em que um número relativamente grande de variáveis possa ser representado por um número menor, expresso por combinações lineares desses dados originais, conservando o máximo possível de suas informações (JOHNSON e WICHERN, 1988). Cada fator é altamente correlacionado com o subgrupo de variáveis inter-relacionadas (RESSURECIÓN, 1988; CHAPMAN et al., 2001). Esta metodologia utiliza a rotação Varimax, com o objetivo de tornar os fatores mais facilmente interpretáveis e agrupar em cada fator as características mais correlacionadas com este. A carga fatorial com valor absoluto maior que 0,64 será utilizada para o agrupamento da característica no fator. Conforme se verifica no Quadro 13, todos os aminoácidos, com exceção do GABA (ácido γ -aminobutírico), tiveram um mesmo comportamento e agruparam-se em um mesmo fator.

Quadro 13 – Fatores após a rotação de Varimax para os aminoácidos presentes no queijo Zamorano DOP submetido a diferentes controles de temperatura, durante os períodos de maturação

Aminoácido	Comunalidade	Fator 1
ASP	0,97696	0,98842¹
GLU	0,9906	0,99529
ASN	0,99571	0,99785
SER	0,9893	0,99464
GLN	0,97327	0,98654
GLY	0,97386	0,98684
HIS	0,96804	0,98389
TAU	0,9567	0,97811
GABA	0,23784	0,48769
ARG	0,89304	0,94501
THR	0,93552	0,96722
ALA	0,99608	0,99804
PRO	0,98627	0,99311
TYR	0,98399	0,99196
VAL	0,94511	0,97217
MET	0,98668	0,99332
CYS	0,89284	0,9449
ILE	0,98466	0,9923
LEU	0,99465	0,99732
PHE	0,9641	0,98188
TRP	0,97574	0,9878
LYS	0,98992	0,99495
Autovalor		20,59087
Explicação		0,93595

Fator 1 = ASP, GLU, ASN, SER, GLN, GLY, HIS, TAU, ARG, THR, ALA, PRO, TYR, VAL, CYS, MET, ILE, LEU, PHE, TRP e LYS.

GABA não se agrupou em fator.

¹ Cargas fatoriais maiores do que 0,64 em valor absoluto são apresentadas em negrito.

O fator 1 é composto por 21 aminoácidos que apresentaram comportamentos semelhantes ao longo do experimento. De acordo com o Quadro 14, observa-se que sete dias de maturação foram suficientes para aumentar o valor do fator 1 nos queijos, em relação ao dia de fabricação ($P < 0,05$). Também se observa que o controle de temperatura E apresentou maior valor ($P < 0,05$), em relação aos demais controles, nos períodos de maturação de 60, 120 e 180 dias. Portanto, o controle de temperatura E induziu maior concentração nos queijos

para os 21 aminoácidos que formam o fator 1. Além disso, os valores deste fator aumentaram ($P < 0,01$) linearmente em função dos períodos de maturação para todos os controles de temperatura. A atividade proteolítica durante a maturação do queijo é de primordial importância no desenvolvimento dos atributos de qualidade e conduz, entre outros, ao acúmulo de aminoácidos livres (FOX et al., 1993).

Quadro 14 – Escores do fator 1 em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ¹	Período de maturação (dias)						
	1	7	15	30	60	120	180
A	0,21 B	0,33 ab A	0,43 b A	0,51 d A	0,65 d A	1,14 e A	1,90 d A
B		0,35 ab A	0,32 c A	0,57 c A	0,75 c A	1,96 d A	2,86 b A
C		0,30 b A	0,35 c A	0,47 d A	0,79 c A	2,05 c A	2,44 c A
D		0,37 a A	0,56 a A	1,05 a A	1,58 b A	2,38 b A	2,82 b A
E		0,36 a A	0,57 a A	0,90 b A	1,65 a A	3,10 a A	3,79 a A
A	$\hat{Y} = 0,235333 + 0,00861957^{**}D$ ($R^2 = 0,9751$)						
B	$\hat{Y} = 0,10017 + 0,01509^{**}D$ ($R^2 = 0,9832$)						
C	$\hat{Y} = 0,138231 + 0,0134879^{**}D$ ($R^2 = 0,9687$)						
D	$\hat{Y} = 0,488463 + 0,0141134^{**}D$ ($R^2 = 0,9529$)						
E	$\hat{Y} = 0,31404 + 0,0206096^{**}D$ ($R^2 = 0,9823$)						
CV (Parcelas) = 1,94%				CV (Subparcelas) = 1,23%			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula da média referente ao tempo de um dia, na linha, não diferem desta pelo teste de Dunnett ($P > 0,05$).

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

¹ CT = Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Neste caso, pode-se sugerir que o fator 1 é um indicador da atividade proteolítica, mostrando intensa correlação com o desenvolvimento do *flavor* no queijo (ASTON et al., 1983; AMANTEA et al., 1986). Os aminoácidos livres contribuem para o desenvolvimento do *flavor*, estando diretamente envolvidos, como resultado da conversão catabólica em compostos voláteis e não-voláteis (ROSENBERG e ALTEMUELLER, 2001).

Para o aminoácido GABA (Quadro 15), o comportamento em relação aos controles de temperatura foi bastante irregular, ora com maior valor ($P < 0,05$) no controle A (15 dias), ora com maior valor ($P < 0,05$) no controle E (120 dias). Também, aos 7 dias de maturação, houve aumento ($P < 0,05$) na concentração deste aminoácido em relação ao dia da fabricação, com exceção do controle A, que não conseguiu manter os valores neste nível, aos 30, 60 e 120 dias, os quais foram semelhantes ($P > 0,05$) aos da testemunha (1 dia). Em relação aos períodos de maturação, não houve alteração ($P < 0,05$) dos valores para todos os controles de temperatura.

Quadro 15 – Médias do aminoácido GABA em relação aos controles de temperatura (CT) e períodos de maturação

CT ¹	Período de maturação (dias)						
	1	7	15	30	60	120	180
A	0,85 B	1,35 b A	1,48 a A	0,83 d B	0,96 c B	0,87 d B	1,02 d A
B		1,47 a A	0,98 d A	1,41 a A	1,25 a A	1,33 c A	1,24 c A
C		1,10 cd A	1,14 c A	1,11 c A	1,10 b A	1,31 c A	1,47 b A
D		1,16 c A	1,23 b A	1,27 b A	1,11 b A	1,43 b A	1,54 a A
E		1,07 d A	1,25 b A	1,21 b A	1,19 a A	1,55 a A	1,41 b A
A	$\bar{Y} = 1,09$						
B	$\bar{Y} = 1,28$						
C	$\bar{Y} = 1,21$						
D	$\bar{Y} = 1,29$						
E	$\bar{Y} = 1,28$						
CV (Parcelas) = 2,37%				CV (Subparcelas) = 1,79%			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula da média referente ao tempo de um dia, na linha, não diferem desta pelo teste de Dunnett ($P > 0,05$).

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

GABA = ácido γ -aminobutírico

¹ CT = Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

O ácido glutâmico é o aminoácido que aparece em maior proporção durante a maturação do queijo Zamorano e de outros queijos (WILKINSON

et al., 1992; IBÁÑEZ et al., 1995; ORDÓÑEZ et al., 1998; MENDIA et al., 2000; VICENTE et al., 2000). Devido à importância deste aminoácido no desenvolvimento do *flavor* durante a maturação (ROSENBERG e ALTEMUELLER, 2001), ele foi escolhido para representar a variação apresentada pelos demais aminoácidos nos diferentes controles de temperatura ao longo dos períodos de maturação.

De acordo com as médias para o ácido glutâmico (Quadro 16), pode-se observar, visualmente, que o aumento mais acentuado ocorreu para o controle de temperatura E. O aumento do ácido glutâmico em relação ao queijo controle de um dia até 180 dias de maturação foi de 39,47; 55,55; 46,28; 51,74; e 74,12 vezes, para os controles de temperatura A, B, C, D e E, respectivamente.

Quadro 16 – Médias e equações de regressão do aminoácido ácido glutâmico no queijo Zamorano submetido a diferentes controles de temperatura, em diferentes períodos de maturação

CT ¹	Período de maturação (dias)						
	1	7	15	30	60	120	180
A	19,77	28,24	49,50	108,89	186,75	393,53	800,19
B		28,43	32,27	100,50	153,51	690,38	1117,94
C		27,33	39,88	78,02	200,55	803,69	934,81
D		41,05	92,48	251,14	533,86	841,87	1042,74
E		38,26	98,28	199,20	494,65	1130,24	1485,20
A	$\hat{Y} = -30,9654 + 4,25462^{**}D$ ($R^2 = 0,9670$)						
B	$\hat{Y} = -92,0795 + 6,49398^{**}D$ ($R^2 = 0,9715$)						
C	$\hat{Y} = -55,9212 + 5,87335^{**}D$ ($R^2 = 0,9512$)						
D	$\hat{Y} = 61,7501 + 5,90446^{**}D$ ($R^2 = 0,9609$)						
E	$\hat{Y} = -26,5784 + 8,75076^{**}D$ ($R^2 = 0,9907$)						

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

¹ CT = Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

De acordo com os resultados, a temperatura de 15 °C pareceu influenciar a liberação de aminoácidos livres no queijo durante toda a maturação, duplicando os seus valores em relação aos queijos submetidos à temperatura de 10 °C, para os períodos de maturação de 60, 120 e 180 dias de maturação. Essa alta produção

de aminoácidos pode ter sido influenciada pela ação de exopeptidases dos microrganismos presentes (GRIPON et al., 1977), podendo reduzir o tempo de maturação pela metade (FEDRICK et al., 1983), quando se aplica a temperatura de 15 °C.

Conforme exposto anteriormente, o aumento ou a diminuição da temperatura de maturação pode ser usado correntemente no controle e desenvolvimento do *flavor*, podendo retardar ou acelerar a maturação (NÚÑEZ et al., 1986). De acordo com o Quadro 15, pode-se estimar o valor de 394,50 mg de ácido glutâmico por extrato seco aos 100 dias para o controle de temperatura A. Este mesmo valor pode ser obtido no controle E aos 48 dias. Isso vem confirmar as discussões feitas anteriormente e apoiadas por outros pesquisadores (FEDRICK et al., 1983).

O ácido glutâmico foi utilizado como representante do fator 1, no cálculo das correlações com os efeitos dos parâmetros físico-químicos e químicos do queijo Zamorano DOP, o mesmo acontecendo para as correlações com as frações nitrogenadas e com as frações caseínicas.

Quanto às correlações dos efeitos físico-químicos e químicos com ácido glutâmico (Quadro 18), o pH apresentou correlação negativa ($P < 0,05$) nos controles de temperatura A, B e C e não mostrou correlação ($P > 0,05$) com os controles de temperatura D e E. A acidez foi correlacionada positivamente ($P < 0,01$) nos controles de temperatura B, C, D e E, com menor correlação ($P < 0,05$) no controle de temperatura A. Isso é explicado em função de este aminoácido apresentar um caráter ácido e o queijo ter apresentado valores de acidez entre 1,25 e 2,21 g de ácido láctico por extrato seco durante a maturação.

A atividade de água (A_w) é fundamental para o desenvolvimento microbiano, a seletividade microbiana e para a ação das enzimas durante a maturação (CHOISY et al., 1987). Ela apresentou (Quadro 17) coeficiente de correlação negativo ($P < 0,01$) com o ácido glutâmico, bem como com a umidade, a proteína e a lactose. Esse fato pode ser explicado pela diminuição da água livre no queijo e pela liberação de íons H^+ dos aminoácidos no meio (POMAR, 2001b), assim como pela penetração do sal na matriz do queijo ao longo da maturação (FURTADO, 1991), o que justifica a correlação positiva ($P < 0,01$) com a acidez e com os cloretos na umidade. O teor de sal é muito importante, porque influencia a atividade proteolítica das enzimas (LABORDA e RUBIOLO, 1999).

Quadro 17 – Correlações entre as análises físico-químicas com o ácido glutâmico no queijo Zamorano DOP submetido a diferentes controles de temperatura, em diferentes períodos de maturação

CT ¹	aa ²	pH	ACI	AW	ES	UMI	GORD	PROT	LACT	CI/ES	CI/U
A	GLU	-0,71	0,86*	-0,93**	0,91**	-0,90**	0,20	-0,84*	-0,86*	0,88*	0,84*
B	GLU	-0,79*	0,88**	-0,96**	0,94**	-0,94**	-0,96**	-0,97**	-0,87*	0,92**	0,75*
C	GLU	-0,83*	0,94**	-0,97**	0,94**	-0,94**	-0,43	-0,84*	-0,89**	0,91**	0,90**
D	GLU	-0,63	0,93**	-1,00**	0,99**	-0,99**	0,19	-0,91**	-0,92**	0,99**	0,99**
E	GLU	-0,60	0,90**	-0,99**	0,99**	-0,99**	-0,03	-0,88*	-0,83*	0,98**	0,95**

** Significativo (P < 0,01) pelo teste t.

* Significativo pelo teste t (P < 0,05).

¹ CT = Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

² aa = aminoácido

Foi observado (Quadro 18) que as frações nitrogenadas apresentaram correlações positivas (P<0,01) com o ácido glutâmico em todos os controles de temperatura, com exceção das obtidas com NH₃ nos controles D e E, pois esta fração difere muito com relação ao tipo de queijo e ao tratamento recebido (CHOISY et al., 1987). Confirmada essa correlação positiva (P<0,01) da fração amínica com o ácido glutâmico, tem-se que, quanto maior o teor de nitrogênio amínico, maior a presença de aminoácido no meio e maior a proteólise.

Quadro 18 – Correlações entre as frações nitrogenadas e o ácido glutâmico no queijo Zamorano DOP submetido a diferentes controles de temperatura, em diferentes períodos de maturação

CT ¹	aa ²	NT	NNP	NH ₃	NH ₂	NC	NP	Npp	Npept
A	GLU	0,88**	0,96**	0,81*	0,90**	-0,88**	0,68	-0,96**	0,91**
B	GLU	0,96**	0,97**	0,87*	0,99**	-0,96**	0,92**	0,97**	0,93**
C	GLU	0,95**	0,98**	0,87*	0,99**	-0,95**	0,89**	-0,98**	0,93**
D	GLU	0,97**	0,99**	0,24	0,99**	-0,97**	0,87*	-0,99**	0,96**
E	GLU	0,94**	0,96**	0,40	0,99**	-0,94**	0,86*	-0,96**	0,91**

** Significativo (P < 0,01) pelo teste t.

* Significativo pelo teste t (P < 0,05).

¹ CT = Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

² aa = aminoácido (Glu = ácido glutâmico).

Correlações negativas ($P < 0,01$) ocorreram na produção do ácido glutâmico com as frações caseínicas e protéicas, como era de se esperar, pois, com a degradação destas frações, maior o teor de aminoácidos livres no meio (Quadro 19).

Quadro 19 – Correlações entre as frações caseínicas e o ácido glutâmico no queijo Zamorano DOP submetido a diferentes controles de temperatura, em diferentes períodos de maturação

CT ¹	aa ²	GAMA2	GAMA1	GAMA3	BETA	BETA1	ALFA	PRÉ- α
A	GLU	0,30	0,88**	0,89**	-0,85*	0,93**	-0,79*	0,80*
B	GLU	0,94**	0,99**	0,82*	-0,91**	0,73*	-0,78*	0,74*
C	GLU	0,81*	0,94**	0,97**	-0,85*	0,54	-0,85*	0,87*
D	GLU	0,64	0,86*	0,96**	-0,98**	0,32	-0,63	0,74*
E	GLU	0,97**	0,98**	0,94**	-0,96**	0,56	-0,73*	0,73*

** Significativo ($P < 0,01$) pelo teste t

* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

¹ CT = Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

² aa = aminoácido (Glu = ácido glutâmico).

As correlações entre as frações protéicas e os aminoácidos, representados pelo ácido glutâmico, estão apresentadas no Quadro 19. Em todos os controles de temperatura, as frações alfa e beta apresentaram correlações negativas ($P < 0,01$). Todas as outras frações são provenientes da degradação destas, portanto apresentaram correlação positiva ($P < 0,01$). O resultado dessa degradação se deve inicialmente à hidrólise por ação do coalho residual, proteinases do leite e ação de proteinases dos microrganismos e, posteriormente, à atuação de endo e exopeptidases da microbiota presente no queijo, o que libera peptídeos pequenos e aminoácidos livres (SOUSA et al., 2001). A exceção ocorreu com relação à gama 1 nos controles de temperatura A e D e para beta 1 nos controles de temperatura C, D e E, que não apresentaram correlação ($P > 0,05$), provavelmente porque a maior parte dos aminoácidos presentes no meio não era decorrente destas frações e, portanto, não sofreu influência da temperatura de maturação.

4. CONCLUSÕES

Pelos valores dos índices de proteólise na extensão (NS/NT) e na profundidade (NNP/NT), foi possível monitorar a proteólise do queijo Zamorano DOP, concluindo-se que estes índices foram maiores nos queijos submetidos a temperaturas mais elevadas durante a maturação. Também foi observado que nos queijos maturados a 15 °C obtiveram-se, em 63 dias, os mesmos valores, quando comparados aos queijos maturados a 10 °C por 100 dias. Portanto, estes queijos maturados a 15 °C podem ser comercializados 37 dias antes do prazo previsto pelo MAPA (1993), apresentando as mesmas características proteolíticas, sem perder na qualidade. Constatou-se que os queijos maturados a 15 °C podem ser comercializados até os 180 dias de maturação sem perdas na qualidade, bem como aqueles submetidos ao controle de temperatura B, que estiveram até os 60 dias a 10 °C e a partir desse momento até os 180 dias permaneceram a 15 °C, obtendo-se resultados semelhantes aos dos queijos mantidos em controle de temperatura E.

Apesar de o aumento da temperatura ter sido de apenas 5 °C, significativa influência ocorreu nas frações da caseína, proporcionando evidente degradação para a formação de peptídeos maiores, peptídeos menores e aminoácidos, ao longo dos períodos de maturação. Quando comparada a degradação da fração β -caseína com a das α_s -caseínas, as últimas sofreram maiores degradações, principalmente no controle de temperatura E, para todos os períodos de maturação, sendo mais pronunciada nos primeiros dias, o que revelou a influência do coalho e do aumento da temperatura ao longo da maturação.

A avaliação dos aminoácidos, realizada pela análise de fatores, tornou possível analisar um conjunto de aminoácidos através do comportamento do fator. Os aminoácidos que mais contribuíram durante a maturação foram ácido glutâmico, leucina, glicina e prolina. A maior quantidade individual de aminoácidos foi obtida no queijo mantido a 15 °C, no controle de temperatura E, seguido do controle de temperatura B, do controle de temperatura D e, por último dos controles de temperatura C e A.

Para as frações das caseínas e para as determinações de aminoácidos, concluiu-se que, quanto maior a temperatura de maturação, maior a aceleração da proteólise, podendo neste caso diminuir o período de maturação. Esses resultados sugerem que a ação do coalho teve maior influência, seguido pelas proteinases e exo e endopeptidases de *Lactococcus* e de *Lactobacillus*, presentes no queijo Zamorano DOP ao longo da maturação. As proteases nativas do leite contribuíram para a proteólise, mas, pelo que se percebeu, menos que as enzimas coagulantes e as enzimas dos microrganismos.

Quanto aos aspectos físico-químicos e químicos, concluiu-se que as diferenças em cloretos, umidade, atividade de água, pH e acidez titulável não influíram na qualidade do queijo ao final de 180 dias de maturação, quando submetidos aos diferentes controles de temperatura.

Este estudo foi importante para avaliar as variações de temperatura no controle da maturação do queijo, acelerando ou retardando o processo de proteólise, bem como intensificando o *flavor* do queijo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALONSO, M.L.; ÁLVAREZ, A.I.; ZAPICO, J. Rapid análisis of free aminoacids in infants foods. **Journal Liquid Chromatografic**, 17:4019-4030, 1994.
2. AMANTEA, G.F.; SHURA, B.J.; NAKAI, S. Culture effect on ripening characteristics and rheological behavior of Cheddar cheese. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, 21:229-234, 1986.
3. ANDREWS, A.T. Proteinases in normal bovine milk and theirs action on caseins. **Journal of Dairy Research**., 50:45, 1983.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 40.ed. Virginia, 1990. 1141p.
5. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Hydrogen-Ion activity (pH). In: HORWITZ, W. **Official methods of analysis**, 13th, (p. 213). Washington: AOAC. 1980.
6. ASTON, J.W.; GILES, J.E.; DURWARD, I.G.; DULLEY, J.R. Effect of elevated temperature on proteolysis and flavor development in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, 52:565-572, 1985.
7. ASTON, J.W; GRIEVE, P.A; DURWARD, I.G.; DULLEY, J.R. Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese subjected to accelerated ripening treatments. **The Australian Journal of Dairy Technology**, 38:59-65, 1983.
8. BASTIAN, E.D.; LO, C.G.; DAVID, K.M.M. Plasminogen activation in cheese milk: influence on Swiss cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, 80:245-251, 1997.
9. BLAKESLEY R.W.; BOEZY, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analysis Biochemistry**., 82:580-582, 1977.
10. CHAPMAN, K.W.; LAWLESS, H.T.; BOOR K.J. Quantitative Descriptive Analysis and Principal Component Analysis for Sensory Characterization of Ultrapasteurized Milk, **Journal Dairy Science**., 84:12-20, 2001.
11. CHOISY, C.; DESMAZEAUD, M.J.; GRIPON, J.C.; LAMBERET, G.; LENOIR, J.; TOURNEUR, C. Os fenômenos microbiológicos e enzimáticos e a bioquímica da cura (Afinação). In: ECK, A. **O queijo**. 1.ed., Vol.1, 1987. 337 p.
12. CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; SMACCHI, E.; DE ANGELIS, M.; ROSSI, J. Accelerated ripening of Pecorino Umbro cheese. **Journal of Dairy Research**, 65:631-642, 1998.
13. DUMAIS, R.; BLAIS J. A.; CONRAD, F. Queso. In: AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la Leche**, 1991, 547 p.
14. EL SODA, M. Control and enhancement of flavour in cheese. In: LAW, B. A. **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Blackie Academic & Professional, New York, p.219-246. 1997.
15. EL SODA, M. Accelerated maturation of cheese. **International Dairy Journal**, 3:531-544, 1993.
16. ENGELS, W.J.M.; VISSER, S. Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavour of different cheese types. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, 48:127-140, 1994.
17. ENRIGHT, E.; KELLY, A.L. The influence of heat treatment of milk on susceptibility of casein to proteolytic attack by plasmin. **Milchwisseuschaft**, 5:491-493,1999.

18. EXTERKATE, F.A.; ALTING, A.C.; SLANGEN, C.J. Conversion of α_{s1} -casein-(24-199)-fragment and β -casein under cheese conditions by chymosin and starter peptidases. **Systematic and applied Microbiology**, 18:7-12, 1995.
19. EXTERKATE, F.A., LAGERWERF, F.M., HAVERKAMP, J. Y VAN SCHALKWIJK, S. The selectivity of chymosin action on Conversion of α_{s1} - and β -caseins in solution is modulated in cheese. **International Dairy Journal**, 7: 47-54, 1997.
20. FANELON, M.A.; O'CONNOR, P.; GUINEE, T.P. The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in Cheddar cheese during ripening. **Journal Dairy Science**, 83:2173-2183, 2000.
21. FARKYE, N.Y.; KIELY, L.J.; ALLSHOUSE, R.D.; KINDSTEDT, P.S. Proteolysis in Mozzarella cheese during refrigerated storage. **Journal Dairy Science**, 74:1433, 1991.
22. FEDRICK, I.A.; DULLEY, J.R. The effect of elevated storage temperatures on the rheology of Cheddar cheese. **Journal Dairy Science**, 19:191, 1984.
23. FEDRICK, I.A.; ASTON, J.W.; DURWARD, L.G.; DULLEY, J.R. The effect of elevated ripening temperatures on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. **N.Z.J. Dairy Science Technology**, 18:253-260, 1983.
24. FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Accelerated ripening of ewe's milk cheeses. **Revista Espanhola de Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, 34:353-367, 1994.
25. FOLKERTSMA, B.; FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. **Int. Dairy J.**, 6:1117-1134, 1996.
26. FOX, P.F.; LAW, J.; McSWEENEY, P.L.H.; WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. Vol.1. New York, Chapman and hall, p.389-438, 1993.
27. FOX, P.F.; WALLACE, J.M.; MORGAN, S.; LYNCH, C.M.; NILAND, E.J.; TOBIN, J. Acceleration of cheese ripening. **Antoine Van Leeuwenhoek**, 70:271-297, 1996.
28. FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. Editora Globo S.A. 1.ed. São Paulo, 1991. 301p.
29. GAIASCHI, A.; BERETTA, B.; POIESI, C.; CONTI, A.; GIUFFRIDA, M.G.; GALLI, C.L.; RESTANI, P. Proteolysis of α_s -casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. **Journal Dairy Science**, 83:2733-2739, 2000.
30. GAYA, P.; MEDINA, M.; RODRIGUEZ-MARÍN, M.A.; NÚÑEZ, M. Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: the effect of elevated ripening temperatures. **Journal Dairy Science**, 73:26-32, 1990.
31. GONZÁLEZ-VIÑAS, M.A.; ESTEBAN, E.M.; CABEZAS, L. Physico-chemical and sensory properties of Spanish ewe milk cheeses, and consumer preferences. **Milchwissenschaft**, 54:326-329, 1999.
32. GRAPPIN, R.; RANK, T.C.; OLSON, N.F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. **Journal Dairy Science**, 68:531-540, 1985.
33. GRIPON, J.C.; DESMAZEAUD, M.J.; LE BARS, D.; BERGERE, J.I. Role of proteolytic enzymes of *Streptococcus lactis*, *Penicillium roqueforti*; *Penicillium caseicolum* during cheese ripening. **Journal Dairy Science**, 60:1532-1538, 1977.
34. GRUFFERTY, M.B.; FOX, P.F. Factors affecting the release of plasmin activity from casein micelles. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology** 23:153, 1988.
35. GUINEE, T.P.; FOX, P.F. Sal in cheese: physical and biochemical aspects. In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. Vol.1. New York, Chapman and Hall, Ch. 7, 1993.

36. HERTMANNI, P.; PICQUE, E.; THOMAS, D.Y.; LARRETA-GARDE, V. Modulation of protease specificity by a change in the enzyme microenvironment. **FEBS Letters**, 279:123-131, 1991.
37. IBÁÑEZ, F.C; TORRES, M.I.; ORDÓÑEZ, A.I.; BARCINA, Y. Changes in physicochemical properties and in content of nitrogen compounds with traditional smoking during the ripening of Idiazabal cheese. **Netherlands Milk Dairy Journal**, 49:167-175, 1995.
38. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION **FIL-IDF, 17A** Cheese. Determination of chloride content. Brussels: IDF: 1972.
39. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **FIL-IDF, 1D** – Determination of fat content. Brussels, 1996.
40. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **FIL-IDF, 20 B** – Milk. Total nitrogen content (Kjeldahl method). Brussels.1993. 3p.
41. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **FIL-IDF, 43** – Determination of the lactose content of cheese and processed cheese products. Brussels, 1967.
42. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **FIL-IDF, 4A** – Cheese and processed cheese. Brussels, 1982
43. IZCO, J.M.; TORRE, P.; BARCINA, Y. Maduración Acelerada de los Quesos: Revisión. **Revista alimentaria**, 135:135-144, 1999.
44. JOHNSON, R.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis** Englewood cliffs, N.J.: Prentice-hall, 1988. 607p.
45. KOSIKOSWSKI, F.V.; MISTRY, V.V. **Cheese and fermented milk foods** (Third ed). Connecticut: KOSIKOSWSKI, F.V (1997).
46. KRISTIANSEN, K.R.; DEDING, A.S.; JENSEN, D.F.; ARDÖ, Y.; QVIST, K. B. Influence of salt content on ripening of semi-hard round-eyed cheese of Danbo-type. **Milchwissenschaft**, 54:19-23, 1999.
47. LABORDA, M.A.; RUBIOLO, A.D. Proteolysis of Fynbo Cheese Salted with NaCl/KCl and Ripened at Two Temperatures. **Journal of Food Science**, 1(64):33-36, 1999.
48. LAW, B.A.; HOSKING, Z.D.; CHAPMAN, H.R. The effect of some manufacturing conditions on the development of flavour in Cheddar cheese. **Journal Society of dairy technology**, 32:87-90, 1979.
49. LAW, B.A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. V.1, e V.2, 2.ed. Chapman and Hall, London, United kingdom, 1993.
50. LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.K.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **Journal Dairy Science**, 70:1748-1760, 1987.
51. LAWRENCE, R.C.; GILLES, J. Cheddar cheese and related dry-salted cheese varieties, In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, Vol.2. New York, Chapman and Hall, p.1-39. 1993.
52. LENOIR, J. Note sur la composition en matières azotées des fromages afines de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. **Ann. Technology Agriculturé**, 12:51-57, 1963.
53. LINCHSTEIN, H.C.; OGINSKY, E.L. **Experimental microbial and physiology**. W.H. Freeman and company. San Francisco and London, 1965.

54. LÓPEZ-FANDIÑO, R.; RAMOS, M.; FERNÁNDEZ-GARCIA, E.; OLANO, A. Proteolytic activity of two commercial proteinase from *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* on ovine and bovine caseins. **Journal Dairy Research.**, 58:461-467, 1991.
55. LUQUET, F.M. O Leite: **Do Úbere a Fábrica de Laticínios**, Vol. 1. Publicações Europa-América, Ltda Portugal, 1985, 447p.
56. LYNCH, C.M.; MCSWEENEY, P.L.H.; FOX, P.F.; COGAN, T.M.; DRINAN, F.D. Contribution of starter lactococci to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. **Lait**, 77:441-459, 1997.
57. MAPA Orden de 6 de mayo de 1993 por la que se aprueba el reglamento de la denominación de origen "Queso Zamorano" y de su Consejo Regulador. **B.O.E. Nº 120 de 20 de mayo de 1993**, p. 15311-15316.
58. MACEDO, A.C.; COSTA, M.L.; MALCATA, F.X. Assessment of proteolysis and lipolysis in Serra cheese: effects of axial cheese location, ripening time and lactation season. **Lait** 76:363-370, 1996.
59. MADKOR, S.; FOX, P.F.; SHALABI, S.I.; METWALLI, Studies on the ripening of Stilton cheese: proteolysis. **Food Chemistry**, 25:13, 1987.
60. MCSWEENEY P.L.H.; FOX, P.F. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. **Lait**, 77: 41-76, 1997.
61. MCSWEENEY, P.L.H.; OLSON, N.F.; FOX, P.F.; HEALY, A.; HØJRUP, P. Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein. **Journal of Dairy Research**, 60:401-412, 1993.
62. MENDIA, C.; IBÁÑEZ, F.C.; TORRE, P.; BARCINA, Y. Influence of the Season on proteolysis and sensory characteristics of Idiazabal Cheese. **Journal Dairy Science.**, 83:1899-1904, 2000.
63. MILLÁN, R; ALCALÁ, M.; SANJUAN, E.; PENEDO, J.C.; CASTELO, M. Componentes físico-químicos y nitrogenados del queso Roncal. **Alimentación, Equipo y Tecnología**, julio/agosto, 61-64, 1992.
64. MISTRY, V.V.; KASPERSON, K. M. Influence of salt on quality of reduced fat Cheddar cheese. **Journal Dairy Science**, 81:1214-1221, 1998.
65. MOLINA, E.; RAMOS, M; ALONSO, L.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Contribution of Low molecular weight water soluble compounds to the taste of cheese made of cow's, ewe's and goat's milk. **International Dairy Journal**, 9:613-621, 1999.
66. MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. Proteolysis of α_{s1} -casein by chymosin: influence of pH and urea. **Journal of Dairy Research**, 44:533-540, 1977.
67. MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. Proteolysis of bovine β -casein by chymosin: influence of pH, urea and sodium chloride. **Irish Journal of Food Science and Technology**, 2:135-139, 1978.
68. MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. Proteolysis of α_{s1} -casein by chymosin in diluted NaCl solutions and in Cheddar cheese. **Food Science Technology**, 4:13-23.1980.
69. NÚÑEZ, M.; GARCÍA-ASER, C.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M.A., MEDINA, M.; GAYA, P. The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipólisis in manchego cheese. **Food Chemistry**, 21:115-123, 1986.
70. NÚÑEZ, M.; GUILLÉN, A.M.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M.A.; MARCILLA, A.M.; GAYA, P.; MEDINA, M. Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: the effect of neutral proteinases. **Journal Dairy Science**, 74:4108-4118, 1991.

71. ORDÓÑEZ, A.I.; IBÁÑEZ, F.C.; TORRE, P.; BARCINA, Y. Characterization of the casein hydrolysis of Idiazábal cheese manufactured from ovine milk. **Journal Dairy Science**, 81: 2089-2095, 1998.
72. ORDÓÑEZ, J.A. Microbiología y bioquímica Del queso tipo "Ulloa" y preparación de un fermento para su elaboración a partir de leche pasteurizada. **Tesis Doctoral**. Ed. Facultad de Veterinaria, León. 1974.
73. ORTIGOSA, P.; TORRE, P.; IZCO, J.M. Effect of Pasteurization of Ewe's Milk and Use of a Native Starter Culture on the Volatile Components and Sensory Characteristics of Roncal cheese. **Journal Dairy Science**, 84:1320-1330, 2001.
74. PIREDDA, G.; PIRISI, A.; SCINTU, M.F.; ADDIS, M.; LEDDA, A.; CHIANESE, L. Fiore Sardo: hard uncooked ewe's milk cheese. Proceedings of International Symposium on basis of the quality of typical Mediterranean animal products. **EAAP Publication**, 90:170-173. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Pers. 1998.
75. POMAR, E.; PRIETO, B.; FRANCO, I.; TORNADIJO, M.E.; FRESNO, J.M.; GONZÁLEZ, J. Caracterización química y físico-química del queso Zamorano con Denominación de Origen. **Anais do Congresso**, Porto, Portugal, maio de 2001a.
76. POMAR, E.; PABLOS, A.; TORNADIJO, M.E.; FRESNO, J.M.; GONZÁLEZ, J. Estudio da proteólise do Queso Zamorano (D.O.P.) **Anais do Congresso**, Porto, Portugal, maio de 2001b.
77. POVEDA, J.M.; CABEZAS, L.; GARCÍA, A. Changes in physico-chemical properties and proteolysis in Manchego cheese preserved in olive oil. **Milchwissenschaft**, 54:252-255, 1999.
78. PRASAD, N.; ALVAREZ, V.B. Effect of salt and chymosin on the physico-chemical properties of Feta cheese during ripening. **Journal Dairy Science**, 82:1061-1067, 1999.
79. PRIETO, B.G. Estudio bioquímico del proceso maturativo del queso de vaca de león (oseja de sajambre). **Tesis Doctoral**. Ed. Facultad de Veterinaria, León. 1999.
80. RESSURECIÓN, A.V.A. Applications of multivariate analysis methods in food quality evaluation. **Food Technology**, Nov., 1988.
81. RIBEIRO JÚNIOR, J.I. **Análise estatísticas no SAEG**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2001, 301p.
82. ROMÁN-BLANCO, C.; SANTOS-BUELGA, J.; MORENO-GARCÍA, B.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L. Composition and microbiology of Castellano cheese (Spanish hard cheese variety made from ewe's milk). **Milchwissenschaft**, 54:255-257, 1999.
83. ROSENBERG, M.; ALTEMUELLER, A. Accumulation of free L- Glutamic Acid in full- and reduced-fat Cheddar cheese ripened at different time/temperature conditions. **Lebensm.-Wiss u-Technol.**, 34:279-287, 2001.
84. SERRANO, C.E.; GARCÍA, C.; MEDINA, L.M.; SERRANO, E. Physicochemical study of Manchego cheese with denomination of origin. **Revista Alimentaria**, 281:81-82, 1997.
85. SHAKEEL-UR, R.; BANKS, J.M.; BRECHANY, E.; MUIR, D.D.; MCSWEENEY, P.L.H.; FOX, P.F. Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. **International Dairy Journal**, 10:55-65, 2000.
86. SOUSA, M.J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, 11:327-345, 2001.
87. URBACH, G. Relations between cheese flavour and chemical composition. **International Dairy Journal**, 3:389-422, 1993.

88. VAFOPOULOU, A.; ALICHANIDIS, E.; ZERFIRIDIS, G. Accelerated ripening of Feta cheese, with heat-shocked cultures or microbial proteinases. **Journal Dairy Research**, 56:285-296, 1989.
89. VAKALERIS, D.G.; PRICE, W.V. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. **Journal Dairy Science**, 42:264, 1959.
90. VICENTE, M.S.; IBÁÑEZ, F.C.; BARCINA, Y.; BARRON, L.J.R. Changes in the free amino acid content during ripening of Idiazabal cheese: influence of starter and rennet type. **Food Chemistry**. 72:309-317, 2000.
91. VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. **Journal Dairy Science**, 76:329-350, 1993.
92. WERKEMA, M.C.C. **Ferramentas estatísticas básicas para o gerenciamento de processos**. Belo Horizonte, Fundação Christiano Ottoni, UFMG, 1995, 404p.
93. WILKINSON, M.G. Acceleration of cheese ripening In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, Vol.1. New York, Chapman and hall, p.523-555, 1993.
94. WILKINSON, M.G.; GUINEE, T.P.; O'CALLAGHAN, D.M.; FOX, P.F. Effects of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. **Lait**, 72:449-459, 1992.
95. WOLFSCHOON-POMBO, A.F.W.; LIMA, A de. Extensão e profundidade de proteólise em queijos Minas Frescal, **Revista Instituto de Laticínios Candido Tostes**, 44:261-266, 1989.
96. YAZICI, F.; DERVISOGLU, M. Effect of pH adjustment on some chemical, biochemical, and sensory properties of Civil cheese during storage. **Journal of Food Engineerin**, xxx, article in press, 8 p., 30 may de 2002.

CAPÍTULO 3

CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DO QUEIJO ZAMORANO DOP COM MODIFICAÇÕES NA TEMPERATURA DE MATURAÇÃO

RESUMO

O queijo Zamorano é um dos 12 queijos com Denominação de Origem Protegida (DOP) fabricados na Espanha, inscrito no Conselho da DOP desde 1993. Este queijo é elaborado a partir de leite de ovelha das raças Churra e Castellana, apresentando massa dura e compacta. De acordo com as normas do Ministério de Alimentação, Pesca e Agricultura (MAPA), ele necessita de um período mínimo de comercialização de 100 dias. Neste trabalho, avaliaram-se sete parâmetros de textura (dureza, fraturabilidade, elasticidade, adesividade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade) do queijo Zamorano submetido a diferentes temperaturas de maturação ao longo dos períodos de 7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias, visando uma aceleração desta e, conseqüentemente, uma redução no tempo mínimo de comercialização. Os controles de temperatura A, B, C, D e E observados seguiram o seguinte protocolo: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias. Para verificar a influência dessas condições de maturação na textura do queijo, foram utilizados os métodos da Análise do Perfil da Textura (TPA), em um texturômetro Texture-Analyser-TA-XT2. Com o decorrer da maturação observou-se aumento ($P < 0,01$) da dureza e diminuição ($P < 0,05$) da elasticidade do queijo. A fraturabilidade foi maior no início da maturação. A adesividade apresentou valores negativos, em função da força utilizada para vencer as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície do elemento de prova. A coesividade, juntamente com a elasticidade, relacionaram-se com a degradação das moléculas das caseínas durante a maturação.

A mastigabilidade e adesividade foram diretamente relacionadas aos valores da dureza, elasticidade e coesividade obtidos na TPA. Comparando os controles de temperatura, foi observado que não ocorreram diferenças ($P>0,05$) entre eles, concluindo-se que as alterações reológicas ocorridas no queijo foram ocasionadas pelo processo de proteólise e não pela elevação da temperatura. Os parâmetros de textura obtidos com a TPA correlacionaram-se positiva e significativamente com aqueles obtidos através da análise sensorial quantitativa (ADQ).

1. INTRODUÇÃO

A reologia é uma ciência que trata do estudo da deformação e do fluxo da matéria (GIESE, 1995; PRENTICE et al., 1993; BOURNE, 1978). A deformação é aplicada aos materiais sólidos, podendo ser utilizada nos queijos duros e semiduros, como importante método no controle da textura, principalmente no processo de fabricação e nas estruturas física e química do corpo do queijo durante a estocagem (CAMPOS, 1989). A reologia também é uma propriedade fundamental na qualidade do produto final (BOURNE, 1978).

A textura sempre foi observada ao tocar os alimentos ou ao mastigá-los, sendo uma propriedade relacionada à deformação, à desintegração e ao fluxo de um alimento sob a aplicação de uma força (GIESE, 1995; BARRETT et al., 1998), medida em função da massa, tempo e distância (BARRETT et al., 1998). Segundo definição de SZCZESNIAK (1963), a textura é uma propriedade dos alimentos que se refere às características mecânicas, geométricas e mastigatórias.

A textura é um dos parâmetros sensoriais que pode ser analisado tanto subjetiva como objetivamente. Existem métodos instrumentais imitativos do processo de mastigação, cujos resultados, obtidos por meio de gráficos, informam o comportamento dos parâmetros de textura nos alimentos (FRAU et al., 2000).

Um dos métodos mais usados para analisar a textura dos alimentos é o do perfil da textura ou “Texture Profile Analyser” (TPA), em que podem ser observados os parâmetros de dureza, fraturabilidade, elasticidade, coesividade, adesividade, mastigabilidade e gomosidade (BOURNE, 1978; SZCZESNIAK, 1983; CAMPOS, 1989; TUNICK e NOLAN, 1992; GIESE, 1995).

A análise de textura através do TPA utiliza três tipos de pressão: compressão aplicada perpendicularmente contra a superfície do material, tensão ou estiramento do material e cisalhamento aplicado de forma tangencial ao material (SZCZESNIAK, 1983; GIESE, 1995).

A deformação ocorre em função do tamanho ou da espessura do corpo, em resposta a uma força aplicada. É um parâmetro adimensional e relacionado à espessura ou ao tamanho original (SZCZESNIAK, 1983; GIESE, 1995), indicando que a amostra do queijo a ser analisada deve ser a mais representativa e

uniforme possível (VAN VLIET e PELEG, 1991). Ao preparar as amostras, devem ser evitadas as zonas dos queijos com presença de olhos e fissuras (VISSER, 1991) e levar em consideração que a zona superficial é mais dura e menos elástica que a zona do interior, sendo, portanto, influenciada pela quantidade de umidade e concentração de sal (FURTADO, 1990).

Muitas são as condições que influenciam a textura dos alimentos. Nos queijos, este estudo é de grande interesse e depende muito do tipo de queijo, das características de processamento e das grandes transformações bioquímicas que ocorrem durante a maturação (PRENTICE et al., 1993; VISSER, 1993).

As grandes transformações que ocorrem durante a degradação das proteínas têm muita influência sobre o sabor e a consistência do queijo. Na realidade, as proteínas são os únicos componentes sólidos que, ao se tornarem solúveis, diminuem a consistência e a elasticidade do queijo (DUMAIS, 1991). A textura, a aparência e o *flavor* são os parâmetros sensoriais que mais influenciam a aceitabilidade dos alimentos (BOURNE, 1978).

Vários são os fatores que influenciam a textura do queijo, e um dos mais importantes é o tipo de coalho utilizado. No caso, queijos elaborados com coalhos vegetais (FERNANDEZ DEL POZO, 1988) e microbianos são mais proteolisados que queijos elaborados com coalhos de origem animal. As lipases e proteases interferem na maturação, fazendo com que os queijos mais proteolisados se apresentem com menor dureza, menos friáveis e com maior adesividade (FRAU et al., 2000).

As propriedades de textura de uma mesma variedade de queijo podem diferenciar-se consideravelmente em função de sua composição e do grau de maturação (WALSTRA e VAN VLIET, 1982; GRIPON, 1997; PRENTICE et al. 1993). As mudanças que ocorrem durante a maturação do queijo estão relacionadas a pH, umidade, sal e proteólise (MARINO et al., 1997).

Estudos têm sido conduzidos no sentido de acelerar a maturação do queijo por vários processos (FEDRICK e DULLEY, 1984; ASTON et al., 1985; EL SODA, 1993, 1997; FOLKERTSMA et al., 1996), entre eles o aumento de temperatura de estocagem, em que se observa modificação na proteólise e,

conseqüentemente, na textura do queijo (NÚÑEZ et al., 1991; FEDRICK e DULLEY, 1984; ASTON et al., 1985; GAYA et al., 1990).

Em geral, o incremento de temperatura influencia os aspectos reológicos do queijo. Estudos realizados por NÚÑEZ et al. (1991), com adição de proteínas ao leite de ovelha pasteurizado para elaboração de queijo Manchego e com aumento na temperatura de maturação, mostraram grandes diferenças nos parâmetros texturais de fraturabilidade, dureza e elasticidade, principalmente durante a maturação. Outros trabalhos – FEDRICK e DULLEY (1984), GAYA et al. (1990) e ASTON et al. (1985) – reportaram efeito significativo da temperatura de maturação com relação à textura do queijo, com temperaturas de estocagem entre 12 e 20 °C.

O queijo Zamorano DOP é um queijo duro, elaborado com leite de ovelha das raças Churra e Castellana, com processo de fabricação e comercialização bem definido pelo MAPA (1993). Apresenta tempo mínimo de maturação para comercialização de 100 dias, submetido à câmara de maturação a 10 °C. O objetivo do presente trabalho foi estudar o comportamento das propriedades reológicas deste tipo de queijo, no que se refere à textura, quando submetido a cinco diferentes controles de temperatura, nos períodos de 7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias de maturação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo das amostras

As amostras para análises foram obtidas do queijo Zamorano DOP, a partir de 7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias de maturação, conforme mostra o diagrama da Figura 1, nos diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E).

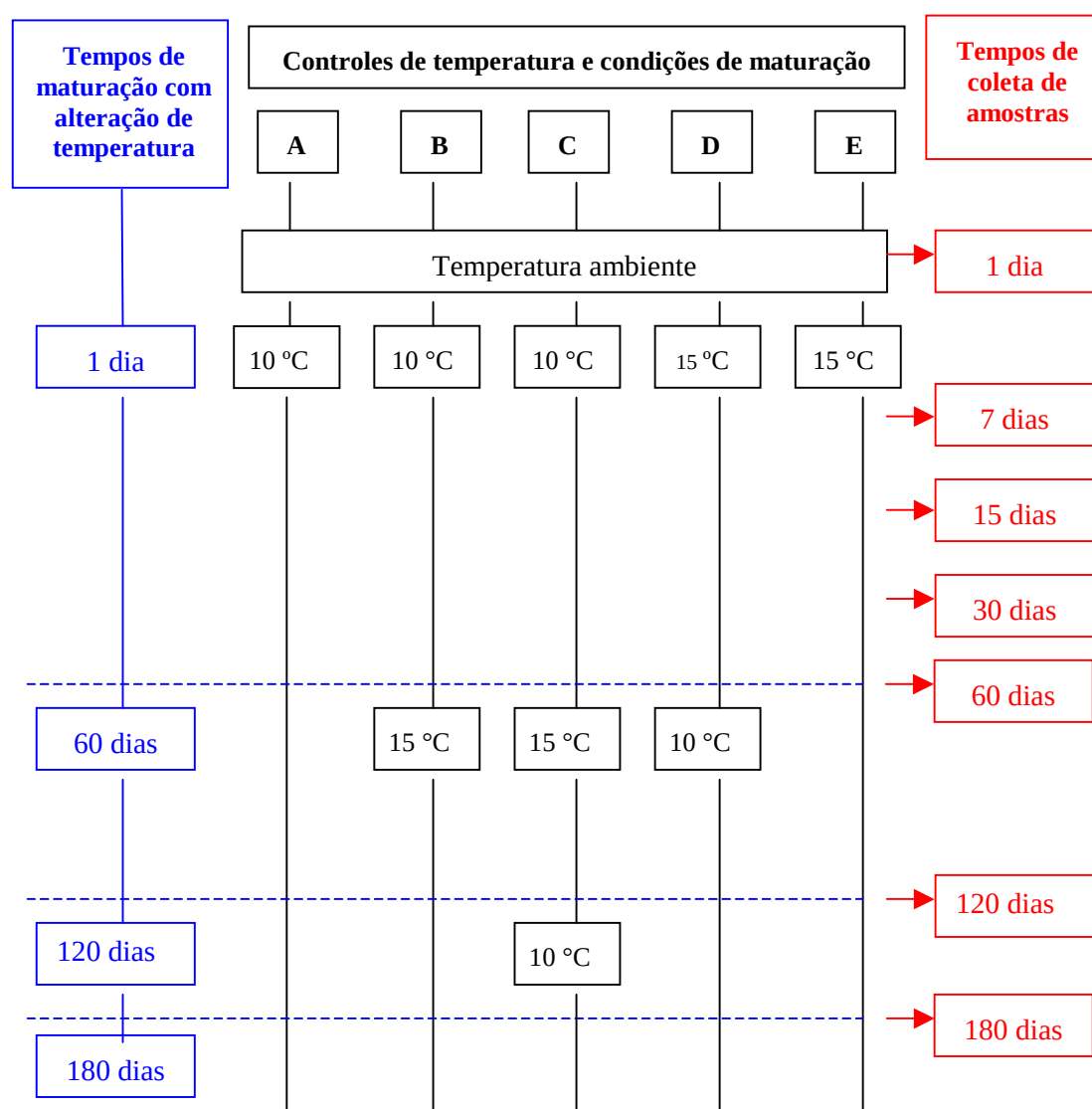


Figura 1 – Diagrama das condições experimentais de maturação do queijo Zamorano DOP.

Para o estudo, foram retiradas do queijo porções aleatórias, representativas e uniformes, na extensão da massa (VAN VLIET e PELEG, 1991). Com o auxílio de uma sonda cilíndrica (broca arrolhadora), realizaram-se perfurações perpendiculares na matriz do queijo. Em cada queijo ocorreram três perfurações, as quais foram colocadas em bolsas plásticas devidamente identificadas pelos controles de temperatura utilizados (A, B, C, D e E), seladas e levadas ao Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade de León (Espanha), onde se procederam às análises.

As amostras cilíndricas foram preparadas de forma padronizada à temperatura de 20 °C, de acordo com a sua identificação, de maneira que todas tivessem 17 mm de altura por 20 mm de largura.

2.2. Equipamento para a determinação reológica

O equipamento mais utilizado para as determinações reológicas envolvendo as propriedades de textura é o instrumento *Universal Texture Analyser* TA-XT2. Este equipamento, através do método da Análise do Perfil de Textura (TPA), simula o comportamento do alimento na boca e, por isso, possui excelente correlação com as medidas sensoriais (FRAU et al., 2000).

A simulação é obtida através de gráficos que mostram as curvas força-tempo ou força-distância, indispensáveis para a obtenção dos dados dos parâmetros da textura. As análises destas curvas conduzem à obtenção de sete parâmetros texturais. Estes gráficos são construídos através de *softwares* específicos do aparelho, que fazem a integração das curvas e proporcionam a interpretação dos resultados (Texture Technologies Corp., 1992).

No método TPA, o parâmetro variável é a força, enquanto a velocidade e a distância permanecem constantes. Este instrumento fornece medidas de compressão, tanto de distância como de força, variáveis em função do modelo.

Este mesmo instrumento apresenta cinco elementos que são fundamentais para o funcionamento do aparelho: mecanismo de condução do sensor, que pode variar desde um simples peso até um sofisticado condutor elétrico

variável motorizado ou hidráulico; elemento de prova (lâmina de corte, sonda, entre outros), que entra em contato com o alimento; força aplicada tanto vertical como horizontalmente ou tangencialmente, que corta, perfura, pontua, comprime, tritura, cisalha ou tensiona a amostra; elemento sensitivo; e *display*, que mostra os resultados das medidas (SZCZESNIAK, 1983). A Figura 2 ilustra o modelo de um Texture- Analyser- TA-XT2 utilizado neste experimento.



Figura 2 – Texturômetro TA-XT2 (*Texture Profile Analysis*) computadorizado.

2.3. Determinação dos parâmetros reológicos

Os parâmetros reológicos da textura foram analisados de acordo com as curvas obtidas no aparelho TPA, conforme as definições e a metodologia estabelecida por SZCZESNIAK (1963) e modificada por BOURNE (1978). Utilizou-se uma sonda P7 com um platô de compressão de 75 mm de diâmetro, e as amostras apresentaram 17 mm de altura e 20 mm de largura à temperatura de 20 °C. A distância estabelecida foi de 80%, com velocidade do pré-teste de 5,0 mm/s, velocidade do teste de 0,5 mm/s e velocidade do pós-teste de 10,0 mm/s, em um tempo de 5 s, PPS igual a 200 e “Trigger” de 0,97 Newtons.

Todos os itens citados anteriormente foram utilizados no projeto para determinação dos parâmetros.

A determinação da textura se baseia na força aplicada sobre o corpo, causando uma deformação, por unidade de tempo ou pela distância, realizando-se assim um trabalho. O resultado pode ser expresso em unidade de força (N), trabalho (joules) ou massa (g). Neste trabalho o resultado foi expresso em gramas (g).

A força foi aplicada fazendo-se uma compressão, através de uma chapa de compressão (sonda) de alumínio de 75 mm, perpendicularmente contra a superfície do material. Os dados foram processados por um computador, através do programa Microsoft WindowsTM.

Nas amostras de queijos foram determinados sete parâmetros: fraturabilidade, dureza, adesividade, elasticidade, coesividade, mastigabilidade e gomosidade, conforme indicado na Figura 3 e nas definições (BOURNE, 1978; VAN VLIET, 1991; RAPACCI et al., 1998) a seguir:

- A dureza é a força máxima necessária para se obter uma deformação e está representada no gráfico por H_2 , correspondendo ao segundo pico dentro da primeira área (A_1).

- A fraturabilidade representa o primeiro pico na curva e está representada no gráfico como H_1 . A primeira força aplicada é suficiente para fragmentar o produto. Quanto menor o seu valor, maior é a sua fraturabilidade.

- A adesividade é definida como o trabalho (força/distância ou força/tempo) requerido para superar a força de atração entre a superfície do queijo e a superfície de compressão da chapa representada pela área 3 (A_3), apresentando sempre valor negativo.

- A coesividade é definida como a razão da área da segunda compressão (área 2) pela área da primeira compressão (área 1), sendo, portanto, A_2/A_1 .

- A elasticidade é definida como a propriedade da textura manifestada por uma tendência a recuperar uma grande deformação após ter sido removida a força de deformação, correspondendo ao comprimento 2/comprimento 1.

- A gomosidade é obtida pelo produto entre a dureza e a coesividade, sendo, portanto, igual à dureza x (A_2/A_1).

- A mastigação é obtida pelo produto entre a gomosidade e a elasticidade, sendo, por conseguinte, igual à dureza x (A_2/A_1) x elasticidade.

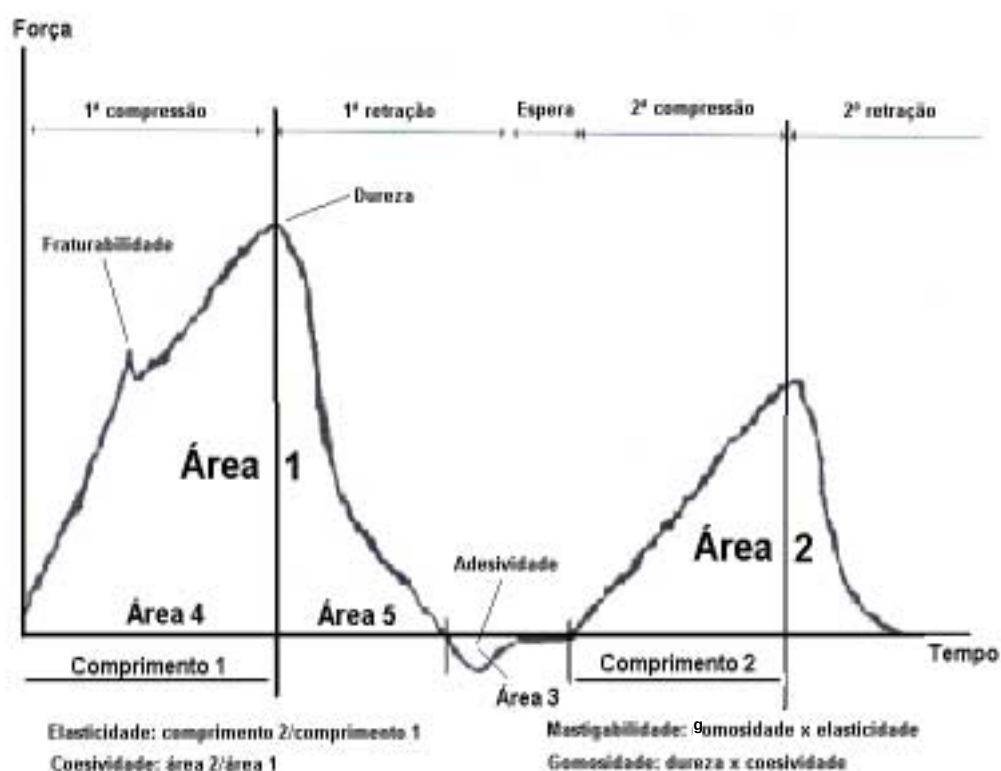


Figura 3 – Gráfico do perfil de textura (TPA) para sete parâmetros.

2.4. Análise estatística

O delineamento aplicado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, de acordo com o esquema em parcelas subdivididas, sendo o fator controle de temperatura com cinco níveis (A, B, C, D e E) casualizados nas parcelas e o fator períodos de maturação com seis níveis (7, 15, 30, 60, 120 e 180 dias) casualizados nas subparcelas.

A análise de variância foi realizada com posterior aplicação do teste de Tukey para comparar as médias dos controles de temperatura dentro de cada um

dos seis períodos de maturação a 5% de probabilidade; a análise de regressão foi feita em função dos seis períodos de maturação dentro de cada um dos cinco controles de temperatura a 5 ou 1% de probabilidade. Com base nas médias dos tratamentos, para cada um dos cinco controles de temperatura foram calculadas as correlações entre as características de textura obtidas no aparelho texturômetro (TA-TX2 - *Texture Profile Analysis*) e as características de textura obtidas pela análise sensorial e, ainda, as correlações dos parâmetros da textura com pH, Aw, relação sal/umidade e umidade, a 5 ou 1% de probabilidade pelo teste t.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Avaliação do perfil da textura

Os gráficos dos perfis da textura fornecidos pelo texturômetro TA-TX2 para os 120 dias de maturação do queijo Zamorano DOP, para todos os controles de temperatura, estão representados na Figura 4. Analisando estes gráficos, observa-se que os comportamentos das curvas apresentadas para todas as amostras, aos 120 dias de maturação, são bastante similares entre si. Isso indica que os diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E), para o mesmo período de maturação, não apresentaram grandes diferenças, o que não afetou a textura do queijo nas características reológicas durante a modificação da temperatura de maturação em 5 °C.

3.2. Mudanças reológicas dos parâmetros relacionados ao perfil da textura (TPA)

Equações de regressões lineares foram estabelecidas para os diferentes controles de temperatura em relação aos períodos de maturação, para todos os parâmetros de textura, e estão representadas nas Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

Os valores obtidos nos perfis da textura através da curva força-tempo estão apresentados no Quadro 1. No parâmetro dureza, obtido na primeira curva de compressão, que representa a força máxima de compressão na primeira penetração (RAPACCI et al., 1998), observa-se que ocorreram pequenas diferenças ($P < 0,05$), não havendo boa discriminação para os controles de temperatura, diferindo dos valores encontrados por GAYA et al. (1990) para o queijo Manchego, quando aplicaram aceleração de maturação com diferentes aumentos de temperaturas. Portanto, pode-se concluir que um aumento de 5 °C não foi suficiente para indicar diferença acentuada na dureza dos queijos. No entanto, constatou-se que ao longo dos períodos de maturação ocorreu aumento ($P < 0,01$) da dureza do queijo para todos os controles de temperatura (Figura 5). Os valores duplicaram aos 120 dias de maturação, comparado aos

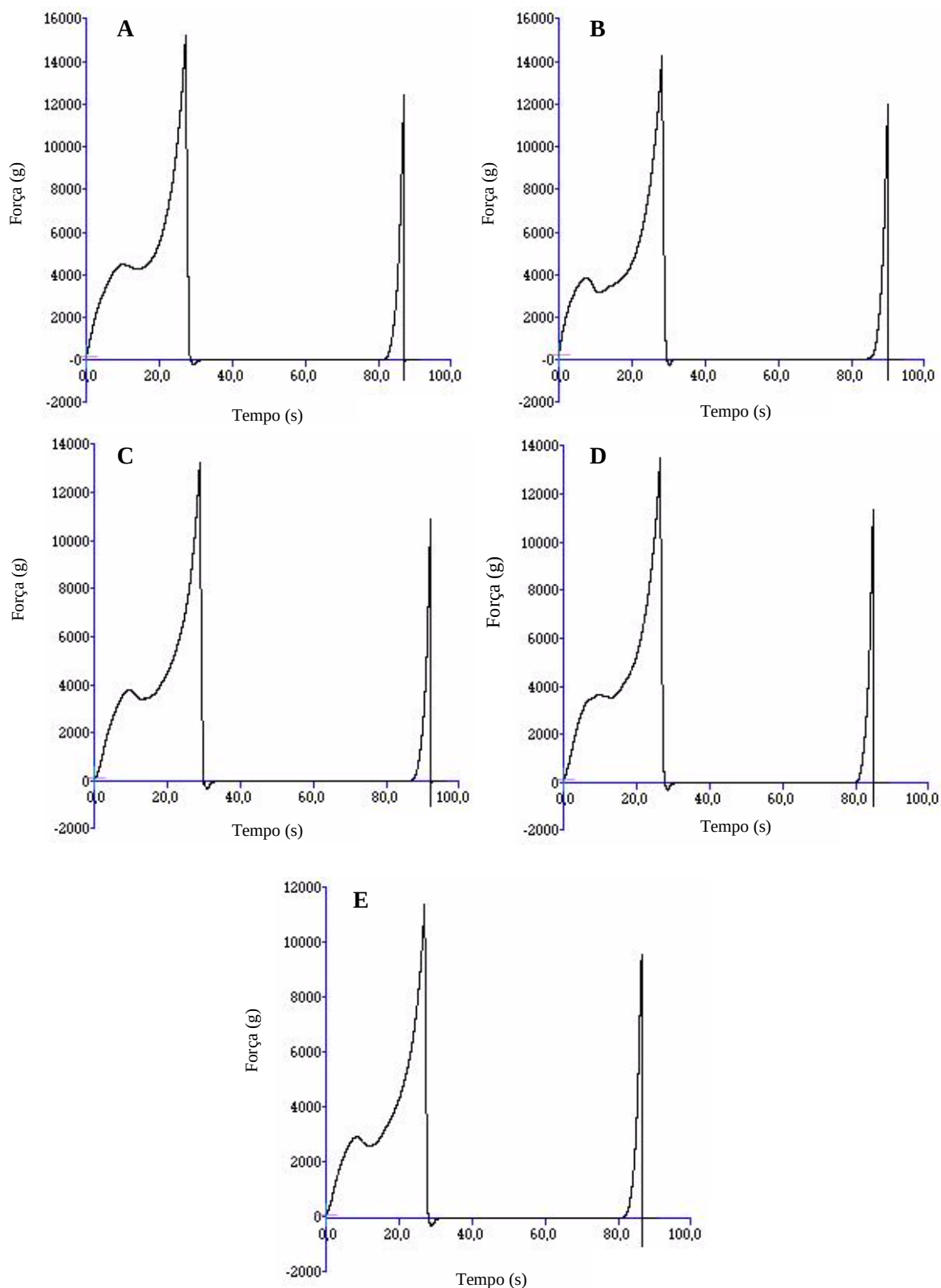


Figura 4 – Perfis de textura do queijo Zamorano DOP aos 120 dias de maturação, nos diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 1 – Médias dos parâmetros de textura, dureza, fraturabilidade, adesividade, elasticidade e coesividade, obtidos na curva do perfil da textura, para os diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E)

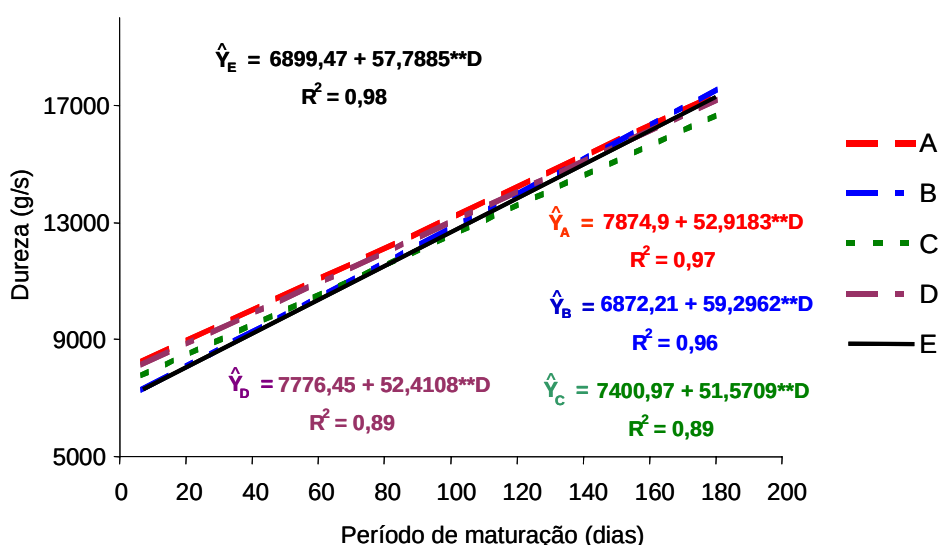
Controles de temperatura ¹	Período de maturação (dias)					
	7	15	30	60	120	180
DUREZA						
A	7318,36 a	8973,55 a	9709,79 a	11329,4 ab	14882,31 a	16838,33 a
B	6210,64 a	7291,87 b	9554,87 a	11290,4 ab	14403,59 a	16911,86 a
C	6025,51 a	7884,30 ab	9803,56 a	11851,8 a	14542,67 a	15545,24 a
D	6729,31 a	7780,49 ab	10256,66 a	12458,0 a	14950,16 a	16077,34 a
E	6898,37 a	7571,13 ab	9332,70 a	10014,7 b	14495,53 a	16893,23 a
FRATURABILIDADE						
A	2766,17 a	2993,94 ab	3255,85 a	3506,31 a	3905,92 a	4700,72 a
B	2060,42 b	2418,38 b	2903,96 ab	3109,92 ab	3915,16 a	4264,84 a
C	2050,00 b	3234,81 a	2444,37 b	2532,22 b	3704,41 a	4076,67 a
D	2229,97 ab	2387,59 b	2645,77 ab	3272,62 a	4071,36 a	4307,30 a
E	2188,52 ab	2374,80 b	2940,36 ab	3111,82 ab	3909,26 a	4370,28 a
ADESIVIDADE						
A	-109,46 a	-127,83 a	-248,08 ab	-449,05 ab	-654,37 a	-659,74 ab
B	-102,36 a	-106,99 a	-206,38 a	-365,20 a	-592,83 a	-566,50 a
C	-67,96 a	-93,14 a	-270,46 ab	-386,68 ab	-596,12 a	-686,59 ab
D	-85,45 a	-129,74 a	-340,98 ab	-507,74 ab	-530,40 a	-613,40 ab
E	-69,21 a	-250,92 a	-404,97 b	-546,73 b	-651,79 a	-760,18 b
ELASTICIDADE						
A	0,57 b	0,47 b	0,46 a	0,44 a	0,42 ab	0,40 ab
B	0,71 a	0,61 a	0,44 a	0,39 a	0,37 b	0,31 b
C	0,56 b	0,46 b	0,45 a	0,40 a	0,39 ab	0,35 b
D	0,44 c	0,44 b	0,45 a	0,50 a	0,49 a	0,49 a
E	0,50 bc	0,46 b	0,41 a	0,47 a	0,39 ab	0,42 ab
COESIVIDADE						
A	0,20 bc	0,19 ab	0,18 a	0,17 a	0,13 a	0,13 a
B	0,22 ab	0,19 ab	0,17 a	0,14 ab	0,12 a	0,13 a
C	0,23 a	0,21 a	0,17 a	0,15 ab	0,13 a	0,13 a
D	0,19 c	0,18 b	0,14 b	0,13 c	0,13 a	0,13 a
E	0,18 c	0,17 b	0,14 b	0,14 ab	0,12 a	0,13 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

¹ A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

7 dias para todos os controles de temperatura. Vários autores têm relatado que o conteúdo de umidade e, conseqüentemente, o aumento do extrato seco e a penetração do sal na matriz do queijo estão relacionados com a dureza do queijo (CREAMER e OLSON, 1982; AMANTEA et al., 1986).

Para o parâmetro dureza (Figura 5) no decorrer dos períodos de maturação, houve aumento ($P < 0,01$) em função destes períodos, para todos os controles de temperatura, influenciado principalmente pela perda de umidade. Por ser um queijo duro, ele apresenta teor de umidade reduzido por causa da concentração de sal na umidade do queijo e pela temperatura de maturação. O aumento de temperatura de maturação não afetou as características reológicas do queijo Manchego (NÚÑEZ et al., 1991) quando as temperaturas de maturação foram inferiores a 4 °C. Portanto, o período de maturação foi o fator que mais influenciou a dureza do queijo.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figuras 5 – Estimativas do parâmetro de dureza, obtidas através das curvas da TPA para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

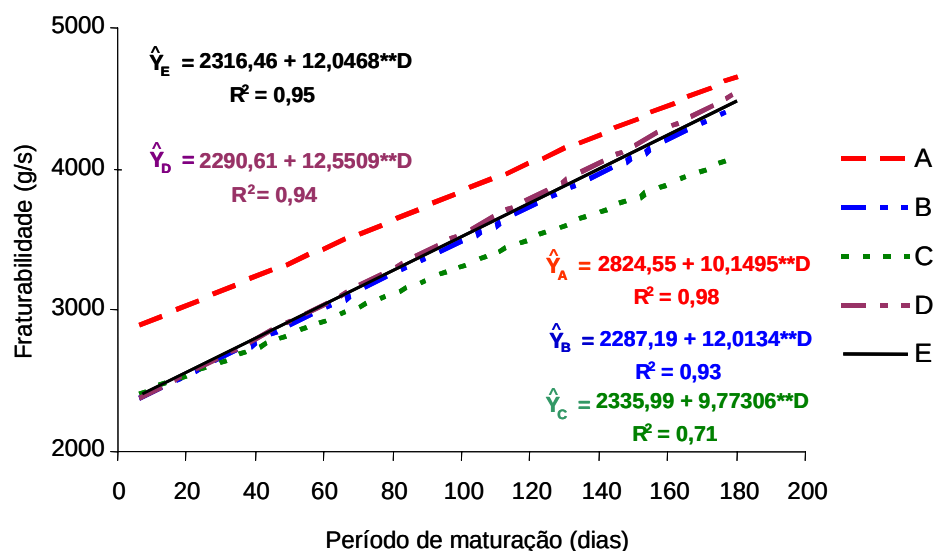
O parâmetro fraturabilidade obtido no primeiro pico da curva indica que a primeira força aplicada é suficiente para fragmentar, sendo a primeira fissura que ocorre no queijo quando submetido a uma força (RAPACCI et al., 1998; GEISE, 1995). A fraturabilidade é o trabalho necessário para fragmentar a amostra, e, quanto menor o valor, mais fraturável é o queijo (FEDRICK e DULLEY, 1984). Conforme se observa na Figura 6, os queijos no início da maturação foram mais fraturáveis, pois possuíam menor dureza. Com o decorrer da maturação, foi necessário maior força para fraturar os queijos dos diferentes controles de temperatura, que apresentaram maior dureza, relacionando-se inversamente proporcional com a atividade de água, umidade e pH e diretamente proporcional com a concentração de sal na umidade.

Os parâmetros físico-químicos – Aw, pH, umidade, concentração de sal na umidade – e a proteólise contribuem para maior fraturabilidade do queijo durante a maturação (CREAMER e OLSON, 1982; LAWRENCE et al., 1987; FERNANDEZ DEL POZO, 1988; GAYA et al., 1990; MISTRY e KASPERSON, 1998; BUFFA et al., 2001). A proteólise é um dos fatores que mais influenciam a textura do queijo, juntamente com as propriedades físico-químicas (pH, umidade e relação sal/umidade). A proteólise tem um papel importante no *flavor* e na textura na maioria das variedades de queijos elaborados por fermentação enzimática (FANELON et al., 2000). A proteólise afeta a caseína intacta, a qual é a maior determinante das propriedades de dureza e fraturabilidade no queijo (CREAMER e OLSON, 1982; PRENTICE et al., 1993). Os valores para NS em pH 4,6 e NS em TCA 12%, que indicam o índice de proteólise do queijo, foram maiores ao longo da maturação (180 dias) sob controle de temperatura E durante toda a maturação, o que levou a um queijo com maior dureza e menor fraturabilidade, conforme mostram os valores para os controles de temperatura A, (4700,72 g/s) e E (4370,28 g/s) (Quadro 1). No entanto, as diferenças dos valores entre os controles de temperatura foram pequenas ($P < 0,05$) em alguns períodos de maturação e semelhantes ($P > 0,05$) em outros, diferindo dos valores encontrados por GAYA et al. (1990) e FEDRICK e DULLEY (1984), mas em concordância com NÚÑEZ et al. (1991). Desse modo, pode-se concluir que os diferentes controles de temperatura afetaram pouco os valores da fraturabilidade.

A fraturabilidade apresentada na Figura 6 teve aumento ($P<0,01$) de valores em g/s ao longo da maturação para todos os controles de temperatura, indicando a necessidade de maior compressão para quebrar o queijo, que se torna mais duro durante a maturação. Segundo FRAU et al. (2000), as propriedades texturais de uma mesma variedade de queijo podem diferir consideravelmente, em função de sua composição química e do seu grau de maturação. A porcentagem de sal no queijo é importante não só para o desenvolvimento do *flavor*, mas também para a textura, influenciando diretamente a proteólise do queijo (MISTRY e KASPERSON, 1998). Os valores de dureza e fraturabilidade aumentam com o aumento do conteúdo de sal. À medida que se aumenta a dureza, diminui-se a elasticidade, que é mais influenciada em relação à degradação das proteínas no queijo. A diferença entre a dureza e a fraturabilidade está baseada no fato de que a dureza é a força máxima de compressão e a fraturabilidade é a força que requer para romper a estrutura do queijo sob o primeiro impacto da força (O'HARE, 1990).

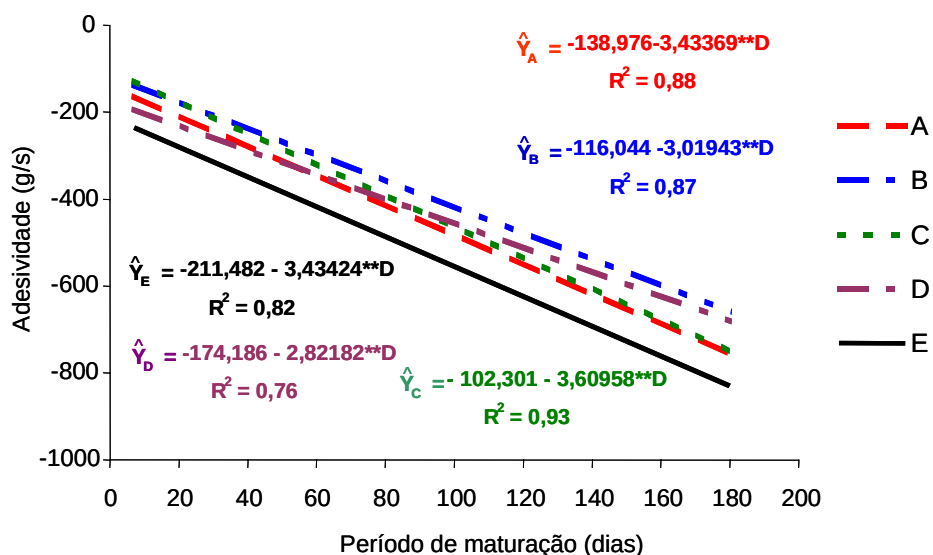
A característica de adesividade, expressa em valores negativos, está apresentada na Figura 7 para todos os controles de temperatura, com declividade negativa ($P<0,01$). A adesividade é definida como o trabalho requerido para superar e vencer a atração de forças entre a superfície do queijo e a superfície do prato de compressão (GIESE, 1995). Trata-se de um parâmetro que está muito relacionado com os valores de proteólise do queijo, principalmente envolvido com a quebra observada nas α_s -caseínas, sendo as frações que mais apresentaram degradação durante a maturação deste queijo. Do mesmo modo, os valores da adesividade apresentaram pequenas diferenças ($P<0,05$), em relação aos controles de temperatura (Quadro 1).

Durante os períodos de maturação, os queijos se tornaram menos elásticos ($P<0,05$) quando submetidos aos controles A, B e C. No entanto, os valores foram compatíveis com os encontrados por BUFFA et al. (2001), GAYA et al., (1990) e FEDRICK e DULLEY (1984) (Figura 8). A elasticidade, bem como os outros parâmetros da textura, é muito influenciada pelos parâmetros de pH, umidade, concentração de sal e hidrólise protéica do queijo durante a maturação. Diferenças ($P<0,05$) foram encontradas entre os controles de temperatura, porém foram relativamente pequenas ao longo dos períodos de maturação (Quadro 1).



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

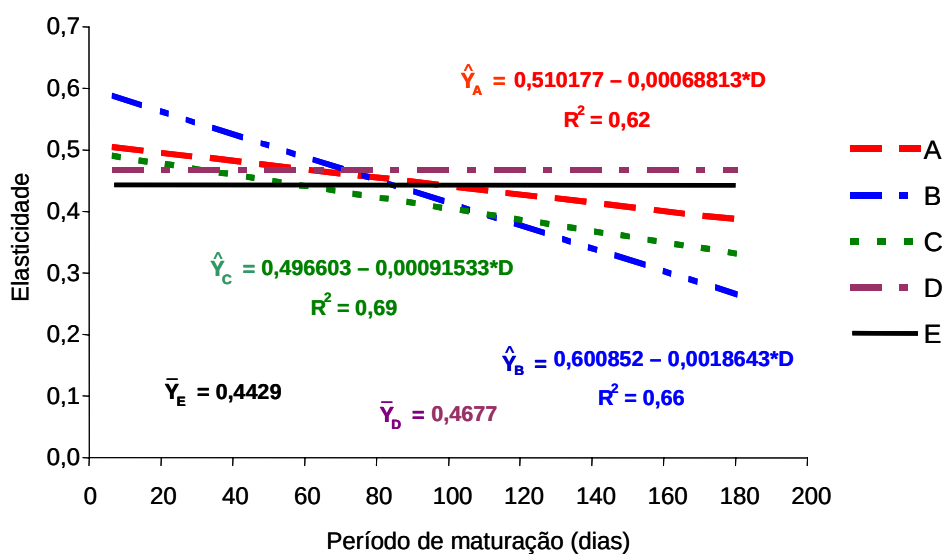
Figura 6 – Estimativas do parâmetro de fraturabilidade, obtidas através das curvas da TPA, para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

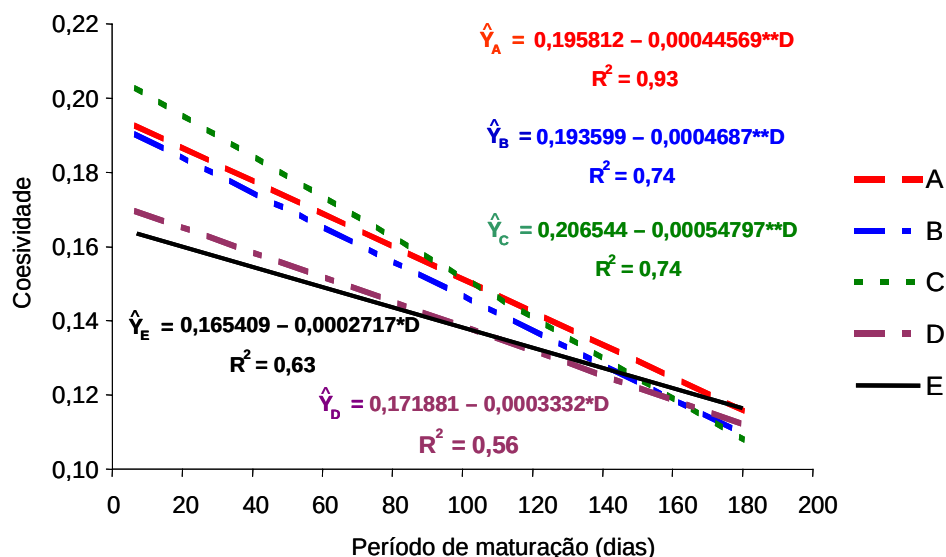
Figura 7 – Estimativas do parâmetro de adesividade, obtidas através das curvas da TPA, para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

As características de elasticidade e coesividade estão representadas nas Figuras 8 e 9, respectivamente, as quais dependem mais da estrutura e de rearranjo das moléculas de proteínas do que dos parâmetros físico-químicos (BUFFA et al., 2001; RAPACCI et al., 1998). A elasticidade em queijos duros não é um fator predominante, o qual é mais importante para queijos de massa filada, como Mussarela, em que o grau de desmineralização da massa está diretamente ligado às propriedades de elasticidade e filagem (FURTADO, 1997). A elasticidade sofreu influência negativa ($P < 0,05$) em função dos períodos de maturação somente para os controles de temperatura A, B e C. A coesividade apresentou decréscimo ($P < 0,01$) em função dos períodos de maturação para todos os controles de temperatura, porém não apresentou diferenças ($P > 0,05$) entre os controles de temperatura a partir dos 120 dias (Quadro 1).



* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

Figura 8 – Estimativas do parâmetro de elasticidade, obtidas através das curvas da TPA, para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

Figura 9 – Estimativas do parâmetro de coesividade, obtidas através das curvas da TPA, para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

No Quadro 2 são mostradas as médias para os parâmetros gomosidade e mastigabilidade, obtidas através de cálculos envolvendo os dados do Quadro 1. A gomosidade é obtida pelo produto entre a dureza e a coesividade e a mastigabilidade é obtida através do produto entre a gomosidade e a elasticidade. A gomosidade apresentou algumas diferenças ($P < 0,05$) até os 60 dias de maturação entre os controles de temperatura. A partir desse momento não foram constatadas diferenças ($P > 0,05$).

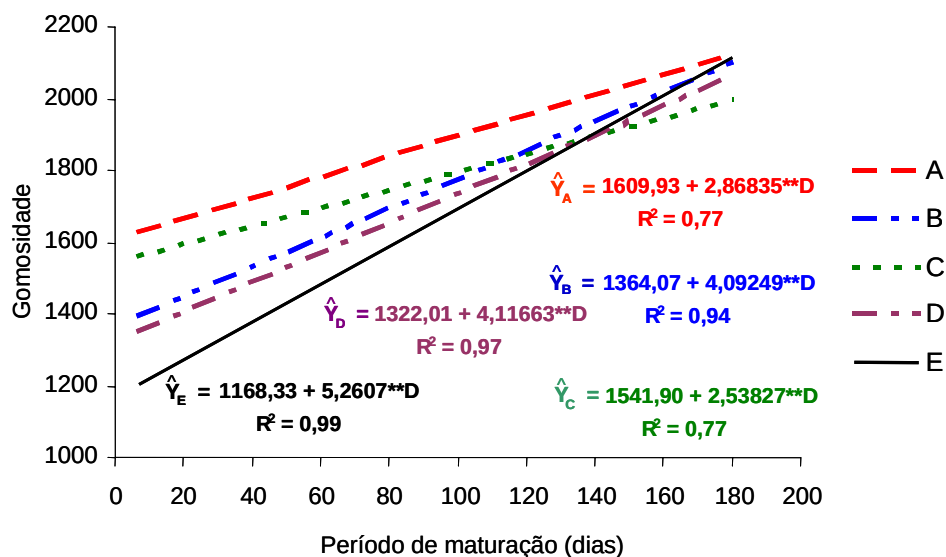
A mastigabilidade apresentou maior diferença ($P < 0,05$) entre os controles de temperatura, mas constatou-se aumento ($P < 0,01$) menos progressivo ao longo dos períodos de maturação, quando comparada com a gomosidade (Figuras 10 e 11). Os comportamentos destes parâmetros estão diretamente relacionados aos parâmetros dureza, elasticidade e coesividade.

Quadro 2 – Médias dos parâmetros de textura, gomosidade e mastigabilidade, obtidas através dos valores dos parâmetros elasticidade, dureza e coesividade, para os diferentes controles de temperatura (A, B, C, D e E)

Controles de temperatura ¹	Período de maturação (dias)					
	7	15	60	120	180	
GOMOSIDADE						
A	1449,00 a	1696,86 a	1788,97 a	1889,46 a	1908,00 a	2109,05 a
B	1358,86 a	1363,02 bc	1609,85 ab	1623,3 abc	1789,51 a	2125,93 a
C	1400,79 a	1635,96 ab	1647,79 ab	1807,13 ab	1850,42 a	1955,09 a
D	1303,76 a	1408,00 bc	1454,11 bc	1553,39 bc	1894,81 a	2014,05 a
E	1253,07 a	1278,36 c	1280,89 c	1427,86 c	1801,32 a	2135,92 a
MASTIGABILIDADE						
A	830,92 ab	804,52 ab	828,86 a	833,07 a	809,07 ab	848,72 abc
B	968,20 a	841,78 a	709,41 ab	630,57 a	668,50 b	664,44 c
C	788,19 abc	752,24 ab	738,97 ab	718,49 a	714,32 b	685,27 bc
D	569,70 c	613,62 b	649,51 ab	769,23 a	936,95 a	990,64 a
E	624,21 bc	594,77 b	526,44 b	653,45 a	702,34 b	894,56 ab

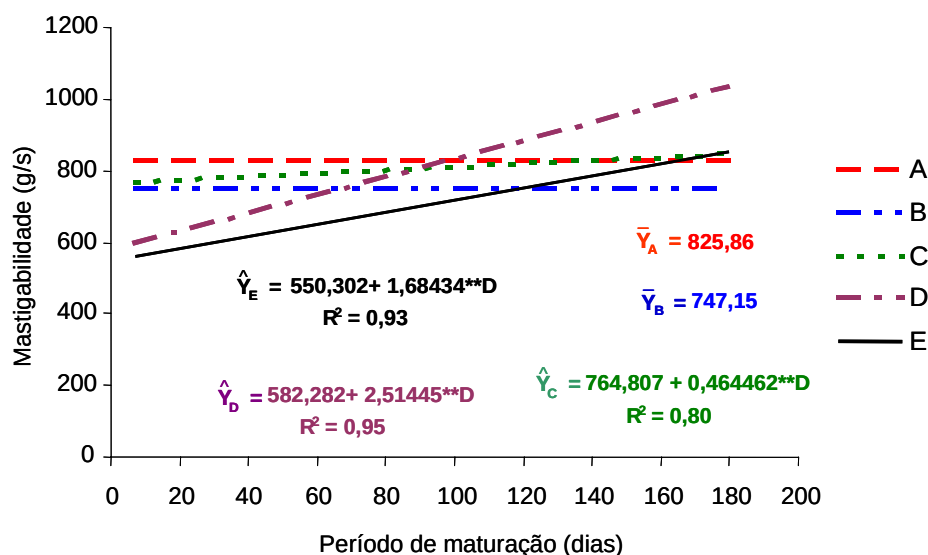
Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

¹ A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



** Significativo pelo teste t ($P<0,01$).

Figura 10 – Estimativas do parâmetro de gomosidade, obtidas através das curvas de TPA, para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 11 – Estimativas do parâmetro de mastigabilidade, obtidas através das curvas de TPA, para os diferentes controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

3.3. Correlações dos parâmetros reológicos

As correlações entre os parâmetros obtidos através das análises dos perfis de textura (TPA) e os parâmetros da textura obtidos pela análise sensorial estão representadas no Quadro 3. A dureza da TPA apresentou correlação positiva ($P < 0,01$) com os parâmetros de textura da análise sensorial dureza, granulidade e solubilidade para os controles de temperatura A, B, D e E e correlação positiva ($P < 0,05$) para o controle de temperatura C. Para sequidade houve correlação positiva ($P < 0,01$) para os controles de temperatura D e E, provavelmente devido ao aumento do extrato seco obtido ao longo da maturação para estes controles de temperatura que se encontravam submetidos a maior aumento de temperatura.

Correlações negativas ($P < 0,05$) ocorreram entre a dureza da TPA e os aspectos manteguidade e elasticidade, para todos os controles de temperatura, indicando que, à medida que se aumenta a dureza, diminui-se a elasticidade e a

Quadro 3 – Correlações entre os parâmetros de textura obtidos no TPA e os parâmetros de textura obtidos pela análise sensorial nos diferentes controles de temperatura (A,B, C, D e E)

	DUREZA ¹	FRATUR	ADESIV	ELASTI	COESIV	GOMOSI	MASTIG
A ³							
TXELS ²	-0,78*	-0,60	0,89**	0,79*	0,78	-0,64	0,05
TXFRI	0,27	0,52	0,03	-0,28	-0,07	0,55	0,86*
TXADE	0,60	0,72	-0,57	-0,73	-0,50	0,85*	0,71
TXGRA	0,92**	0,86*	-0,97**	-0,97**	-0,92**	0,87**	0,20
TXSOL	0,90**	0,97**	-0,86*	-0,93**	-0,93**	0,89**	0,26
TXDUR	0,94**	0,83*	-0,99**	-0,95**	-0,98**	0,79*	-0,02
TXMAN	-0,78*	-0,76	0,86	0,88**	0,78*	-0,82*	-0,30
TXRUG	0,32	0,48	-0,30	-0,48	-0,20	0,65	0,78*
TXSEQ	0,78*	0,55	-0,90	-0,76	-0,81	0,55	-0,23
B							
TXELS ²	-0,88**	-0,82*	0,85*	0,96**	0,90**	-0,76	0,71
TXFRI	0,27	-0,07	0,37	-0,15	0,35	0,32	0,16
TXADE	0,37	0,25	-0,21	-0,64	-0,32	0,42	-0,74
TXGRA	0,86*	0,34	-0,34	-0,71	-0,45	0,46	-0,81*
TXSOL	0,90**	0,92**	-0,99**	-0,81*	-0,98**	0,71	-0,38
TXDUR	0,91**	0,88**	-0,95**	-0,93**	-0,98**	0,74	-0,63
TXMAN	-0,89**	-0,84*	0,89**	0,95**	0,94**	-0,75	0,69
TXRUG	0,64	0,53	0,38	-0,81*	-0,44	0,74	-0,49
TXSEQ	0,65	0,63	0,84*	-0,70	-0,90**	0,39	-0,80*
C							
TXELS ²	-0,81*	-0,63	0,76	0,84*	0,83*	-0,85	0,70
TXFRI	0,25	0,28	-0,59	-0,44	-0,12	0,41	-0,61
TXADE	-0,12	0,10	0,04	0,11	0,20	-0,12	-0,11
TXGRA	0,83*	0,69	-0,81*	-0,96**	-0,76	0,95**	-0,94**
TXSOL	0,79*	0,78*	-0,78*	-0,59	-0,86*	0,62	-0,47
TXDUR	0,78*	0,62	-0,70	-0,63	-0,81*	0,65	-0,45
TXMAN	-0,85*	-0,67	0,81*	0,90**	0,85*	-0,90**	0,78*
TXRUG	0,48	0,36	-0,48	-0,73	-0,37	0,70	-0,79*
TXSEQ	0,55	0,30	-0,48	-0,73	-0,52	0,72	-0,62
D							
TXELS ²	-0,81*	-0,81*	0,92**	-0,99**	0,99**	-0,68	-0,79*
TXFRI	0,68	0,67	-0,84*	0,99**	-0,97**	0,52	0,65
TXADE	-0,32	-0,36	0,35	-0,69	0,59	-0,21	-0,33
TXGRA	0,95**	0,93**	-0,98**	0,77	-0,84*	0,91**	0,93**
TXSOL	0,97**	0,98**	-0,94**	0,87**	-0,90**	0,92**	0,97**
TXDUR	0,88**	0,82*	-0,96**	0,84*	-0,90**	0,75	0,81*
TXMAN	-0,82*	-0,83*	0,86*	-0,97**	0,95**	-0,71	-0,82*
TXRUG	0,28	0,23	-0,47	0,24	-0,33	0,22	0,23
TXSEQ	0,93**	0,94**	-0,93**	0,92**	-0,93**	0,86*	0,93**
E							
TXELS ²	-0,82*	0,64	0,83*	-0,38	0,24	-0,70	-0,83*
TXFRI	0,19	0,21	-0,47	0,78*	0,26	0,30	0,53
TXADE	-0,70	0,68	-0,45	-0,77	-0,78*	0,65	0,49
TXGRA	0,89**	0,90**	-0,98**	-0,01	-0,59	0,94**	0,99**
TXSOL	0,90**	0,91**	-0,95**	-0,26	-0,77	0,90**	0,86*
TXDUR	0,90**	0,91**	-0,99**	-0,04	-0,63	0,93**	0,97**
TXMAN	-0,80*	-0,81*	0,95**	-0,14	0,48	-0,85*	-0,93**
TXRUG	0,53	0,55	-0,73	0,50	-0,07	0,63	0,82*
TXSEQ	0,95**	0,96**	-0,99**	-0,24	-0,77	0,96**	0,94**

** Significativo pelo teste t (P<0,01).

* Significativo pelo teste t (P<0,05).

¹ DUREZA (dureza), FRATUR(fraturabilidade), ELASTI (elasticidade), COESIV (coesividade), GOMOSI (gomosidade), MASTIG (mastigabilidade).

² TXELS (elasticidade), TXFRI (friabilidade), TXADE (adesividade), TXGRA (granulosidade), TXSOL (solubilidade), TXMAN (mantegosidade), TXRUG (rugosidade), TXSEQ (sequidade).

³ Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

mantegosidade. Portanto, importantes associações foram estabelecidas entre os valores apresentados pelo equipamento e os obtidos através de degustadores treinados. Não foram obtidas correlações ($P > 0,05$) entre a dureza e os aspectos friabilidade, adesividade e rugosidade.

A adesividade, granulabilidade, solubilidade e dureza foram as características do parâmetro textura da análise sensorial que mais se correlacionaram com os aspectos da textura obtida por TPA. A mastigabilidade não apresentou correlação ($P > 0,05$) com estes parâmetros citados anteriormente, mas apenas com rugosidade e friabilidade ($P < 0,05$). A sequidade apresentou correlação negativa ($P < 0,05$) com a adesividade e coesividade nos controles de temperatura A, B, D e E, porém não apresentou correlação no controle de temperatura C ($P > 0,05$).

Outras correlações positivas ($P < 0,05$) ocorreram entre a fraturabilidade e os aspectos de solubilidade e dureza. A correlação entre a elasticidade obtida por TPA e a obtida por análise sensorial quantitativa (ADQ) foi positiva ($P < 0,01$), podendo-se estabelecer a importância da utilização de TPA na tentativa de imitar os parâmetros sensoriais, principalmente para as características mais importantes na avaliação do queijo, que são dureza, fraturabilidade e elasticidade (FRAU et al., 2000).

As correlações entre os parâmetros físico-químicos e os parâmetros de textura obtidos na TPA estão apresentadas no Quadro 4. A dureza correlacionou-se negativamente ($P < 0,05$) com relação à atividade de água, umidade e pH, indicando que, quanto maior a dureza, menores são os valores destes parâmetros. Do mesmo modo, se analisados os valores de extrato seco obtidos durante a maturação – 71,55; 73,06; 72,40; 72,40; e 72,76%, respectivamente para os controles de temperatura A, B, C, D e E aos 180 dias de maturação – estes indicaram alta correlação negativa entre a umidade e a dureza do queijo, principalmente naqueles submetidos a maior temperatura de maturação. A relação sal/umidade correlacionou-se positivamente ($P < 0,01$) com a fraturabilidade e gomosidade, pois os valores de força necessários para romper o queijo, em função de sua dureza, foram menores no início da maturação, em razão de os queijos serem mais fraturáveis; com o aumento dos períodos de maturação,

foram necessários maiores valores em g/s para fraturar o queijo. A adesividade, elasticidade e coesividade se correlacionaram negativamente ($P < 0,05$) com o cloreto na umidade, pois, à medida que se aumentou a quantidade de sal no queijo ao longo dos períodos de maturação, estes parâmetros diminuíram o seu efeito, principalmente pela maior atuação e pelos rompimentos das frações α e β -caseínas.

Quadro 4 – Correlações entre os parâmetros de textura obtidos no TPA e os parâmetros físico-químicos, nos diferentes controles de temperatura (A,B, C, D e E)

	DUREZA ¹	FRATUR	ADESIV	ELASTI	COESIV	GOMOSI	MASTIG
A							
pH ²	-0,88* ¹	-0,82*	0,88*	0,96**	0,87*	-0,92**	-0,05
AW	-0,98**	-0,97**	0,98**	0,85*	0,97**	-0,92**	-0,37
UMID	-0,98**	-0,96**	0,98**	0,88*	0,97**	-0,94**	-0,33
Cl/UM	0,96**	0,95**	-0,98**	-0,90**	-0,95**	0,95**	0,35
B							
pH ²	-0,93**	-0,95**	0,94**	0,92**	0,99**	-0,84*	0,88*
AW	-0,99**	-0,99**	0,97**	0,86*	0,91**	-0,96**	0,72
UMID	-0,99**	-0,98**	0,97**	0,89**	0,93**	-0,96**	0,77
Cl/UM	0,99**	0,98**	-0,96**	-0,92**	-0,94**	0,96**	-0,81*
C							
pH ²	-0,95**	-0,80*	0,91**	0,95**	0,96**	-0,95**	0,92**
AW	-0,97**	-0,84*	0,98**	0,88**	0,90**	-0,91**	0,92**
UMID	-0,99**	-0,80*	0,99**	0,91**	0,93**	-0,95**	0,95**
Cl/UM	0,99**	0,75	-0,98**	-0,91**	-0,95**	0,95**	-0,96**
D							
pH ²	-0,71	-0,66	0,68	-0,60	0,76	-0,65	-0,66
AW	-0,97**	-0,99**	0,92**	-0,89**	0,81*	-0,98**	-0,99**
UMID	-0,95**	-0,98**	0,90**	-0,84*	0,77	-0,98**	-0,98**
Cl/UM	0,96**	0,98* ⁸	-0,91* ⁸	0,85*	-0,79*	0,98**	0,99**
E							
pH ²	-0,63	-0,68	0,73	0,86*	0,84*	-0,48	-0,17
AW	-0,99**	-0,98**	0,94**	0,64	0,83*	-0,98**	-0,89**
UMID	-0,99* ⁸	-0,99**	0,96**	0,70	0,88*	-0,96**	-0,84*
Cl/UM	0,99**	0,99**	-0,95**	-0,80*	-0,87*	0,97**	0,84*

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

¹ DUREZA (dureza), FRATUR(fraturabilidade), ELASTI (elasticidade), COESIV (coesividade), GOMOSI (gomosidade), MASTIG (mastigabilidade).

² pH, Aw (atividade de água), UMID (umidade), Cl/UM (cloreto na umidade).

³ Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

As correlações entre as frações nitrogenadas, NS em pH 4,6, NS em TCA 12% e a fração amínica (N-NH₂) e os parâmetros da TPA estão

apresentadas no Quadro 5. Estas correlações estão de acordo com as estabelecidas por FEDRICK e DULLEY (1994), principalmente as correlações negativas ($P < 0,05$) entre as frações nitrogenadas e adesividade, elasticidade e coesividade. Através destas explica-se a importância do parâmetro elasticidade no queijo, pois, à medida que aumentam os valores das frações solúveis, menor será a elasticidade; conseqüentemente, o desarranjo das proteínas na massa do queijo será maior, influenciando diretamente o seu *flavor* e a sua textura.

Quadro 5 – Correlações entre os parâmetros de textura obtidos no TPA e os parâmetros proteolíticos, nos diferentes controles de temperatura (A,B, C, D e E)

	DUREZA ¹	FRATUR	ADESIV	ELASTI	COESIV	GOMOSI	MASTIG
A ³							
NS ²	0,97**	0,94**	-0,99**	-0,85*	-0,97**	0,90**	0,34
NNP	0,99**	0,99**	-0,96**	-0,82*	-0,96**	0,91**	0,45
N-NH ₂	0,98**	0,92**	-0,95**	-0,80*	-0,99**	0,83*	0,15
B							
NS ²	0,99**	0,98**	-0,96**	-0,88*	-0,91**	0,97**	-0,74
NNP	0,99**	0,98**	-0,96**	-0,85*	-0,89**	0,97**	-0,70
N-NH ₂	0,96**	0,96**	-0,93**	-0,77	-0,85*	0,94**	-0,61
C							
NS ²	0,98**	0,78*	-0,99**	-0,88*	-0,93**	0,92**	-0,92**
NNP	0,97**	0,80*	-0,99**	-0,85*	-0,91**	0,90**	-0,90**
N-NH ₂	0,94**	0,89**	-0,96**	-0,84*	-0,87*	0,88*	0,87*
D							
NS ²	0,99**	0,97**	-0,98**	-0,93**	-0,93**	0,93**	0,97**
NNP	1,00**	0,99**	-0,97**	-0,90**	-0,90**	0,97**	0,98**
N-NH ₂	0,98**	0,98**	-0,93**	-0,86*	-0,84*	0,98**	0,99**
E							
NS ²	0,95**	0,98**	-0,99**	-0,70	-0,92**	0,89**	0,74
NNP	0,97**	0,99**	-0,98**	-0,69	-0,91**	0,92**	0,79*
N-NH ₂	0,99**	0,99**	-0,95**	-0,69	-0,85**	0,97**	0,84*

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

¹ DUREZA (dureza), FRATUR (fraturabilidade), ELASTI (elasticidade), COESIV (coesividade), GOMOSI (gomosidade), MASTIG (mastigabilidade).

² NS (nitrogênio solúvel), NNP (nitrogênio não-protéico), N-NH₂ (nitrogênio amínico).

³ Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

4. CONCLUSÕES

Por meio da análise do perfil da textura (TPA) foi possível observar que o aumento de temperatura de 10 para 15 °C, aplicado de diferentes formas nos controles de temperatura dos queijos, não foi suficiente para alterar as características de textura destes, pois estas foram mais influenciadas pelos períodos de maturação.

A análise dos queijos pela TPA está correlacionada com outras características, mostrando que as modificações de textura que ocorreram na massa do queijo foram influenciadas pela concentração de sal na umidade, pela umidade e pela degradação de proteínas, avaliadas principalmente nos parâmetros dureza, fraturabilidade e elasticidade.

Os parâmetros de textura obtidos com a TPA correlacionaram-se positivamente com aqueles obtidos pela análise sensorial quantitativa (ADQ), indicando a importante relação entre os métodos objetivos e subjetivos com relação ao perfil da textura do queijo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMANTEA, G.F.; SHURA, B.J.; NAKAI, S. Culture effect on ripening characteristics and rheological behavior of Cheddar cheese. **Journal of Food Science**, 51:912-918, 1986.
2. ASTON, J.W.; GILES, J.E.; DURWARD, I.G.; DULLEY, J.R. Effect of elevated ripening temperatures on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, 52:565-572, 1985.
3. BARRETT, D.M.; GARCIA, E.; WAYNE, J.E. Textural Modification of Processing Tomatoes, Critical Review: **Food Science and Nutrition**, 38(3):173-258, 1998.
4. BOURNE, M.C. Texture Profile Analysis. **Food Technology**, 32(7):62-72, 1978.
5. BUFFA, M.N.; TRUJILLO, A.J.; PAVIA, M.; GUAMIS, B. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. **International Dairy Journal**, 11:927-934, 2001.
6. CAMPOS, S.D. Metodologia objetiva para avaliação de parâmetros de textura. In: CAMPOS, S.D. **Reologia e Textura de Alimentos**. Campinas: ITAL, p.43-59, 1989 (Manual Técnico)
7. CREAMER, L.K.; OLSON, N.F. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. **Journal of Food Science**, 47:631-646, 1982.
8. DUMAIS, R.; BLAIS, J.A.; CONRAD, F. O queso. In: AMIOT, J. **Ciencia y tecnología de la leche**. Acribia, S.A., Zaragoza, 1991.
9. EL SODA, M. Accelerated Maturation of cheese. **International Dairy Journal**, 3:531-544, 1993.
10. EL SODA, M. Control and enhancement of flavour in cheese. In: LAW, B.A. **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Blackie academic & Professional, 2.ed., 1997. 365p.
11. FANELON, M.A.; O'CONNOR, P.; GUINEE, T.P. The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in Cheddar cheese during ripening. **Journal Dairy Science**, 83:2173-2183, 2000.
12. FEDRICK, I.A.; DULLEY, J.R. The Effect of Elevated Storage Temperatures on the Rheology of Cheddar Cheese. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**. 19:141- 150, 1984.
13. FERNANDEZ DEL POZO, B.; GAYA, P.; MEDINA, M.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M. A.; NÚÑEZ, M. Changes in chemical and reological characteristics of La Serena ewes' milk cheese during ripening. **Journal of Dairy Research**, 55:457-464, 1988.
14. FOLKERTSMA, B.; FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. Accelerated ripening of cheddar cheese at elevated temperatures. **International Dairy Journal**, 6:1117-1134, 1996.
15. FRAU, M.; CAÑELLAS, B.; SÁNCHEZ, E.; ROSSELLÓ, C. La propiedades texturales del queso y su papel en la insustria lactea. **Revista Alimentaria**, Marzo, nº.5, 2000.
16. FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. Rural Globo, S.P. 1990. 297p.
17. FURTADO, M.M. **Manual prático da Mussarela (Pizza Cheese)**. Master Graf, Campinas, S.P., 1997. 70p.
18. GAYA, P.; MEDINA, M.; RODRIGUEZ-MARTIN, M.A.; NÚÑEZ, M. Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: the effect of elevated temperatures. **Journal Dairy Science**, 73:26-32, 1990.

19. GIESE, J. Measuring physical properties of foods. **Food Technology**, Chicago, v.49, n.2, p.54-63, 1995.
20. GRIPON, J.C. Flavour and texture in soft cheese. In: LAW, B.A. **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Blackie academic & Professional, 2.ed., 1997.
21. LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.C.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, 70:1748-1760, 1987.
22. MAPA. Orden de 6 de mayo de 1993 por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen "Queso Zamorano" y su Consejo Regulador (Boletín N° 120 de mayo de 1993).
23. MARINO, M.; MAIFRENI, M.; PITTIA, P.; RONDINI, G. Effect of proteolytic starters on reological characteristics of Montasio Cheese. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, 48(3):253- 260, 1997.
24. MISTRY, V.V.; KASPERSON, K.M. Influence of salt on quality of reduced fat cheese Cheddar. **Journal Dairy Science**, 81:1214-1221, 1998.
25. NÚÑEZ, M.; GUILLEN, A.M.; RODRIGUEZ-MARIN, M.A.; MARCILLA, A.M.; GAYA, P.; MEDINA, M. Accelerated Ripening of Ewes' Milk Manchego Cheese: The Effect of Neutral Proteinases. **Journal of Dairy Science**, 74:4108-4118, 1991.
26. O'HARE, L. Non-sensory assessment of cheese flavor and texture. **Dairy Industry International**, 55(3):37-41, 1990.
27. PRENTICE, J.H.; LANGLEY, K.R.; MARSHALL, R.J. Cheese Rheology. In: Fox, P.F. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**, Chapman e Hall, 1993, 599p.
28. RAPACCI, M.; CAMPOS, S.D.S.; VAN DENDER, A.G.F. Requeijão Cremoso-Avaliação do Perfil de Textura. **Revista Indústria de Laticínios – Ano 3**, n.18, Nov/dez 1998.
29. SZCZESNIAK, A.S. Classification of textural characteristics. **Journal Food Science**, 28:385-389, 1963.
30. SZCZESNIAK, A.S. **Physical properties of food: what they are and their relation to other food properties**. In: PELEG, M.; BAGLEY, E.B. Westport, AVI, Inc., 1983, 42p.
31. TEXTURE TECHNOLOGIES CORP. Texture analyzer application study of: TA-XT2 Key Features. New York, 1992 (**Catálogo**).
32. TUNICK, M.H.; NOLAN, E.J. Rheology of cheese. In: BAIANU, I.C. **Physical chemistry of Food Processes: Fundamental Aspects** vol. 1. Van Nostrand Reinhold, New York. p.273-297, 1992.
33. VAN VLIET, T.; PELEG, M. Effect of sample size and preparation. **Bulletin of the International Dairy Federation**. Brussels, v.268, p.26-29, 1991.
34. VAN VLIET, T. Terminology to be used in cheese rheology. **Bulletin of the International Dairy Federation**. Brussels, 268:5-15, 1991.
35. VISSER, J. Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. **Bulletin of the International Dairy Federation**. Brussels, v.268, p.49-61, 1991.
36. VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview. **Journal of Dairy Science**, 76:329-350, 1993.
37. WALSTRA, P.; VAN VLIET, T. Rheology of cheese. **Bulletin of the International Dairy Federation**. Brussels, 153: 22-27, 1982.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO SENSORIAL DO QUEIJO ZAMORANO DOP SOB CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO ACELERADA POR DIFERENTES CONTROLES DE TEMPERATURA

RESUMO

Análise sensorial é um método de análise moderna que valida as características sensoriais dos produtos, levando em consideração os aspectos subjetivos e expressando de maneira efetiva a resposta desejada. A análise sensorial para o queijo Zamorano DOP foi empregada para verificar o perfil sensorial do queijo e o comportamento das características sensoriais ao longo dos períodos de maturação de 30, 60, 120 e 180 dias, sob condições de maturação acelerada por cinco diferentes controles (A, B, C, D e E), sendo: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias. A análise discriminante quantitativa (ADQ) descreveu os atributos-chave de 26 características sensoriais, agrupadas em quatro parâmetros fundamentais: visual, odor, textura e sabor. Cada característica sensorial foi analisada pelo teste t para comparação da média com o padrão obtido a partir dos escores estabelecidos por seis julgadores treinados, em nível de significância de 5%, para cada controle de temperatura e período de maturação. Também, com base nas 26 características sensoriais, foram realizadas análises de fatores e discriminante. Com base nos fatores obtidos, foram realizadas análises de variância, de acordo com o esquema de parcelas subdivididas no delineamento em blocos casualizados, aplicando-se o teste de Tukey aos controles de temperatura e a análise de regressão aos períodos de maturação. Observou-se que um queijo maturado por 60 dias a 15 °C apresentou as mesmas características sensoriais de um outro de 120 dias de maturação sob temperatura

de 10 °C. Dessa forma, pode-se modificar o prazo mínimo de 100 dias de maturação para comercialização, estabelecido pelo Conselho Regulador de Denominação de Origem Protegida, para 60 dias. Portanto, a avaliação sensorial por meio da ADQ indicou, de maneira geral, que os parâmetros sensoriais dos queijos foram próximos, quando submetidos à maturação acelerada por diferentes temperaturas.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Zamorano com Denominação de Origem Protegida (DOP) é elaborado de leite de ovelha das raças Churra e Castelhana pasteurizado e apresenta massa dura. Como é extremamente controlado pelo Conselho Regulador, tanto nos aspectos físico-químicos como nos sensoriais, existe uma equipe de degustadores treinados para verificar se as suas características estão de acordo com a qualidade e a tradição deste tipo de queijo.

A tipificação dos queijos e o melhoramento de seus processos de elaboração e das condições de maturação são de capital importância para a comercialização, pois o queijo somente é colocado no mercado consumidor a partir de 100 dias de fabricação. Segundo POMAR et al. (2001), mesmo para os queijos com Denominação de Origem Protegida, devem-se procurar melhorias no produto final, pois estas poderão reverter em expansão das vendas do produto tanto no mercado interno como no externo.

A aceleração da maturação é um processo eficiente que afeta diretamente a proteólise e a lipólise dos queijos, sendo de fácil aplicação e controle (EL SODA, 1997). São várias as técnicas empregadas para acelerar a maturação, dentre as quais a modificação na temperatura de armazenamento durante o tempo de maturação dos queijos (FOLKERTMA et al., 1996).

FERNÁNDEZ-GARCÍA e LOPÉZ-FANDIÑO (1994), em estudos sobre maturação acelerada de queijos de leite de ovelha, observaram que a maior parte das experiências foi realizada em queijos espanhóis, como o Manchego. Os procedimentos utilizados incluíram incrementos na temperatura de maturação, adição de enzimas ou misturas de enzimas na massa do queijo e adição de cultivos modificados. Alguns destes métodos proporcionaram resultados positivos, tanto no que se refere à potencialização do gosto típico dos queijos como à redução do tempo de maturação.

A proteólise durante a maturação do queijo afeta grandemente as suas propriedades sensoriais (GRAPPIN et al., 1985; FOX et al., 1993, 1996; EL SODA, 1997). Na maior parte das variedades dos queijos duros e semiduros,

a proteólise é indexada à maturação (FARKYE e FOX, 1990), afetando principalmente o *flavor* e a textura do queijo (WILKINSON, 1993). Recentemente, vários estudos têm sido feitos para acelerar a maturação em queijos. Por essa razão, o Grupo F16 da INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF, 1991) estabeleceu critérios que são recomendados para as análises aplicadas nesse processo. Nos aspectos sensoriais foram estabelecidas normas para garantir a qualidade do produto final, como: avaliação do *flavor* com relação a grau, intensidade e incidência específica de defeitos e avaliação de textura por meio de parâmetros subjetivos (painel de escores) e objetivos (métodos instrumentais).

A avaliação sensorial tem se expandido muito nos últimos anos, sendo uma maneira dinâmica utilizada por várias indústrias de produtos lácteos para avaliar os seus produtos antes de serem colocados no mercado consumidor (CHAPMAN et al., 2001).

A análise descritiva quantitativa (ADQ) representa a mais sofisticada das metodologias de avaliação sensorial, comparada com outros métodos descritivos e afetivos. Os resultados desta análise incluem uma descrição sensorial completa dos produtos testados e proporcionam uma base para determinar os atributos sensoriais que são importantes, assim como ajudam a identificar a intensidade relativa de cada atributo, ingredientes específicos ou variáveis no processo (MODESTA, 1994).

A análise descritiva quantitativa é um método de avaliação sensorial que identifica, descreve e quantifica os atributos sensoriais de um produto (AMERINE et al., 1965), isto é, descreve as propriedades sensoriais e mede a intensidade em que elas foram percebidas pelos provadores (CHAPMAN et al., 2001). Além disso, permite a descrição das características sensoriais com precisão em termos matemáticos (MOSKOWITZ, 1988), sendo uma técnica valiosa quando se deseja obter melhores informações sobre aparência, aroma, sabor ou textura dos alimentos (AMERINE et al., 1965; MODESTA, 1994).

Segundo MURRAY et al. (2001), as possibilidades de aplicação da metodologia da ADQ são várias: ligação direta entre a produção, pesquisa e desenvolvimento, pesquisa de mercado e consumidor e controle de qualidade.

No caso de queijos de Denominação de Origem Protegida, é de suma importância a observação nos métodos de fabricação ou processamento, verificação de elaboração de produtos uniformes, realizações de comparações interindustriais e a influência da composição sobre as características sensoriais, de maneira a manter constantes estas características no produto final (ELORTONDO et al., 2000).

Este método de ADQ exige provadores treinados, que são selecionados pela habilidade em discriminar diferenças nas propriedades sensoriais de amostras de produtos específicos para os quais estão sendo treinados, visando, assim, a obtenção de respostas confiáveis (MODESTA, 1994).

Segundo BÁRCENAS et al. (2000), vários estudos são recomendados para as análises estatísticas dos dados sensoriais, como análises exploratórias dos dados e análises multivariadas. MEILGAARD et al. (1991) explicam os procedimentos estatísticos como técnicas básicas e técnicas avançadas. As técnicas básicas incluem análises de variância seguidas de comparações múltiplas de médias. Estes estudos têm sido muito aplicados em avaliações sensoriais de queijos Manchego, Cheddar, Feta, Reggianito e outros. As técnicas estatísticas avançadas implicam análises multivariadas, podendo ser aplicadas após a utilização das técnicas básicas, como em análise discriminante (ORDÓÑEZ et al., 1998; BÁRCENAS et al., 1999), componentes principais e análise de fatores (BÁRCENAS et al., 2000; CHAPMAN et al., 2001).

A análise discriminante tem sido utilizada em diversas variedades de queijos, para discriminar as análises físico-químicas na evolução da maturação (DEWETTINCK et al., 1997; LUCISANO et al., 1991), nas condições de maturação (ALONSO et al., 1987) e na matéria-prima de elaboração (CHAPMAN et al., 2001; CEPEDA et al., 1990), assim como para classificar as amostras de queijos com os parâmetros sensoriais (GODWIN et al., 1977) e aspectos reológicos (AMANTEA et al., 1986). Esta análise foi utilizada para verificar diferenças sensoriais entre os queijos Idiazábal DOP elaborados em distintas épocas do ano, observando elevada heterogeneidade entre as amostras (ORDÓÑEZ et al., 1998).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar os efeitos sobre os parâmetros sensoriais provocados pelos períodos de maturação de 30, 60, 120 e 180 dias e de cinco controles de temperatura implicados na maturação do queijo Zamorano DOP, a fim de verificar o melhor tratamento para acelerar a maturação, sem que haja modificações no *flavor*, bem como nas características sensoriais do queijo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo das amostras

As amostras foram embaladas e acondicionadas seguindo-se as normas preconizadas pela FIL-IDF 50B (1985) e levadas do laboratório do Departamento de Higiene e Tecnologia de Alimentos (DHTA), León, Espanha, para a sala de degustação do Conselho Regulador de DOP para queijo Zamorano, nas províncias de Zamora e Castilla e León, para avaliação sensorial por degustadores devidamente treinados.

As amostras para análise sensorial dos queijos, preparadas de acordo com os controles de temperatura A, B, C, D e E (Figura 1), foram analisadas em quatro sessões, de acordo com os períodos de 30, 60, 120 e 180 dias de maturação. As amostras foram servidas em condições controladas, similares às condições padronizadas para o consumo do queijo, estabelecidas anteriormente durante a seção de treinamento e testes piloto (MAPA, 1993). As avaliações foram conduzidas em ambiente adequado, conforme preconizado por MEILGAARD et al. (1991).

Em cada uma das etapas, as cinco amostras dos diferentes controles de temperatura foram cortadas em formato de cunha, com o objetivo de abranger todo o corpo do queijo. As amostras foram colocadas em bandejas de polietileno descartável, livre de odores ou de qualquer outra influência, codificadas com três dígitos numéricos ao acaso e submetidas aos degustadores. A ficha de avaliação foi preenchida de acordo com a amostra apresentada, e no intervalo entre a degustação de uma amostra e a degustação das outras os degustadores ingeriam água e pão, e novamente água, usados para limpar o palato entre as amostras, de maneira a não sofrer influência na análise da amostra seguinte (MODESTA, 1994).

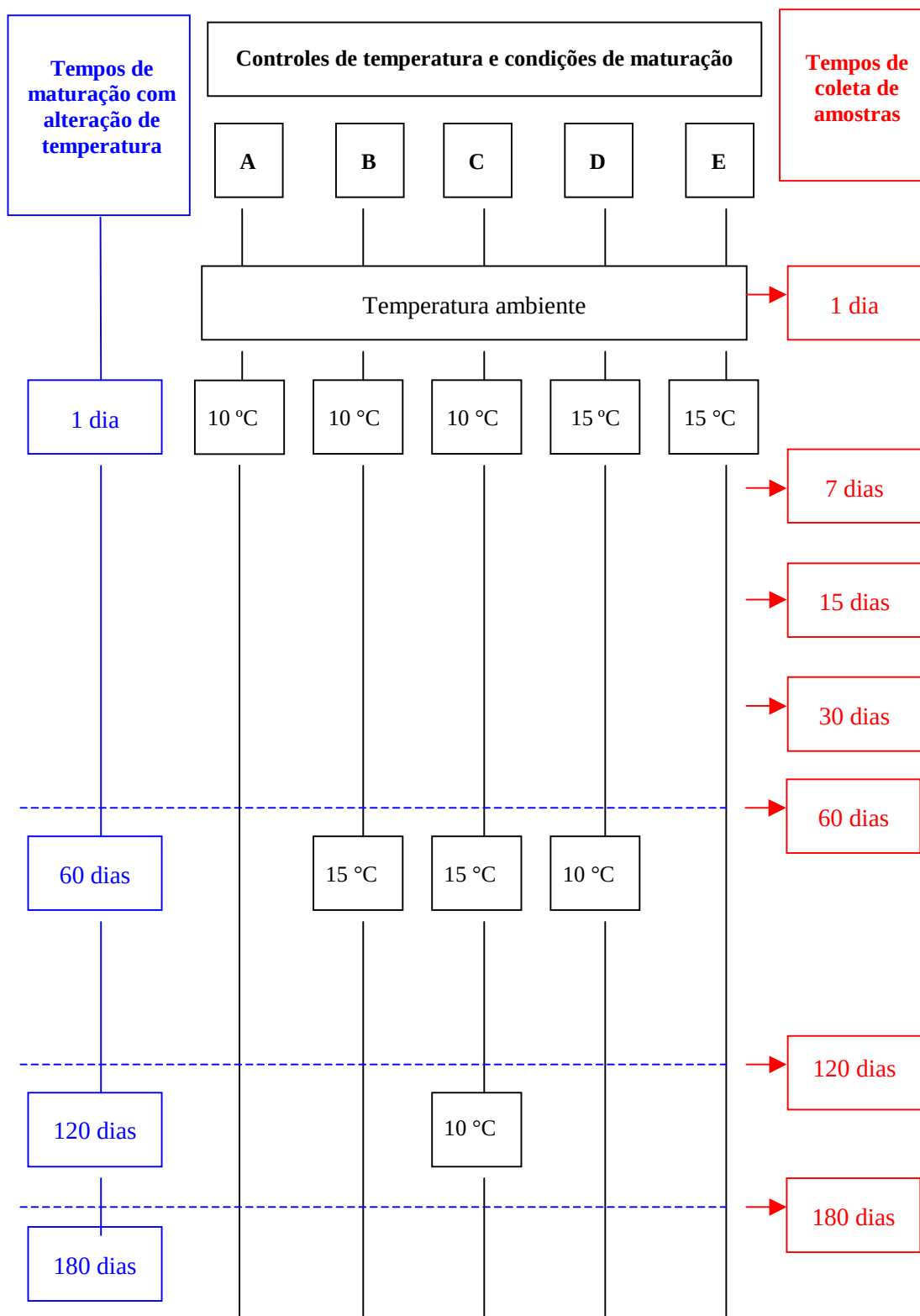


Figura 1 – Diagrama das condições experimentais de maturação do queijo Zamorano DOP.

2.2. Análise sensorial

As amostras de queijos foram avaliadas com relação aos parâmetros visuais nulo aroma, textura e sabor, subdivididos em 26 variáveis, por seis degustadores treinados e membros do Conselho Regulador de Denominação de Origem Protegida, de acordo com os escores de 0 a 10. As notas atribuídas aos parâmetros foram comparadas com valores-padrão, preestabelecidos durante os estudos sensoriais para o queijo Zamorano DOP para 100 dias de maturação (MAPA, 1993), com exceção da variável impressão global do parâmetro sabor, que não apresenta um valor-padrão, pois a maior nota é considerada nesse aspecto conforme mostra o Quadro 1.

Quadro 1 – Ficha de avaliação sensorial para queijo Zamorano DOP

		CARATERÍSTICAS										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VISUAL	INTENS. DE COR											
	Nº DE OLHOS											
	TAMANHO DE OLHOS											
AROMA	LÁCTEO											
	FRESCO E LIMPO											
	PLANTAS AROMÁTICAS											
	AZEITE E GORDURA											
	FRUTOS SECOS											
	BAUNILHA											
	CERA											
	ELASTICIDADE											
TEXTURA	FRIABILIDADE											
	ADESIBILIDADE											
	GRANULOSIDADE											
	SOLUBILIDADE											
	DUREZA											
	MANTEIGA											
	RUGOSA											
	SECA											
SABOR	SALGADO											
	LEITE FRESCO											
	ÁCIDO											
	PICANTE											
	DOCE											
	REGOSTO E PERSIST.											
	IMPRESSÃO GLOBAL											

DEGUSTADOR:
DATA:
AMOSTRA:

Valor-padrão para as características.

2.4. Análise estatística

As análises estatísticas dos 26 parâmetros sensoriais avaliados foram divididas em quatro partes e realizadas através do programa SAEG 8.0 (RIBEIRO JÚNIOR, 2001).

2.4.1. Comparações com o padrão

As comparações foram feitas para cada parâmetro sensorial, com base em seis avaliações, realizadas por seis painelistas treinados, em cada período de maturação (30, 60, 120 e 180 dias) e controle de temperatura (A, B, C, D e E). Todos os parâmetros foram comparados ao seu padrão, empregando-se o teste t a 5% de significância. Desse modo, foram totalizadas 520 análises.

2.4.2. Análise de fatores

De acordo com JOHNSON e WICHERN (1988), a análise de fatores é uma técnica estatística que propicia explicar o comportamento de um maior número de variáveis observadas, em termos de um menor número de fatores, agrupadas nestes por meio de suas correlações. Dessa forma, as variáveis que caracterizam determinado fator estão fortemente correlacionadas entre si, mas fracamente correlacionadas com as variáveis de outro fator. Portanto, cada fator apresenta uma interpretação a respeito de uma ou de mais variáveis, reduzindo assim o número de parâmetros sensoriais a serem analisados. Por conseguinte, o fator constituído será uma multicaracterística que expressa uma determinada função das características nele incorporadas (RESSURECIÓN, 1988; CHAPMAN et al., 2001).

Neste trabalho, a análise de fatores foi realizada através da interpretação das cargas fatoriais maiores do que 0,64 em valor absoluto, após a rotação pelo método Varimax, dentro de cada uma das características-visuais, sabor, textura e aroma. Para isso, foi definido o número de fatores com base no número de autovalores maiores do que 1 da matriz de correlações.

2.4.3. Análise de variância

A análise de variância foi realizada com base nos escores dos fatores criados, segundo um delineamento em blocos casualizados com seis repetições (seis degustadores), em esquema de parcelas subdivididas com cinco controles de temperatura (A, B, C, D e E) colocados nas parcelas e os quatro períodos de maturação (30, 60, 120 e 180 dias) nas subparcelas. Posteriormente, para cada fator, foi aplicado o teste de Tukey para comparar as médias dos controles de temperatura dentro de cada período de maturação, a 5% de significância. Paralelamente, foi realizado um estudo de análise de regressão em função dos períodos de maturação para cada controle de temperatura, considerando-se os níveis de 5% ou de 1% de significância.

2.4.4. Análise discriminante

Este tipo de análise é obtido pelas combinações lineares das variáveis originais que melhor diferenciam os grupos existentes. Dessa forma, cada grupo aparece caracterizado em um espaço multidimensional que permite a classificação dos indivíduos “desconhecidos” em grupos previamente definidos, com a pontuação discriminante para cada grupo (BÁRCENAS et al., 1999).

O objetivo desta análise foi obter a probabilidade da classificação correta, com base na média dos 26 parâmetros sensoriais para cada controle de temperatura e período de maturação, em grupos predeterminados, de acordo com as expectativas em relação aos parâmetros sensoriais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Comparações com o padrão

Nos Quadros 2, 3, 4 e 5 são apresentadas as médias dos parâmetros sensoriais, comparadas com a do padrão. Conforme mostra o Quadro 2, os queijos, aos 30 dias de maturação sob diferentes condições de temperaturas controladas, variaram no aspecto visual em relação à intensidade de cor (ICOR) e ao número de olhos (NOLHOS), nos controles de temperatura A, B, C e D. Os valores atribuídos aos queijos nos 30 dias de maturação estão de acordo com o padrão para o parâmetro tamanho dos olhos (TOLHOS) em todos os controles de temperatura. Os queijos armazenados no controle de temperatura E não apresentaram diferenças ($P>0,05$) no parâmetro visual, possivelmente por apresentarem uma proteólise mais intensa, em virtude da elevação de temperatura de maturação. O parâmetro aroma, com base em sete características, apresentou, de maneira geral, valores semelhantes ($P>0,05$) aos dos padrões, com exceção da característica aroma láctico (ARLACT), que diferiu ($P<0,05$) em todos os controles de temperatura. As maiores variações ocorreram nos parâmetros de textura e de sabor dos queijos, explicável pelo pouco tempo de maturação e pela dificuldade dos degustadores treinados de avaliarem nesta etapa de maturação de 30 dias, com exceção da característica textura adesividade (TXADES), que não apresentou diferença ($P>0,05$) em relação ao padrão.

Para os queijos com 60 dias de maturação, conforme mostra o Quadro 3, as diferenças ($P<0,05$) com relação aos padrões dos queijos testados ocorreram principalmente nos queijos sob controles de temperatura A, B e C. Para todos os parâmetros (visual, aroma, textura e sabor) as diferenças ($P<0,05$) ocorreram nas características intensidade de cor (ICOR), aroma azeite e graxo (ARAZGX), textura granulosa (TXGRAN), sabor salgado (SBSALG), sabor picante (SBPICA) e sabor doce (SBDOCE), em todos os controles de temperatura, pois estes efeitos neste período não estão de acordo com os padrões estabelecidos, o que favoreceu essas diferenças. Desse modo, apesar de os queijos não estarem atendendo a

todos os padrões, os controles de temperatura D e E pareceram, até o presente período, estar atuando de maneira mais benéfica para os padrões de qualidades sensoriais do queijo Zamorano DOP, justificado pela elevação da temperatura (15 °C) à qual foram submetidos.

Os queijos com 120 dias de maturação submetidos aos cinco controles de temperatura não apresentaram diferenças ($P>0,05$) para os parâmetros visuais, mas foram encontradas diferenças ($P<0,05$) em relação aos padrões de poucas características de aroma, textura e sabor, estabelecidos pelos julgadores treinados para avaliar os queijos com 100 dias de maturação. Nesta etapa de maturação, as maiores variações ($P<0,05$) ocorreram para os parâmetros de sabor. Grandes modificações ocorreram com relação à impressão global dos queijos, tendo os seus valores aumentados pelas modificações das temperaturas a que foram submetidos os queijos, a qual favoreceu esta característica. Por outro lado, a característica sabor leite fresco (SBLTFS) sofreu redução ($P<0,05$) nos seus valores em relação ao padrão, para os controles de temperatura B, C, D e E, conferindo maturação mais avançada para estes queijos do que para aqueles sob controle de temperatura A.

Aos 180 dias de maturação, as diferenças ($P<0,05$) detectadas em relação aos padrões ocorreram em poucas situações, principalmente em todos os parâmetros visuais do controle de temperatura E e para todos os queijos analisados quanto ao sabor picante, indicando a importância da proteólise e lipólise no *flavor* do queijo (FOX, 1993; EL SODA, 1993, 1997) nesta etapa de maturação. A impressão global do queijo, conforme mostra o Quadro 5, não apresentou um valor-padrão, mas foi avaliada com nota superior a 5, o que demonstrou uma relação positiva entre o tempo e a temperatura de maturação, mostrando a influência do aumento de temperatura na maturação, fazendo com que houvesse maior atuação das enzimas presentes no queijo (STEELE e ÜNLÜ, 1992).

Quadro 2 – Parâmetros sensoriais comparados com o padrão para 30 dias sob condições de maturação acelerada, nos diferentes controles de temperatura

Parâmetro	Variáveis**	Controles de Temperatura ¹					Padrão (100 dias)
		A	B	C	D	E	
VISUAL	ICOR	3,33*	3,17*	3,33*	3,67	3,83	5
	NOLHOS	4,33	4,00*	4,33	4,00*	4,67	5
	TOLHOS	4,33	5,00	4,67	5,00	5,00	5
AROMA	ARLACT	4,17*	3,83*	3,83*	4,33*	4,17*	5
	ARFRLP	4,33	4,83	4,83	4,17	4,67	5
	ARPLAR	1,00*	0,67*	1,17	1,00	1,17	2
	ARAZGX	1,50	1,00	1,17	1,17	1,17	2
	ARFRSC	0,17	0,17	0,50	0,33	0,50	0
	ARBAUN	0,17	0,17	0,50	0,33	0,50	0
	ARCERA	0,33	0,50	0,50	0,67	0,50	0
TEXTURA	TXELAS	5,33	4,00	5,00	5,83*	5,17	4
	TXFRIA	3,50	3,33	3,17	3,17*	3,33	4
	TXADES	4,17	4,00	4,83	4,83	4,50	4
	TXGRAN	2,83*	2,50*	2,67*	2,50*	2,50*	4
	TXSOLU	3,33*	2,83*	3,33	3,17*	3,17*	4
	TXDURE	1,94	1,83	2,00*	2,17	2,33	3
	TXMANT	5,83*	5,83*	5,67*	5,67*	5,83*	4
	TXRUGO	1,33*	1,50	1,50	1,67	1,50	2
	TXSEQD	5,67*	2,00*	2,17*	2,17*	2,50*	4
SABOR	SBSALG	3,17*	3,00*	3,67*	3,50*	3,67*	5
	SBLTFS	3,00*	2,83*	3,17*	3,17*	3,17*	5
	SBACID	1,50*	1,67*	1,33*	2,00	2,00	3
	SBPICA	0,17*	0,17*	0,33*	0,17*	0,50	1
	SBDOCE	1,17*	1,17*	1,17*	1,50*	1,33*	0
	SBPERS	2,50*	2,63*	3,00*	4,00*	4,17	5
	SBGLOB	4,50	3,83*	3,83*	5,17	4,83	5

* Médias dos controles de temperatura que diferem do padrão pelo teste t (P<0,05).

** ICOR (intensidade de cor), NOLHOS (número de olhos), TOLHOS (tamanho dos olhos); ARLACT (aroma láctico), ARFRLP (aroma fresco e limpo), ARPLAR (aroma plantas aromáticas), ARAZGX (aroma azeite e graxo), ARFRSC (aroma frutos secos), ARBAUN (aroma baunilha), ARCERA (aroma de cera), TXELAS (textura elástica), TXFRIA (textura friável), TXADES (textura adesividade), TXGRAN (textura granulosa), TXSOLU (textura solúvel), TXDURE (textura dura), TXMANT (textura manteiga), TXRUGO (textura rugosa), TXSEQD (textura seca), SBSALG (sabor salgado), SBLTFS (sabor leite fresco), SBACID (sabor ácido), SBPICA (sabor picante), SBDOCE (sabor doce), SBPERS (sabor persistente) e SBGLOB (sabor global)

¹ Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 3 – Parâmetros sensoriais comparados com o padrão para 60 dias sob condições de maturação acelerada, nos diferentes controles de temperatura

Parâmetro	Variáveis**	Controles de Temperatura ¹					Padrão (100 dias)
		A	B	C	D	E	
VISUAL	ICOR	3,83*	3,17*	3,17*	3,83*	4,17*	5
	NOLHOS	4,83	4,83	4,33	4,83	5,00	5
	TOLHOS	4,83	5,00	5,00	5,17	5,33	5
AROMA	ARLACT	4,50	4,00	4,17*	5,17	5,17	5
	ARFRLP	4,83	5,00	4,83	5,17	5,00	5
	ARPLAR	1,50	1,50	1,00*	1,83	1,33*	2
	ARAZGX	1,17*	1,17*	1,17*	1,50*	1,33*	2
	ARFRSC	0,17	0,17	1,17	0,33	0,33	0
	ARBAUN	0,17	0,17	1,17	0,17	0,17	0
	ARCERA	0,17	0,00	0,33	0,17	0,00	0
TEXTURA	TXELAS	3,83	3,67	3,83a	3,83	4,00	4
	TXFRIA	3,17*	3,17	3,17*	4,00	4,00	4
	TXADES	4,67*	4,33	4,33	4,00	4,17	4
	TXGRAN	3,33*	3,33	3,33*	3,17*	3,33*	4
	TXSOLU	3,33*	3,33	3,50	3,83	3,67	4
	TXDURE	2,33*	2,67	2,83	2,83	2,83	3
	TXMANT	4,33	4,50	4,17	4,50	4,83	4
	TXRUGO	1,83	1,67	1,83	1,83	2,00	2
	TXSEQD	3,50	3,83	4,17	3,33	3,17	4
SABOR	SBSALG	3,17*	3,50*	4,00*	4,00*	4,00*	5
	SBLTFS	4,50	4,17	4,50	4,50	4,33	5
	SBACID	2,67	2,67	2,67	2,83	3,00	3
	SBPICA	0,17*	0,17*	0,33*	0,33*	0,33*	1
	SBDOCE	0,83*	1,00*	0,67*	0,83*	0,67*	0
	SBPERS	3,50*	4,00	4,17	4,50	4,33	5
	SBGLOB	5,00	6,00	6,00*	6,00	6,50	5

* Médias dos controles de temperatura que diferem do padrão pelo teste t ($P < 0,05$).

** ICOR (intensidade de cor), NOLHOS (número de olhos), TOLHOS (tamanho dos olhos); ARLACT (aroma láctico), ARFRLP (aroma fresco e limpo), ARPLAR (aroma plantas aromáticas), ARAZGX (aroma azeite e graxo), ARFRSC (aroma frutos secos), ARBAUN (aroma baunilha), ARCERA (aroma de cera), TXELAS (textura elástica), TXFRIA (textura friável), TXADES (textura adesividade), TXGRAN (textura granulosa), TXSOLU (textura solúvel), TXDURE (textura dura), TXMANT (textura manteiga), TXRUGO (textura rugosa), TXSEQD (textura seca), SBSALG (sabor salgado), SBLTFS (sabor leite fresco), SBACID (sabor ácido), SBPICA (sabor picante), SBDOCE (sabor doce), SBPERS (sabor persistente) e SBGLOB (sabor global).

¹ Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 4 – Parâmetros sensoriais comparados com o padrão para 120 dias sob condições de maturação acelerada, nos diferentes controles de temperatura

Parâmetro	Variáveis**	Controles de Temperatura ¹					Padrão (100 dias)
		A	B	C	D	E	
VISUAL	ICOR	4,33	4,50	5,00	4,83	5,17	5
	NOLHOS	5,00	5,17	5,33	5,17	5,50	5
	TOLHOS	5,17	5,17	5,33	5,33	5,50	5
AROMA	ARLACT	5,00	4,33*	5,00	4,50	4,83	5
	ARFRLP	5,00	4,33*	4,67	4,33*	4,83	5
	ARPLAR	1,83	1,67	2,00	2,17*	2,00	2
	ARAZGX	1,83	1,50	1,50	1,67*	1,67	2
	ARFRSC	0,17	0,17	0,17	0,17*	0,17	0
	ARBAUN	0,17	0,00	0,00	0,17*	0,00	0
	ARCERA	0,17	0,17	0,00	0,00	0,00	0
TEXTURA	TXELAS	3,67	3,67	3,67	3,83	4,33	4
	TXFRIA	3,00*	2,67*	2,67*	3,83	3,50	4
	TXADES	4,33	4,00	4,33	3,67	4,50	4
	TXGRAN	3,50	2,67*	3,17	3,33*	3,50	4
	TXSOLU	3,83	4,17	4,33	4,33	4,17	4
	TXDURE	2,83	3,00	3,67	2,67	3,00	3
	TXMANT	4,50	4,33	4,00	4,17	4,83*	4
	TXRUGO	1,33	1,50	1,50	1,50	1,67	2
	TXSEQD	4,17	4,17	3,33	4,00	3,83	4
SABOR	SBSALG	4,33*	5,50	5,33	5,50	5,33	5
	SBLTFS	4,83	4,17*	4,33*	4,33*	4,33*	5
	SBACID	3,50	3,67*	3,33	3,17	3,00	3
	SBPICA	0,67	0,83	1,17	1,17	0,83	1
	SBDOCE	0,67	0,83*	0,83*	0,50	0,67*	0
	SBPERS	4,00	4,00	4,33*	4,83	5,33	5
	SBGLOB	6,67	6,17*	5,83*	6,83*	7,33*	5

* Médias dos controles de temperatura que diferem do padrão pelo teste t (P<0,05).

** ICOR (intensidade de cor), NOLHOS (número de olhos), TOLHOS (tamanho dos olhos); ARLACT (aroma láctico), ARFRLP (aroma fresco e limpo), ARPLAR (aroma plantas aromáticas), ARAZGX (aroma azeite e graxo), ARFRSC (aroma frutos secos), ARBAUN (aroma baunilha), ARCERA (aroma de cera), TXELAS (textura elástica), TXFRIA (textura friável), TXADES (textura adesividade), TXGRAN (textura granulosa), TXSOLU (textura solúvel), TXDURE (textura dura), TXMANT (textura manteiga), TXRUGO (textura rugosa), TXSEQD (textura seca), SBSALG (sabor salgado), SBLTFS (sabor leite fresco), SBACID (sabor ácido), SBPICA (sabor picante), SBDOCE (sabor doce), SBPERS (sabor persistente) e SBGLOB (sabor global).

¹ Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 5 – Parâmetros sensoriais comparados com o padrão para 180 dias sob condições de maturação acelerada, nos diferentes controles de temperatura

Parâmetro	Variáveis**	Controles de Temperatura ¹					Padrão (100 dias)
		A	B	C	D	E	
VISUAL	ICOR	4,83	4,83	5,17	5,50	5,67*	5
	NOLHOS	4,67	5,17	5,33	5,50*	5,67*	5
	TOLHOS	5,33a	5,17	5,55	5,67*	5,67*	5
AROMA	ARLACT	4,83	4,67	4,83	5,00	4,83	5
	ARFRLP	4,67	4,67	5,00	5,00	5,00	5
	ARPLAR	2,00	1,83	2,17	2,00	2,17	2
	ARAZGX	2,17	2,00	2,17	2,17	2,00	2
	ARFRSC	0,17	0,17	0,00	0,00	0,00	0
	ARBAUN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0
	ARCERA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0
TEXTURA	TXELAS	3,83	3,50	3,83	3,85	3,83	4
	TXFRIA	3,83	3,50	3,83	3,83	3,83	4
	TXADES	4,83	4,33	4,83	4,87	4,67	4
	TXGRAN	3,67	3,33	3,67	4,00	4,00	4
	TXSOLU	3,17	4,00	4,83	4,33	4,17	4
	TXDURE	2,83	3,17	2,83	3,17	3,33	3
	TXMANT	4,00	4,83	4,00	4,50	4,33*	4
	TXRUGO	1,83	1,83	2,00	2,00	2,17	2
	TXSEQD	3,50	3,67	3,67	3,83	4,17	4
SABOR	SBSALG	5,17	5,17	5,33	5,67	5,67	5
	SBLTFS	4,67	4,67	4,83*	4,83*	4,83	5
	SBACID	3,00	3,33	3,50	3,50	3,67	3
	SBPICA	0,17*	0,17*	0,33*	0,17*	0,33*	1
	SBDOCE	0,33	0,33	0,17	0,33	0,33	0
	SBPERS	4,50	4,50	4,55	5,17	5,55	5
	SBGLOB	5,83*	7,33*	6,50*	6,66*	7,66*	5

* Médias dos controles de temperatura que diferem do padrão pelo teste t ($P < 0,05$).

** ICOR (intensidade de cor), NOLHOS (número de olhos), TOLHOS (tamanho dos olhos); ARLACT (aroma láctico), ARFRLP (aroma fresco e limpo), ARPLAR (aroma plantas aromáticas), ARAZGX (aroma azeite e graxo), ARFRSC (aroma frutos secos), ARBAUN (aroma baunilha), ARCERA (aroma de cera), TXELAS (textura elástica), TXFRIA (textura friável), TXADES (textura adesividade), TXGRAN (textura granulosa), TXSOLU (textura solúvel), TXDURE (textura dura), TXMANT (textura manteiga), TXRUGO (textura rugosa), TXSEQD (textura seca), SBSALG (sabor salgado), SBLTFS (sabor leite fresco), SBACID (sabor ácido), SBPICA (sabor picante), SBDOCE (sabor doce), SBPERS (sabor persistente) e SBGLOB (sabor global).

¹ Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

3.2. Análise de fatores

No presente trabalho, os fatores em relação aos parâmetros visual, aroma, textura e sabor estão apresentados nos Quadros 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

No Quadro 6 pode-se observar que todos os parâmetros sensoriais descritos estão realmente relacionados com o visual, uma vez que apresentaram as cargas fatoriais maiores do que 0,64 em valor absoluto, após a rotação pelo método Varimax. Portanto, o fator constituído será uma multicaracterística que expressa uma determinada função das características nele incorporadas (RESSURECIÓN, 1988; CHAPMAN et al., 2001). Dessa forma, a avaliação do parâmetro visual do queijo Zamorano DOP pode ser realizada em apenas uma das três características, sem perda de eficiência e com reduções do número de avaliações. Assim, o único fator obtido foi denominado visual.

Quadro 6 – Fator após a rotação de Varimax para parâmetros sensoriais relacionados ao visual

Parâmetro	Comunalidade	Fator 1
ICOL	0,63957	0,79973¹
NOLHOS	0,53376	0,73059¹
TOLHOS	0,44358	0,66602¹
Autovalor		1,61691
Explicação		0,53897

Fator 1 = ICOR (intensidade de cor), NOLHOS (número de olhos) e TOLHOS (tamanho de olhos) = visual.

¹ Cargas fatoriais maiores do que 0,64, em valor absoluto, são apresentadas em negrito.

No Quadro 7 estão apresentados os três fatores obtidos, denominados aroma 1, aroma 2 e aroma 3. Neste caso, o parâmetro aroma foi subdividido em três classes distintas de comportamentos diferentes: aroma 1, composto de aroma láctico, aroma plantas aromáticas e aroma azeite e graxo (ARLACT, ARPLAR e ARAZGX); aroma 2, formado de aroma frutos secos, aroma baunilha e aroma de cera (ARFRSE, ARBAUN e ARCERA); e aroma 3, de aroma fresco e limpo (ARFRLP).

Quadro 7 – Fatores após a rotação de Varimax para parâmetros sensoriais relacionados ao aroma

Parâmetro	Comunalidade	Fator 1	Fator 2	Fator 3
ARLACT	0,54556	0,72332¹	- 0,14931	- 0,00868
ARFRLP	0,83419	0,07746	- 0,09691	0,90488
ARPLAR	0,66115	0,80601	- 0,10581	0,01742
ARAZGX	0,77125	0,69125	0,43441	0,3236
ARFRSC	0,54166	0,08431	0,71944	-0,13021
ARBAUN	0,67634	- 0,12002	0,72317	0,37277
ARCERA	0,57192	- 0,24279	0,64632	- 0,30861
Autovalores		1,902354	1,675661	1,024062
Explicações		0,27176	0,23938	0,14629

Fator 1 = ARLACT (aroma láctico), ARPLAR (aroma de plantas aromáticas) e ARAZGX (aroma azeitoso e graxo) = aroma 1.

Fator 2 = ARFRSC (aroma fruto seco), ARBAUN (aroma baunilha) e ARCERA (aroma de cera) = aroma 2.

Fator 3 = ARFRLI (aroma fresco e limpo) = aroma 3.

¹ Cargas fatoriais maiores do que 0,64, em valor absoluto, são apresentadas em negrito.

No Quadro 8, foram apresentados os três fatores obtidos, denominados textura 1, formado por textura elástica e textura de manteiga (TXELAS e TXMANT); textura 2, por adesividade e solubilidade (TXADES e TXSOLU); e textura 3, por friabilidade, granulabilidade e rugosidade (TXFRIA, TXGRAN e TXRUGO). No entanto, os parâmetros dureza e sequidade (TXDURE e TXSEQD) não se agruparam em fatores. Neste caso, o parâmetro textura foi subdividido em cinco classes distintas. Para o fator textura 2, os maiores valores dos escores fatoriais estão associados aos mesmos valores de adesividade e solubilidade (TXADES e TXSOLU), indicando que este fator está associado diretamente à maior evolução da maturação do queijo.

No Quadro 9 foram obtidos dois fatores: sabor 1, incluindo o sabor salgado, sabor a leite fresco, sabor ácido, sabor doce, sabor persistente e sabor global (SBSALG, SBLTFS, SBACID, SBDOCE, SBPERS e SBGLOB); e sabor 2, constituído somente de sabor picante (SBPICA). Dessa forma, todos os outros parâmetros de sabores se comportaram de forma semelhante, sendo os maiores valores de sabor salgado, sabor leite fresco, sabor ácido, sabor persistente e sabor global (SBSALG, SBLTFS, SBACID, SBPERS e SBGLOB) associados aos menores valores de sabor doce (SBDOCE).

Quadro 8 – Fatores após a rotação de Varimax para parâmetros sensoriais relacionados à textura

Parâmetro	Comunalidade	Fator 1	Fator 2	Fator 3
TXELAS	0,68689	0,80733¹	0,12151	0,14261
TXFRIA	0,63918	- 0,06493	0,4518	0,65638
TXADES	0,68797	0,42648	- 0,69717	- 0,14156
TXGRAN	0,64837	- 0,4017	- 0,11243	0,68875
TXSOLU	0,52856	- 0,20729	- 0,68172	0,14438
TXDURE	0,40829	- 0,54847	0,04981	0,32403
TXMANT	0,71169	0,78072	- 0,16786	- 0,27202
TXRUGO	0,54274	- 0,02996	- 0,16074	0,71833
TXSEQD	0,6605	- 0,59108	- 0,46365	0,31009
Autovalores		2,961455	1,469285	1,083457
Explicações		0,32905	0,16325	0,12038

Fator 1 = TXELAS (textura elástica) e TXMANT (textura de manteiga) = textura 1.

Fator 2 = TXADES (adesividade) e TXSOLU (solubilidade) = textura 2.

Fator 3 = TXFRIA (friabilidade), TXGRAN (granulosidade) e TXRUGO (rugosidade) = textura 3.

TXDUR (dureza) e TXSEQD (sequidade) não se agruparam em fatores.

¹ Cargas fatoriais maiores do que 0,64, em valor absoluto, são apresentadas em negrito.

Quadro 9 – Fatores após a rotação de Varimax para parâmetros sensoriais relacionados ao sabor

Parâmetro	Comunalidade	Fator 1	Fator 2
SBSALG	0,6329	0,64599¹	0,46434
SBLTFS	0,58981	0,76775	- 0,01927
SBACID	0,57626	0,70488	0,28178
SBPICA	0,86948	0,02397	0,93215
SBDOCE	0,45847	- 0,66379	0,13363
SBPERS	0,57092	0,69306	0,30098
SBGLOB	0,68957	0,81179	0,17482
Autovalores			
Explicações			

Fator 1 = SBSALG (sabor salgado), SBLTFS (sabor a leite fresco), SBACID (sabor ácido), SBDOCE (sabor doce), SBPERS (sabor persistente) e GLOBAL (sabor global) = sabor 1.

Fator 2 = SBPICA (sabor picante) = sabor 2.

¹ Cargas fatoriais maiores do que 0,64, em valor absoluto, são apresentadas em negrito.

3.3. Análises de escores dos fatores

Em relação ao fator visual (Quadro 10), a única diferença ($P < 0,05$) encontrada em relação aos controles de temperatura foi aos 180 dias, em que o

controle E apresentou valor superior ($P < 0,05$) em relação ao controle A. Desse modo, considerando-se que o padrão desejado para este tipo de queijo é igual a 5, então, para 180 dias de maturação, os queijos no controle de temperatura E apresentaram pior qualidade em relação ao visual. Para garantir a qualidade em relação a este parâmetro os queijos devem ser armazenados até 120 dias. Em relação aos períodos de maturação, os valores para o visual aumentaram ($P < 0,01$) linearmente. De acordo com os Quadros 2, 3, 4 e 5, onde estão apresentados os parâmetros sensoriais comparados com o padrão estabelecido para 30, 60, 120 e 180 dias de maturação, respectivamente, podem ser estabelecidos períodos de maturação para cada controle de temperatura, a fim de não prejudicar o parâmetro visual.

Quadro 10 – Médias do fator visual¹ em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30	60	120	180
A	6,24 a	7,01 a	7,51 a	7,66 b
B	6,34 a	6,79 a	7,68 a	7,83 ab
C	6,41 a	6,75 a	8,09 a	8,26 ab
D	6,58 a	7,19 a	7,93 a	8,60 ab
E	7,01 a	7,53 a	8,35 a	8,76 a
A	$\hat{Y} = 6,24455 + 0,00881019^{**}D$ ($R^2 = 0,8343$)			
B	$\hat{Y} = 6,16022 + 0,0102709^{**}D$ ($R^2 = 0,9159$)			
C	$\hat{Y} = 6,08037 + 0,0133395^{**}D$ ($R^2 = 0,9085$)			
D	$\hat{Y} = 6,29392 + 0,0131045^{**}D$ ($R^2 = 0,9864$)			
E	$\hat{Y} = 6,77117 + 0,0117016^{**}D$ ($R^2 = 0,9686$)			
CV (Parcelas) = 7,04%		CV (Subparcelas) = 9,78%		

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

¹ Fator Visual = ICOR (intensidade de cor), NOLHOS (número de olhos) e TOLHOS (tamanho de olhos)

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

O parâmetro aroma agrupou-se em fatores, sendo o aroma 1 composto pelas características aroma láctico (ARLACT), aroma plantas aromáticas (ARPLAR) e aroma azeitoso e graxo (ARAZGX); o aroma 2, pelos aromas frutos secos (ARFRSC), aroma baunilha (ARBAUN) e aroma de cera

(ARCERA); e aroma 3, por uma única característica: o aroma fresco e limpo (ARFRLI). Estes aromas estão apresentados nos Quadros 11, 12 e 13 respectivamente, e todos os controles de temperatura apresentaram valores semelhantes ($P>0,05$) a partir dos 120 dias de maturação. No entanto, os valores do aroma 1 aumentaram ($P<0,01$) em relação aos períodos de maturação, o que não aconteceu com os valores dos aromas 2 e 3. Esse aumento para os valores do aroma 1 foi benéfico, visto que as diferenças encontradas em relação ao padrão foram principalmente para a característica aroma láctico (ARLACT), presente no aroma 1, no período de 30 dias de maturação (Quadro 2). Desse modo, a ausência de variação ($P>0,05$) em relação aos períodos de maturação para os aromas 2 e 3 foi benéfica para a qualidade dos queijos, mostrando que estes não sofreram prejuízos em relação aos padrões estabelecidos. Contudo, para o aroma 2 (Quadro 12) ocorreram coeficientes de variações muito elevados, que podem estar relacionados com dificuldades dos degustadores em determinar de forma mais precisa os valores referentes aos parâmetros aromas frutos secos (ARFRSE), aroma baunilha (ARBAUN) e aroma cera (ARCERA). Assim, parece que para estes parâmetros existe a necessidade de melhor treinamento dos degustadores.

Quadro 11 – Médias do fator aroma 1¹ em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30 ^{ab}	60	120	180
A	3,35 a	3,67 ab	4,48 a	4,75 a
B	2,61 a	3,35 ab	3,93 a	4,46 a
C	2,96 a	3,13 b	4,54 a	4,77 a
D	3,26 a	4,45 a	4,40 a	4,77 a
E	3,10 a	4,12 ab	4,49 a	4,69 a
A	$\hat{Y} = 3,11747 + 0,00969035^{**}D$ ($R^2 = 0,9552$) ^a			
B	$\hat{Y} = 2,44804 + 0,0116715^{**}D$ ($R^2 = 0,9519$)			
C	$\hat{Y} = 2,5427 + 0,0134111^{**}D$ ($R^2 = 0,9088$)			
D	$\hat{Y} = 3,44564 + 0,00795462^{**}D$ ($R^2 = 0,6449$)			
E	$\hat{Y} = 3,19112 + 0,00932595^{**}D$ ($R^2 = 0,7748$)			
CV (Parcelas) = 13,25%		CV (Subparcelas) = 20,59%		

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

¹ Aroma 1 = ARLACT (aroma láctico), ARPLAR (aroma de plantas aromáticas) e ARAZGX (aroma azeitoso e graxo).

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 12 – Médias do fator aroma 2¹ em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30	60	120	180
A	0,22 a	-0,13 a	0,01 a	-0,13 a
B	0,18 a	-0,23 a	-0,13 a	-0,17 a
C	0,86 a	0,06 a	-0,37 a	-0,33 a
D	0,70 a	0,03 a	-0,08 a	-0,34 a
E	0,86 a	-0,12 a	-0,32 a	-0,39 a
A	$\bar{Y} = -0,01^a$			
B	$\bar{Y} = -0,09$			
C	$\bar{Y} = 0,05$			
D	$\bar{Y} = 0,08$			
E	$\bar{Y} = 0,01$			
CV (Parcelas) = 8.670%		CV (Subparcelas) = 12.075%		

^a Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

¹ Aroma 2 = ARFSE (aroma fresco e seco) ARBAU (aroma baunilha) e ARCER (aroma de cera).

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 13 – Médias do fator aroma 3¹ em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30	60	120	180
A	3,75 a	4,15 a	4,32 a	4,00 a
B	4,19 a	4,51 a	3,58 a	4,02 a
C	4,31 a	4,20 a	3,84 a	4,37 a
D	3,39 a	4,34 a	3,73 a	4,37 a
E	4,10 a	4,29 a	4,07 a	4,34 a
A	$\bar{Y} = 4,06$			
B	$\bar{Y} = 4,07$			
C	$\bar{Y} = 4,18$			
D	$\bar{Y} = 3,96$			
E	$\bar{Y} = 4,20$			
CV (Parcelas) = 17,48%		CV (Subparcelas) = 25,68%		

^a Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

¹ Aroma 3 = ARFRLI (aroma fresco e limpo).

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Em relação aos parâmetros de textura, agrupados em cinco fatores conforme os Quadros 14, 15, 16, 17 e 18, todos os controles de temperatura apresentaram valores semelhantes ($P > 0,05$) em todos os períodos de maturação. Para a textura 1, os valores diminuíram ($P < 0,01$) em relação aos períodos de maturação, o que foi

importante principalmente para o parâmetro textura de manteiga (TXMANT), que apresentou diferenças ($P < 0,05$) em relação ao padrão aos 30 dias (Quadro 2), mas não diferiu ($P > 0,05$) deste aos 60, 120 e 180 dias, para todos os controles de temperatura (Quadros 3, 4 e 5). Para a textura 2, houve decréscimo ($P < 0,05$) dos escores fatoriais em relação aos períodos de maturação e, conseqüentemente, aumento ($P < 0,01$) dos valores para os parâmetros de adesividade (TXADES) e solubilidade (TXSOLU), o que contribuiu para a melhoria e aproximação dos valores destes parâmetros em relação aos padrões (Quadro 5). Para a textura 3, houve aumento ($P < 0,01$) dos valores em relação aos períodos de maturação, o que também foi provavelmente devido ao aumento da qualidade dos queijos, com exceção dos controles A, B e C. Para dureza (TXDURE) e sequidade (TXSEQD) ocorreram aumentos ($P < 0,01$) rápidos para os períodos iniciais de maturação e, posteriormente, não houve variação ($P > 0,05$) dos valores em relação aos dias subseqüentes. Portanto, pode-se concluir que, para os dois parâmetros, o padrão foi estabelecido rapidamente e sem prejuízo com o armazenamento por períodos longos.

Quadro 14 – Médias do fator textura 1¹ em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30	60	120	180
A	4,86 a	3,47 a	2,89 a	3,30 a
B	4,26 a	3,16 a	2,74 a	2,86 a
C	4,68 a	3,06 a	2,70 a	3,34 a
D	5,06 a	3,37 a	2,93 a	3,31 a
E	4,62 a	3,68 a	3,50 a	3,20 a
A	$\hat{Y} = 4,51147 - 0,00905609^{**}D$ ($R^2 = 0,4944$)			
B	$\hat{Y} = 4,05868 - 0,00820834^{**}D$ ($R^2 = 0,6165$)			
C	$\hat{Y} = 4,14009 - 0,00712136^{*}D$ ($R^2 = 0,3004$)			
D	$\hat{Y} = 4,61402 - 0,00970956^{**}D$ ($R^2 = 0,4642$)			
E	$\hat{Y} = 4,53634 - 0,00806548^{**}D$ ($R^2 = 0,7650$)			
CV (Parcelas) = 14,87%			CV (Subparcelas) = 22,30%	

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

¹ Fator 1 = TXELAS (textura elástica) e TXMANT (textura de manteiga) = textura 1.

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 15 – Médias do fator textura 2¹ em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30	60	120	180
A	-4,33 a	-5,26 a	-5,54 a	-5,58 a
B	-4,18 a	-5,17 a	-5,60 a	-5,33 a
C	-4,93 a	-5,35 a	-5,58 a	-5,47 a
D	-4,81 a	-4,88 a	-5,16 a	-5,80 a
E	-4,69 a	-4,90 a	-5,63 a	-5,85 a
A	$\hat{Y} = -4,48121 - 0,00714529*D$ ($R^2 = 0,6704$)			
B	$\hat{Y} = -4,41156 - 0,00675114*D$ ($R^2 = 0,5291$)			
C	$\hat{Y} = -5,00882 - 0,00331793*D$ ($R^2 = 0,5929$)			
D	$\hat{Y} = -4,52092 - 0,00658302*D$ ($R^2 = 0,9327$)			
E	$\hat{Y} = -4,47243 - 0,00819094*D$ ($R^2 = 0,9523$)			
CV (Parcelas) = 15,09%			CV (Subparcelas) = 18,99%	

^a Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

¹ Textura 2 = TXADES (adesividade) e TXSOLU (solubilidade).

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 16 – Médias do fator textura 3¹ em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30	60	120	180
A	6,41 a	6,63 a	6,29 a	7,21 a
B	5,92 a	6,49 a	5,92 a	6,81 a
C	6,30 a	6,72 a	6,16 a	7,33 a
D	6,60 a	7,00 a	6,77 a	7,57 a
E	6,38 a	7,25 a	7,02 a	7,88 a
A	$\bar{Y} = 6,64$			
B	$\bar{Y} = 6,29$			
C	$\bar{Y} = 6,63$			
D	$\hat{Y} = 6,48012 + 0,00517242*D$ ($R^2 = 0,6638$)			
E	$\hat{Y} = 6,35777 + 0,00794973*D$ ($R^2 = 0,7292$)			
CV (Parcelas) = 11,97%			CV (Subparcelas) = 14,08%	

^a Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

¹ Textura 3 = TXFRIA (friabilidade), TXGRAN (granulosidade) e TXRUGO (rugosidade).

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 17 – Médias da textura dureza (TXDURE)¹ em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação.

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30	60	120	180
A	1,83 a	2,33 a	2,83 a	2,83 a
B	1,83 a	2,67 a	3,00 a	3,17 a
C	2,00 a	2,83 a	3,67 a	2,83 a
D	2,17 a	2,83 a	2,67 a	3,17 a
E	2,33 a	2,83 a	3,00 a	3,33 a
A	$\hat{Y} = 1,3333 + 0,0167^{**}D$, para $30 \leq D \leq 90$ $\bar{Y} = 2,8333$, para $90 \leq D \leq 180$			
B	$\hat{Y} = 1 + 0,0278^{**}D$, para $30 \leq D \leq 75$ $\bar{Y} = 3,0333$, para $75 \leq D \leq 180$			
C	$\hat{Y} = 1,5833 + 0,0179^{**}D$, para $30 \leq D \leq 70$ $\bar{Y} = 2,8333$, para $70 \leq D \leq 180$			
D	$\hat{Y} = 1,5 + 0,0222^{**}D$, para $30 \leq D \leq 63,75$ $\bar{Y} = 2,9167$, para $63,75 \leq D \leq 180$			
E	$\hat{Y} = 2,29261 + 0,0059322^{**}D$ ($R^2 = 0,8969$)			
CV (Parcelas) = 27,90%		CV (Subparcelas) = 31,39%		

^a Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

* Significativo pelo teste t ($P < 0,05$).

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

¹ TXDURE (textura dureza).

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 18 – Médias da textura sequidade (TXSEQD)¹ em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30	60	120	180
A	1,67 a	3,50 a	4,17 a	3,50 a
B	2,00 a	3,83 a	4,17 a	3,67 a
C	2,17 a	4,17 a	3,33 a	3,67 a
D	2,17 a	3,33 a	4,00 a	3,83 a
E	2,50 a	3,17 a	3,83 a	4,17 a
A	$\hat{Y} = -0,1667 + 0,0611^{**}D$, para $30 \leq D \leq 65,4545$ $\bar{Y} = 3,8333$, para $65,4545 \leq D \leq 180$			
B	$\hat{Y} = 0,1667 + 0,0611^{**}D$, para $30 \leq D \leq 61,3636$ $\bar{Y} = 3,9167$, para $61,3636 \leq D \leq 180$			
C	$\hat{Y} = 0,1667 + 0,0667^{**}D$, para $30 \leq D \leq 50$ $\bar{Y} = 3,5$, para $50 \leq D \leq 180$			
D	$\hat{Y} = 1 + 0,0389^{**}D$, para $30 \leq D \leq 75$ $\bar{Y} = 3,9167$, para $75 \leq D \leq 180$			
E	$\hat{Y} = 2,37006 + 0,0107345^{**}D$ ($R^2 = 0,9334$)			
CV (Parcelas) = 17,58%		CV (Subparcelas) = 22,25%		

^a Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

¹ TXSEQD (textura sequidade).

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Em relação aos parâmetros de sabor (Quadros 19 e 20), todos os controles de temperatura apresentaram valores semelhantes ($P > 0,05$) em todos os períodos de maturação. Para o sabor 1 houve aumento ($P < 0,01$) dos escores em relação aos períodos de maturação, mostrando que os valores dos parâmetros sabor salgado (SBSALG), sabor leite fresco (SBLTFS), sabor ácido (SBACID), sabor persistente (SBPERS) e sabor global (SBGLOB) aumentaram e que os valores do sabor doce (SBDOCE) diminuíram. Essa manifestação foi benéfica para a melhoria do sabor, pois aos 180 dias a grande maioria destes parâmetros se aproximou dos padrões (Quadro 5). Para o sabor 2, representado pelo sabor picante (SBPICA), a análise da regressão não acusou ($P > 0,05$) efeito dos períodos de maturação, o que está de acordo com os dados apresentados para 30 e 180 dias (Quadros 2 e 5), que acusaram ($P < 0,05$) diferenças em relação ao padrão. Desse modo, pode-se concluir que o parâmetro sabor picante (SBPICA) está abaixo do desejado e não foi corrigido por todos os controles de temperatura ao longo de 180 dias de maturação. Pode-se observar, no Quadro 19, que os valores maiores foram atribuídos aos queijos que apresentaram maior temperatura durante a maturação, confirmando que a temperatura é um fator fundamental para aumentar a proteólise e, conseqüentemente, favorecer o sabor (FOX et al., 1996; YAZICI e DERVISOGLU, 2002).

Quadro 19 – Médias do fator sabor 1¹ em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30	60	120	180
A	2,49 a	3,66 a	4,38 a	4,74 a
B	2,36 a	3,80 a	4,10 a	4,90 a
C	2,48 a	4,07 a	3,95 a	4,86 a
D	3,14 a	4,10 a	4,35 a	5,04 a
E	2,90 a	4,21 a	4,54 a	5,28 a
A	$\hat{Y} = 2,4658 + 0,013855^{**}D$ ($R^2 = 0,8672$)			
B	$\hat{Y} = 2,35556 + 0,0147002^{**}D$ ($R^2 = 0,8468$)			
C	$\hat{Y} = 2,5958 + 0,0127842^{**}D$ ($R^2 = 0,7343$)			
D	$\hat{Y} = 3,06815 + 0,0111912^{**}D$ ($R^2 = 0,8882$)			
E	$\hat{Y} = 2,88498 + 0,0138131^{**}D$ ($R^2 = 0,8597$)			
CV (Parcelas) = 9,79%		CV (Subparcelas) = 13,34%		

^a Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

^{**} Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

¹ Sabor 1= SBSALG (sabor salgado), SBLTFS (sabor a leite fresco), SBACID (sabor ácido), SBDOCE (sabor doce), SBPERS (sabor persistente) e GLOBAL (sabor global).

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

Quadro 20 – Médias do sabor¹ picante (SBPICA) em relação aos controles de temperatura e períodos de maturação

CT ²	Período de Maturação (dias)			
	30	60	120	180
A	1,04 a	0,80 a	1,73 a	1,12 a
B	1,09 a	1,05 a	2,45 a	1,14 a
C	1,40 a	1,21 a	2,86 a	1,35 a
D	1,29 a	1,29 a	2,79 a	1,32 a
E	1,87 a	1,33 a	2,38 a	1,59 a
A	$\bar{Y} = 1,17$			
B	$\bar{Y} = 1,43$			
C	$\bar{Y} = 1,70$			
D	$\bar{Y} = 1,68$			
E	$\bar{Y} = 1,78$			
CV (Parcelas) = 41,82%			CV (Subparcelas) = 59,18%	

^a Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

¹ Sabor picante (SBPICA).

² Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

3.4. Análise discriminante

No Quadro 21, observou-se uma formação de grupos com base nos controles de temperatura e nos períodos de maturação. Estes grupos foram colocados de maneira induzida (BÁRCENAS et al., 1999), conforme as temperaturas a que estavam submetidos os queijos, obtendo-se acerto total de 91,67%, mostrando que os grupos G1 (D30, E30, A60, B60 e C60), G2 (D60, E60 e A120) e G3 (E120 e A180) apresentaram diferentes características entre si e similaridade dentro deles. POWERS (1982) utilizou esta análise em equipes de julgadores treinados e com ampla experiência, e a percentagem de acertos na classificação final foi de 80%. Daí a importância de utilizar degustadores treinados para o tipo de análise ADQ (AMERINE et al., 1965).

Quadro 21 – Análise discriminante dos controles de temperatura (A, B, C, D e E)¹ com base em seis avaliadores, referentes a 26 características

Classificação					
Antes	Após			Acertos	
G1 (D30 ¹ , E30, A60, B60 e C60)	G1	G2	G3	91,67%	
	26	4	0		
	30	(86,67%)	(13,33%)		
	(0%)				
	G2 (D60, E60 e A120)	1	17		0
	18	(5,56%)	(94,44%)		(0%)
G3 (E120 e A180)	0	0	12		
12	(0%)	(0%)	(100%)		
Total	27	21	12	60	

¹ Controles de temperatura: A = 10 °C até 180 dias; B = 10 °C até 60 dias e 15 °C de 60 até 180 dias; C = 10 °C até 60 dias, 15 °C de 60 até 120 dias e 10 °C de 120 até 180 dias; D = 15 °C até 60 dias e 10 °C de 60 até 180 dias; e E = 15 °C até 180 dias.

4. CONCLUSÕES

A análise sensorial é uma ciência que se encontra muito desenvolvida e resulta em particular interesse para produtos típicos, como os oriundos de DOP. Seus campos de aplicação são muito diversos, e ela é de suma importância na caracterização dos produtos, fazendo com que ocorra um controle de qualidade efetivo, além de favorecer as defesas das particularidades dos produtos diante das imitações.

Os resultados das análises sensoriais obtidos da ADQ permitiram investigar o comportamento do queijo Zamorano DOP com relação às modificações de temperaturas no processo de aceleração de maturação, avaliando os parâmetros visuais, aroma, textura e sabor, possibilitando assim aplicar este processo com fins lucrativos, pois este queijo, que hoje é comercializado aos 100 dias, poderá alcançar aos 60 dias o mesmo efeito, sem alterar as suas qualidades sensoriais, especialmente no *flavor*. Esse resultado foi comprovado por meio da análise discriminante obtida para o grupo G2 (D60, E60 e A120).

A ADQ aplicada aos grupos treinados mostrou a importância da avaliação do queijo no sentido de manter o padrão de qualidade estipulado pelo Conselho de Denominação Protegida para este tipo de queijo, podendo tornar este produto mais competitivo e a indústria alcançar maiores benefícios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALONSO, L.; RAMOS, M.; MARTÍN-ALVAREZ, P.J.; JUÁREZ, M. Application of stepwise discriminant analysis to parameters for characterizing frozen Cabrales cheeses. **Journal of Dairy Science**, 70:905-908, 1987.
2. AMANTEA, G.F.; SHURA, B.J.; NAKAI, S. Culture effect on ripening characteristics and rheological behavior of Cheddar cheese. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, 21:229-234, 1986.
3. AMERINE, A.; PANGBORN, R.M.; ROESSLER, E.B. **Principles of Sensory Evaluation of Food**, Academic Press Inc., 1965. 602p.
4. BÁRCENAS, P.; ELORTONDO, F.J.P.; SALMERÓN, J.; ALBISU, M. Development of a preliminary sensory lexicon and standard references for ewes milk cheeses aided by multivariate statistical procedures. **Journal Sensory Studies**, 14:161-179, 1999.
5. BÁRCENAS, P.; PÉREZ F.J.; SALMERÓN, J.; ALBISU, M. Tratamiento estadístico de datos sensoriais. **Revista Alimentacion, Equipos y Tecnologia**, 6:59-65, 2000.
6. CEPEDA, A.; PASEIRO, P.; LÓPEZ de ALDA, M.L.; RODRIGUEZ OTERO, J. L. Intento de tipificación de distintos tipos de quesos gallegos comerciales mediante análisis discriminante. **Revista Alimentaria**, 213:25-27, 1990.
7. CHAPMAN, K.W.; LAWLESS, H. T.; BOOR K. J. Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultrapasteurized milk, **Journal of Dairy Science**, 84:12-20, 2001.
8. DEWETTINCK, K.; DIERCKX, S.; EICHWALDER, P.; HUYGHEBAERT, A. Comparison of SDS-PAGE profiles of four Belgian cheeses by multivariate statistics. **Lait**, 77:77-89, 1997.
9. EL SODA, M. Control and enhancement of flavour in cheese. In: LAW, B.A. **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Blackie Academic & Professional, New York. p. 219-246. 1997.
10. ELORTONDO, F.J.P.; BÁRCENAS, E.P.; ALBISU, A.M. Análisis sensorial en quesos con denominación de origen. **Revista Alimentaria**, 155:165-167, 2000.
11. FARKYE, N.Y.; FOX, P.F. Objective indices of cheese ripening. **Trends Food Science Technology** 1:37-40, 1990.
12. FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; LÓPEZ-FANDINO, R. Accelerated ripening of ewe's milk cheeses. **Revista Espanhola de Ciencia eTecnologia Alimentos**, 34:353-367, 1994.
13. FOLKERTMA, B.; FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. **International Dairy Journal**, 6:1117-1134, 1996.
14. FOX, P.F.; LAW, J.; MCSWEENEY, P.L.H.; WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. Vol.1. New York, Chapman and hall, p.389-438, 1993.
15. FOX, P.F.; WALLACE, J.M.; MORGAN, S.; LYNCH, C.M.; NILAND, E.J.; TOBIN, J. Acceleration of cheese ripening. **Antoine Van Leeuwenhoek**, 70:271-297, 1996.
16. GODWIN, D.R.; WASHAM, C.J.; POWERS, J.J. A selection of blue cheese quality descriptors by sensory evaluation. **Journal of Dairy Science**, 60(suppl.1), 42, 1977.
17. GRAPPIN, R.; RANK, T.C.; OLSON, N.F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. **Journal of Dairy Science**, 68:531-540, 1985.
18. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION FIL-IDF, 261. List of criteria for evaluation of accelerated ripening of cheese. **Bulletin IDF**, 1991.

19. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. FIL-IDF, 50B. milk and milk products. Methods of Sampling. **Bulletin IDF** Brussels, 1985.
20. JOHNSON, R.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis englewood cliffs**, N.J.: Prentice-hai, 1988. 607p.
21. LUCISANO, M.; CASIRAGHI, E.; POMPEI, C; DELLEA, C. Characterization of Provolone cheese. II. Proposal for a quality control procedure. **ITAL Journal Food Science**, 3:113-125, 1991.
22. MAPA. Ordem de 6 de mayo de 1993 por la que se aprueba el reglamento de la denominación de origem “ Queso Zamorano” y de su Consejo Regulador. **B.O.E. Nº 120 de 20 de mayo de 1993**, pag. 15311-15316.
23. MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 2 .ed., Florida, USA, CRC Press, 1991. 354p.
24. MODESTA, R.C.D. **Manual de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Tomo I – Geral, EMBRAPA, C.T.A.A., R. J., 1994.
25. MOSKOWITZ, H.R. **Quantitative descriptive analysis**. In. Applied Sensory Analysis of Foods. Chapter 3, Vol I, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1988. 259p.
26. MURRAY, J.M.; DELAHUNTY, C.M.; BAXTER, I.A. Descriptive sensory analysis: past, present and future. **Food Research International**, 34:461-471, 2001.
27. ORDÓÑEZ, A.I.; IBANEZ, F.C.; TORRE, P.; BARCINA; PEREZ-ELORTONDO, F.J. Application of multivariate análisis to sensory characterization of ewes’ milk cheese. **Journal Sensory Studies**, 13:45-55.
28. POMAR, E.; PRIETO, B.; FRANCO, I.; TORNADIJO, M.E.; FRESNO, J.M.; GONZÁLEZ, J. Caracterizacion quimica y fisico-quimica del queso Zamorano con Denominación de Origen. **Anais do Congresso**, Porto, Portugal, maio de 2001.
29. POWERS, J.J. Sensory-instrumental correlations, review and appraisal. **Lebensm Technol** 15(1):6-12,1982.
30. RESSURECIÓN, A.V.A. Applications of multivariate analysis methods in food quality evaluation. **Food Technology**, Nov., 1988.
31. RIBEIRO JÚNIOR, J.I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2001, 301p.
32. STEELE, J.L.; ÜNLÜ, G. Impact of lactic acid bacteria on cheese flavor development. **Food Technology**, p.128-135, november, 1992.
33. WILKINSON, M.G. Acceleration of cheese ripening In: FOX, P.F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. Vol.1. New York, Chapman and hall, p.523-555, 1993.
34. YAZICI, F.; DERVISOGLU, M. Effect of pH adjustment on some chemical, biochemical, and sensory properties of Civil cheese during storage. **Journal of Food Engineerin**, xxx, article in press, 8p, 30 may de 2002.

CONCLUSÕES

Pelos resultados apresentados, concluiu-se que a aceleração da maturação por modificações da temperatura demonstrou bons resultados nas características microbiológicas, físico-químicas, químicas, bioquímicas, bem como nos parâmetros reológicos e sensoriais, principalmente naqueles controles de temperatura nos quais os queijos foram submetidos à maior temperatura de maturação (15 °C).

A análise dos queijos quanto à evolução da microbiota demonstrou crescimento inicial do grupo de lactococos, e, com a diminuição deste, houve aumento da flora de lactobacilos ao longo da maturação. Estes microrganismos, por meio do seu sistema enzimático, contribuíram para a degradação de compostos nitrogenados solúveis importantes na proteólise do queijo. O efeito da temperatura foi notado especialmente pela presença de *Lactobacillus* ssp., principalmente naqueles queijos que foram submetidos a maior temperatura de maturação.

Pelos valores dos índices de proteólise, extensão (NS/NT) e profundidade (NNP/NS), foi possível monitorar a proteólise do queijo Zamorano DOP, concluindo-se que estes índices foram maiores nos queijos submetidos a temperaturas mais elevadas durante a maturação. Também foi observado que nos queijos maturados a 15 °C obtiveram-se em 63 dias os mesmos valores quando comparados aos queijos maturados a 10 °C por 100 dias. Portanto, estes queijos maturados a 15 °C podem ser comercializados 37 dias antes do prazo previsto pelo MAPA (1993), apresentando as mesmas características proteolíticas dos queijos maturados tradicionalmente.

Apesar de o aumento da temperatura ser de apenas 5 °C, significativa influência ocorreu nas frações da caseína, proporcionando evidente degradação para a formação de peptídeos maiores, peptídeos menores e aminoácidos, ao longo dos períodos de maturação. Quando comparada a degradação da fração β -caseína com as α_s -caseínas, as últimas sofreram maiores degradações, principalmente no controle de temperatura a 15 °C para todos os períodos de

maturação, sendo mais pronunciada nos primeiros dias, provavelmente pela influência do coalho e do aumento da temperatura da maturação.

Os aminoácidos que mais contribuíram para o *flavor* durante a maturação foram ácido glutâmico, leucina, glicina e prolina. A maior quantidade individual de aminoácido foi obtida no queijo mantido a 15 °C. Este estudo foi importante para avaliar as variações de temperatura no controle da maturação do queijo, acelerando ou retardando o processo de proteólise, bem como intensificando o *flavor* do queijo.

Por meio da análise do perfil da textura (TPA) foi possível observar que o aumento de temperatura de 10 para 15 °C, aplicado de diferentes formas nos controles de temperatura dos queijos, não foi suficiente para alterar as características de textura, pois estas foram influenciadas pelos períodos de maturação.

A análise dos queijos pela TPA está correlacionada com outras características, mostrando que as modificações de textura que ocorreram na massa do queijo foram influenciadas pela concentração de sal na umidade, pela umidade e pela degradação de proteínas, principalmente com os parâmetros de dureza, fraturabilidade e elasticidade.

Conforme os resultados encontrados, deduziu-se que, quanto maior a temperatura de maturação, maior a aceleração da proteólise e, conseqüentemente, menor o período de maturação. Estes resultados sugerem que a ação do coalho teve maior influência, seguido pelas proteinases e peptidases de *Lactococcus* e de *Lactobacillus*, presentes no queijo Zamorano DOP ao longo da maturação. As proteinases nativas do leite contribuíram para a proteólise, mas, pelo que se percebeu, menos que as enzimas coagulantes e as enzimas dos microrganismos. Nos aspectos das análises reológicas e sensoriais, estas se apresentaram bem correlacionadas, indicando a importância e a qualidade destes métodos no monitoramento do queijo no decorrer dos períodos de maturação.

Os resultados das análises sensoriais obtidos através da Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) permitiram investigar o comportamento do queijo Zamorano DOP com relação às modificações de temperatura no processo de aceleração de maturação, através da avaliação dos parâmetros visuais, aroma,

textura e sabor. Este método pode ser aplicado com fins lucrativos, pois estes queijos podem ser comercializados sem alterar as qualidades sensoriais, especialmente do *flavor*. A ADQ mostrou a importância dos grupos treinados na avaliação do queijo para manter a sua qualidade e as suas características, objetivo ímpar do Conselho Regulador de DOP.

Os resultados obtidos são de interesse econômico. Há possibilidade de aplicação desta tecnologia em outros tipos de queijo brasileiros, principalmente para acelerar a proteólise e, ainda, possibilitar o surgimento do mercado para queijos de ovelha no Brasil.