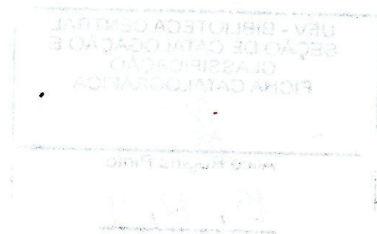


GERUZA DIAS

**MICROFILTRAÇÃO COMO ALTERNATIVA NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS COM
OLHADURAS E UTILIZAÇÃO DA FASE AQUOSA PARA AVALIAÇÃO DE SUAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS**

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
2011



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

T

D541m
2011

Dias, Geruza, 1981-

Microfiltração como alternativa na produção de queijos com olhaduras e utilização da fase aquosa para avaliação de suas características físico-químicas / Geruza Dias. – Viçosa, MG, 2011.

xiii, 87f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Mauro Mansur Furtado.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 70-86,

1. Queijo. 2. *Clostridium* sp. 3. Filtração por membrana.
4. Membranas (Tecnologia). I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 638.354

GERUZA DIAS

**MICROFILTRAÇÃO COMO ALTERNATIVA NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS COM
OLHADURAS E UTILIZAÇÃO DA FASE AQUOSA PARA AVALIAÇÃO DE SUAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS**

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: 15 de setembro de 2011.



Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Coorientador)



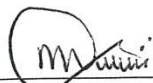
Prof.ª Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira
(Coorientadora)



Prof. José Manoel Martins



Prof.ª Luciana Oliveira de Fariña



Mauro Mansur Furtado
(Orientador)

A Deus que me fortalece e está comigo em todos os momentos.
Aos meus pais, Epaminondas e Graça pelo exemplo de vida, incentivo e amor.
Aos meus irmãos, Aristides e Glauce pelo apoio, amizade e companheirismo.
As minhas sobrinhas Maria Paula e Ana Laura, fonte de inspiração.
Ao meu namorado, Ernane, por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por iluminar meu caminho e me conceder paz e saúde para realizar meus projetos de vida.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a seguir a carreira acadêmica, muito obrigada por todo amor, carinho e dedicação.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de continuar o aperfeiçoamento de meus estudos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

Ao professor Mauro Mansur Furtado, pela oportunidade, orientação, amizade e valiosa colaboração.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho pela coorientação e apoio fundamental durante a execução do trabalho.

A Professora Célia Lúcia de L. F. Ferreira pela coorientação, amizade e ensinamentos compartilhados.

Ao Professor Jean-Louis Maubois pela coorientação, apoio, amizade e ensinamentos que muito contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico.

Aos professores José Manoel e Luciana Fariña pela participação na banca, amizade e pelos conselhos dados.

Ao professor Nerilson que colaborou de forma imensurável nas análises estatísticas deste trabalho.

Ao professor José Carlos Gomes, pelos conhecimentos e pela experiência transmitida.

A toda minha família, em especial meus queridos irmãos, Aristides e Glauce e meus cunhados, Thiago e Manoela pela amizade e carinho.

Ao meu namorado, Ernane, por todos os momentos compartilhados, pelo carinho, compreensão e ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao Múcio Mansur Furtado, por toda atenção dedicada, conselhos e orientações na fabricação dos queijos.

Ao Laticínios FUNARBE, por disponibilizar a indústria para fabricação e maturação dos queijos e pela contribuição de seus funcionários, em especial, Maria Helena, Setenta e André.

A FIOCRUZ por disponibilizar os micro-organismos NSLAB utilizados neste trabalho.

As estudantes Kátia, Karina, Márcia, Renam e Emílio que muito me ajudaram na fabricação e análises laboratoriais.

À Maria Betânia, pela cumplicidade e amizade, obrigada por ter abraçado comigo esse projeto.

A toda equipe do Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelo companheirismo e incentivo.

Ao Osvaldo, pela amizade e grande ajuda na fabricação dos queijos.

As amigas, Camila, Suzana, Luana, Flávia, Bruna, Patrícia, Roberta, Kátia e Carol pela amizade e momentos de muita alegria que vivemos juntas.

Enfim, a todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

GERUZA DIAS, filha de Epaminondas Raimundo Dias e Maria das Graças Fialho Dias, nasceu em São Paulo – SP, em 10 de março de 1981, e logo se mudou com a família para Viçosa – MG, onde residi.

Entre 2001 e 2005, cursou Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG, e, após concluir o curso, ingressou no mesmo ano, no programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado. Atuando na área de Tecnologia e Inovação de Leite e derivados, mais especificamente na linha de Tecnologia de Queijos, submeteu-se à defesa de dissertação em Agosto de 2007. No mesmo ano, ingressou no Programa de Pós Graduação, também do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em nível de Doutorado, pela Universidade Federal de Viçosa. Atuando na área de Tecnologia e Inovação de Leite e derivados, mais especificamente na linha de Tecnologia de Queijos e Processo de Separação por Membranas, submeteu-se à defesa da tese em setembro de 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	2
1.1.1. Objetivo geral	2
1.1.2. Objetivos específicos	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Processos de Separação por Membranas	4
2.1.1.Histórico.....	5
2.1.2.Métodos de filtração	6
2.1.3. Classificação de processos.....	7
2.1.4. Configuração das membranas	8
2.1.5. Parâmetros operacionais	9
2.1.6. Aplicação da microfiltração na indústria de laticínios.....	12
2.1.6.1. Aplicação de microfiltração na indústria de queijos.....	13
2.1.7. Remoção de bactérias	14
2.2. A microbiota dos queijos.....	15
2.2.1.Cultura iniciadora (<i>starter</i>)	15
2.2.2. Cultura secundária	18
2.2.2.1Bactérias lácticas não <i>starter</i> (NSLAB).....	19
2.2.2.2. Bactérias propiônicas.....	22

2.2.2.3. Fungos filamentosos	24
2.2.2.4. Leveduras.....	25
2.3. Defeitos nos queijos com olhaduras	26
2.3.1. Estufamento tardio de queijos duros e semiduros	26
2.4. Sistema de pasteurização	29
2.5. Fase aquosa do queijo.....	30
2.5.1. Histórico.....	31
2.5.2. Desenvolvimento do método de extração	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Culturas iniciadoras	34
3.2 Culturas NSLAB.....	34
3.1. Tecnologia de fabricação.....	35
3.4. Extração da fase aquosa do queijo com olhaduras	37
3.5. Análises físico-químicas no leite.....	38
3.5.1. Determinação de acidez titulável, gordura, pH e proteína.....	38
3.6 Análises realizadas no queijo	38
3.6.1 Determinação da atividade de água	38
3.6.2 Acidez titulável	38
3.6.3. Determinação de gordura.....	39
3.6.4. Determinação de gordura no extrato seco.....	39
3.6.5. Extensão de maturação	39
3.6.6. Profundidade de maturação	39
3.7. Análises realizadas no queijo e na fase aquosa	40
3.7.1. Cloreto de sódio	40
3.7.2. Determinação de umidade e extrato seco	40
3.7.3. Cinzas.....	41
3.7.4. pH.....	41
3.7.5. Proteína total	41
3.7.6. Nitrogênio Solúvel em pH 4,6 (NCN) e Nitrogênio Solúvel em TCA 12 % (NPN).....	41
3.7.7. Análises de ácidos orgânicos	42
3.8. Análises microbiológicas no leite.....	42

3.8.1. Contagem de micro-organismos mesófilos e anaeróbicos facultativos	43
3.8.2. Contagem de coliforme a 30°C e <i>Escherichia coli</i>	43
3.8.3. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
3.8.4. Presença de esporulados	43
3.9. Análises microbiológicas no creme	43
3.9.1. Contagem de micro-organismos mesófilos e anaeróbicos facultativos	43
3.9.2. Contagem de coliforme 30°C e <i>Escherichia coli</i>	44
3.9.3. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
3.9.4. Presença de esporulados	44
3.10. Análises microbiológicas no queijo	44
3.10.1. Contagem de coliforme 30°C e <i>Escherichia coli</i>	44
3.10.2. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	45
3.10.3. Presença de <i>Salmonella</i> sp.	45
3.10.4. Presença de <i>Listeria monocytogenes</i>	45
3.10.5. Presença de esporulado	45
3.11. Avaliação sensorial	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5. CONCLUSÃO	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO - Modelo de ficha de avaliação para os testes de aceitação para os atributos sabor, textura e impressão global.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

APHA - American Public Health Association

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion

CLAE - Cromatografia de Alta Eficiência

LDR - Leite Desnatado Reconstituído

MRS - Man Rogosa Sharpe

M - Queijo Produzido com Leite Microfiltrado

MC - Queijo Produzido com Leite Microfiltrado Adicionado de Cultura NSLAB.

NSLAB - Bactérias Láticas não *Starters*

NCN- Nitrogênio não Caseínico

NPN- Nitrogênio não Proteico

NT- Nitrogênio Total

RCM - Reinforced Clostridial Agar

PSM - Processo de Separação por Membranas

P - Queijo Produzido com Leite Pasteurizado

PC - Queijo Produzido com leite Pasteurizado Adicionado de Cultura NSLAB.

UTP - Pressão Transmembrana Constante

RESUMO

DIAS, GERUZA, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2011. **Microfiltração como alternativa na produção de queijos com olhaduras e utilização da fase aquosa para avaliação de suas características físico-químicas.** Orientador: Mauro Mansur Furtado. Coorientadores: Antônio Fernandes de Carvalho e Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira.

A produção de queijos com olhaduras tem crescido muito no Brasil e um dos principais problemas de fabricação é a ocorrência de estufamento tardio. Com a finalidade de resolver esta questão, queijos com olhaduras foram produzidos a partir de leite microfiltrado, com objetivo de eliminar micro-organismos contaminantes e esporos de *Clostridium* spp. Foram avaliadas suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Uma vez que na fase aquosa acumulam-se produtos hidrossolúveis resultantes do metabolismo bacteriano de reações enzimáticas, avaliaram-se também as mesmas características físico-químicas nessa fase e no queijo. Verificou-se também o papel da adição de NSLAB, *Lactobacillus rhamnosus* e *Enterococcus durans* no componente de sabor e na textura do queijo feito com leite microfiltrado. O leite foi microfiltrado em membrana cilíndrica tubular com fluxo de 120l/h e tamanho de poro de 1,4µm. Nos tratamentos foram adicionadas *Propionibacterium freudenreichii* e culturas iniciadoras *Lactobacillus helveticus*, *S. thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. O experimento constou de quatro tratamentos: queijo com olhaduras a partir de leite pasteurizado (P); queijo com olhaduras a partir de leite pasteurizado adicionado de cultura NSLAB (PC); queijo com olhaduras a partir de leite microfiltrado (M); e queijo com olhaduras a partir de leite microfiltrado adicionado de cultura NSLAB (MC). Foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas no leite e no queijo e análises físico-químicas na fase aquosa. As análises físico-químicas nos queijos e na fase aquosa foram feitas em

quatro estágios de maturação, 2, 15, 45 e 60 dias. Realizou-se teste de aceitação aos 60 dias de maturação. Os resultados das análises de umidade, extrato seco, cloreto de sódio, cinzas, proteína, nitrogênio não proteico e nitrogênio não caseínico realizadas na fase aquosa e nos queijos diferiram ($P < 0,05$) quanto ao tempo de maturação e não diferiram ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Dos ácidos orgânicos analisados, apenas os teores de ácido butírico da fase aquosa e dos queijos fabricados com leite microfiltrado obtiveram diferenças ($P < 0,05$) em relação àqueles fabricados com leite pasteurizado, indicando que a microfiltração foi eficiente na eliminação de *Clostridium* spp, micro-organismos responsáveis pela produção de ácido butírico. O processo de microfiltração foi eficiente na eliminação de micro-organismos deterioradores do leite incluindo os esporos de *Clostridium* spp.. Todos os queijos apresentaram ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. e a contagem de coliforme 30 e 45°C e *S. aureus* manteve-se dentro dos limites máximos da legislação vigente. A análise sensorial demonstrou quanto ao atributo sabor, que o tratamento MC obteve maior média ($P < 0,05$), ficando entre gostei moderadamente e gostei muito, e o tratamento PC obteve a segunda maior nota, não diferindo ($P > 0,05$) dos tratamentos P e M. Considerando-se o atributo textura, o tratamento P obteve a maior média, ficando entre gostei moderadamente e gostei muito, diferindo ($P < 0,05$) do tratamento M. Já os tratamentos M e MC não diferiram entre si ($P > 0,05$). No atributo impressão global, não houve influência ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Os queijos feitos neste experimento foram os primeiros elaborados com esta tecnologia no país e pelos resultados promissores obtidos, poderão incentivar as indústrias a utilizar essa tecnologia para a elaboração de queijos de longa maturação, com manutenção de suas características originais, reduzindo significativamente os prejuízos causados pelo emprego do leite pasteurizado, que não elimina a presença das bactérias do gênero *clostridium*.

ABSTRACT

DIAS, GERUZA, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September 2011. **Microfiltration as an alternative in production of the cheeses with eyes and utilization of the aqueous phase for evaluation of their physiochemical characteristics.** Adviser: Mauro Mansur Furtado. Co-advisers: Antônio Fernandes de Carvalho and Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira.

The production of cheeses with eyes has been increasing in Brazil and one of the main problems is the occurrence of late blowing. To study this problem, cheeses with eyes were produced from microfiltered milk in order to eliminate common contaminating microorganisms and spores of *Clostridium*. Cheese physiochemical, microbiological and sensorial characteristics were evaluated. Since the aqueous phase accumulates hydrosoluble products resulting from bacterial metabolism and enzymatic reactions, the same physiochemical characteristics were evaluated in that phase and in the cheese, as well. The role of NSLAB *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus durans* in the flavor development and in the texture of the cheese made from microfiltered milk was also verified. The milk was microfiltered in a tubular cylindrical membrane with 120l/h flow and 1.4 μ m pore size. In all treatments. *Propionibacterium freudenreichii* and starter cultures *Lactobacillus helveticus*, *S. thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* were added. The experiment consisted of four treatments: cheeses with eyes from pasteurized milk (P); cheeses with eyes from pasteurized milk added with NSLAB culture (PC); cheeses with eyes from microfiltrated milk (M) and cheeses with eyes from microfiltrated milk added with NSLAB culture (MC). Physiochemical and microbiological analyses were accomplished in milk and cheese. In the aqueous phase only physiochemical analyses were carried out. The physiochemical analyses in cheeses and aqueous phase were accomplished at four ripening phases, such as 2, 15, 45 and 60 days. The acceptance test was performed at 60 days of ripening. The analytical results for moisture, dry matter, sodium chloride,

ashes, protein, nonprotein nitrogen and noncaseinic nitrogen obtained in the aqueous phase and in the cheeses differed ($P < 0.05$) for ripening time, but did not differ ($P < 0.05$) among treatments. Among the analyzed organic acids, only butyric acid contents in aqueous phase and in the cheeses manufactured with microfiltered milk showed differences ($P < 0.05$) compared to results from cheeses manufactured with pasteurized milk, indicating that microfiltration was efficient in eliminating milk deteriorating microorganisms, including spores of *Clostridium spp.* which are responsible for the production of butyric acid. All cheeses presented absence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella sp.* and 30 and 45°C coliform groups and *S. aureus* stayed within the maximum limits of the current legislation. Concerning flavor assessment, the sensorial analysis demonstrated that the MC treatment obtained the highest average ($P < 0.05$), as being between “I liked moderately” and “I liked very much”, and the PC treatment obtained the second higher score, therefore not differing ($P > 0.05$) from the treatments P and M. Concerning texture development, the treatment P obtained the highest average, as being between ‘I liked moderately’ and ‘I liked very much’, differing ($P < 0.05$) from treatment M. The treatments M and MC did not differ between themselves ($P > 0.05$). Concerning the global feeling, no influence occurred ($P > 0.05$) among treatments. Cheeses made in this experiment were the first ones elaborated with this technology in the country. The promising results obtained will motivate the industries to use this technology for the elaboration of long-ripened cheeses keeping their original characteristics as well as significantly reducing losses caused by the use of the pasteurized milk, which does not eliminate the presence of the *Clostridium spp.*

1. INTRODUÇÃO

A produção de queijos no Brasil é de aproximadamente 650 mil toneladas anuais, com crescimento de 141 % nos últimos cinco anos. Este crescimento para queijos com olhaduras foi de até 213 % nos últimos cinco anos com produção de 12.000 mil toneladas ao ano (ABIQ, 2011).

Um grande problema tecnológico de fabricação de queijo de longa maturação no Brasil é a ocorrência de estufamento tardio causado por esporos presentes no leite. Este defeito é caracterizado pela ocorrência de grandes aberturas ou trincas no queijo, geralmente acompanhado de sabores e odores indesejáveis, em consequência de gases e compostos produzidos pela multiplicação de bactérias do gênero *Clostridium*, esporulados que resistem ao processo de pasteurização do leite. Tais defeitos devem-se à má qualidade do leite.

O principal causador do estufamento tardio em queijos de longa maturação são *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum* e o *Clostridium sporogenes*, que são encontrados na natureza, sobretudo nos solos, na terra, na poeira e, com muita frequência, nas forragens usadas no preparo da silagem. O *Clostridium tyrobutyricum* multiplica muito rapidamente e pode contaminar o leite.

A adição de nitrato de potássio no leite destinado à produção de queijo é um método eficaz de controle do estufamento tardio. Contudo, o uso desse conservante tem sido combatido em vários países pelo presumido risco de formação de compostos carcinogênicos.

A microfiltração tem sido recomendada para eliminar a presença de bactérias contaminantes indesejáveis em queijos. O uso de membranas com tamanho dos poros que varia de 0,8 e 1,4 µm de diâmetro é capaz de remover até 99,5 % de esporos presentes no leite.

A microfiltração, no entanto elimina a microbiota desejável do leite, que é a responsável pela característica de flavor e de textura do queijo durante sua maturação. Para contornar esse

problema, juntamente com o fermento propiônico podem ser adicionados bactérias lácticas não *starter* (NSLAB) de composição conhecida.

Outro estudo, bastante explorado na Europa é a fase aquosa do queijo, que é o meio de crescimento dos micro-organismos que acumulam produtos hidrossolúveis resultantes do metabolismo bacteriano, assim como produtos das reações enzimáticas que dão origem às moléculas responsáveis pelo aroma e sabor do queijo.

A extração dos compostos solúveis de queijo utilizando-se água é criticada por vários autores, devido às modificações no equilíbrio físico-químico, conduzindo a resultados errôneos da forma solúvel do nitrogênio. Em estudos realizados por Thierry et al. (1998), foi observado que mais compostos foram recuperados a partir da fase aquosa do que nas amostras de queijos extraídas em água. A partir desta constatação, acredita-se que uma caracterização físico-química desta fase aquosa nas diferentes fases da maturação constitui uma metodologia importante sobre os mecanismos da maturação de queijos.

Neste trabalho foi avaliada a composição físico-química e microbiológica do queijo com olhaduras produzido com leites microfiltrados e pasteurizados com e sem adição de NSLAB e as características físico-químicas da fase aquosa extraída do queijo.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Reduzir micro-organismos contaminantes e esporos de *Clostridium* spp. presentes no leite *in natura* por meio do processo de microfiltração, de modo a obter queijo com olhaduras, com características próprias, desprovido dos defeitos ocasionados pelo estufamento tardio, causado pelas bactérias deste gênero.

1.1.2. Objetivos específicos

- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas durante o período de maturação do queijo com olhaduras fabricado com leite microfiltrado, comparando-as com aquelas do queijo com olhaduras fabricado com leite pasteurizado.

- Avaliar a produção de compostos de sabor e aroma no queijo com olhaduras fabricado com leite microfiltrado.
- Verificar os efeitos da utilização de cultura NSLAB, *Lactobacillus rhamnosus* e *Enterococcus durans*, nas características físico-químicas e sensoriais do queijo fabricado com leite microfiltrado e com leite pasteurizado.
- Avaliar as características físico-químicas da fase aquosa do queijo com olhadura fabricado a partir de leites pasteurizados e microfiltrados.
- Comparar os resultados obtidos da fase aquosa com aqueles realizados pelo método de extração tradicional do queijo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Processos de Separação por Membranas

Os processos de separação por membranas (PSM) têm deixado de serem apenas técnicas laboratoriais para serem utilizados industrialmente. Os bons resultados alcançados, principalmente nas indústrias químicas e de alimentos, permitem vislumbrar um futuro bastante promissor para essa tecnologia (MOURA, 2002).

O processo envolve a separação de componentes de um fluido através de membranas especiais, conduzindo ao fracionamento, à purificação e à concentração desses compostos. Essa separação é baseada na massa molar, na forma dos compostos e nas interações com a superfície das membranas e outros componentes da mistura (STRATHMANN, 1990).

Na prática, o mecanismo de separação ocorre devido à influência de diversos parâmetros, como: composição da membrana, configuração do equipamento, superfície da membrana, pressão, temperatura e condição de escoamento do fluido (KOSEOGLU et. al., 1991).

Quando comparada aos processos convencionais, a tecnologia de membranas apresenta a vantagem de, geralmente, ser usada à temperatura de 40 °C a 55 °C, favorecendo, portanto, a preservação de nutrientes e constituintes de sabor, importantes para a qualidade do produto final (STRATHMANN, 1990).

2.1.1. Histórico

Os primeiros trabalhos envolvendo membranas têm seu primeiro registro datado de 1748, quando o francês Nolte estudou a permeação de água através da membrana de diafragma de animal. Em seu experimento, Nolte adicionou água e um destilado de vinho em uma bexiga (membrana) de origem animal e mergulhando-a em água observou com o passar do tempo, que a bexiga se dilatava, chegando até a se romper. A partir do trabalho de Nolte puderam-se verificar as características de permeabilidade e seletividade de uma membrana, ou seja, pela diferença de potencial químico da água (dentro e fora da membrana), esta tende a migrar para o interior da membrana, alterando sua forma. Em 1906, Bechold trabalhou com nitrato de celulose para desenvolver uma técnica para obter membranas microporosas. Após aperfeiçoamento por Elford, Zsigmondy, Bachmann e Ferry, estas membranas se tornaram as primeiras a serem produzidas em escala comercial, utilizadas em microfiltração e diálise. Devido, sobretudo a problemas de fluxo, os PSM que utilizam membranas densas (sem poros) não se desenvolveram com a mesma velocidade e sucesso (FAVRE, 2004).

O conhecimento das membranas naturais vem desde a antiguidade, porém o desenvolvimento e as principais aplicações dos processos de separação com membranas sintéticas, em escala de laboratório, iniciaram-se na década de 20. As membranas sintéticas surgiram como uma tentativa de reprodução das membranas naturais, principalmente no que diz respeito às suas características particulares de seletividade e permeabilidade. A partir dos anos 30, alguns PSM passaram a ser conhecidos e utilizados em pequena escala; contudo, estes não se desenvolveram em uma escala industrial na época, em função dos baixos fluxos de permeado obtidos através da utilização de membranas com elevada espessura (BALDASSO, 2008).

A partir da década de 50 foram feitos testes para dessalinização da água. Estes testes apresentaram alta retenção de sais, embora apresentassem fluxo de permeado indesejado. Na década seguinte, Loeb e Sourirajan melhoraram o processo, desenvolvendo membranas para diversas aplicações, porém o fluxo ainda não foi significativo. Nas décadas seguintes, os PSM tiveram um avanço passando a ter caráter industrial. Para tornar os PSM mais competitivos que os processos de separação existentes, vários estudos foram feitos elucidando a seletividade, diminuindo a resistência ao transporte, com vistas ao aumento da eficiência do processo (HABERT et al., 2006).

De acordo Baldasso (2008), os PSM podem ser considerados processos de separação relativamente recentes, já que mesmo por volta de 1970, estes ainda não eram considerados processos de relevância técnica. Ultimamente, o autor afirma que os PSM têm sido utilizados para diferentes aplicações principalmente, como um processo alternativo aos processos de separação tradicionais, entre os quais a destilação, a centrifugação e a evaporação.

O processo de microfiltração foi desenvolvido em 1929 por Sartorius-Werke, na Alemanha, microfiltração é uma das tecnologias mais antigas de filtração, sendo utilizada, principalmente, para esterilização de água e bebidas (MAUBOIS, 1991).

2.1.2. Métodos de filtração

Nos processos de separação por membranas, podem ser utilizados dois métodos de filtração: a filtração convencional (*dead end filtration*) e a filtração tangencial (*crossflow filtration*). Na filtração convencional, o escoamento do fluido é perpendicular à superfície da membrana. O solvente passa pela membrana e solutos são retidos, acumulando-se próximos a superfície da membrana, no fenômeno chamado polarização de concentração (NÓBREGA et al., 2005). As partículas retidas no filtro traduzem na formação de uma “torta” na sua superfície, resultando numa diminuição considerável do fluxo de permeado, sendo necessária a interrupção do processo para a limpeza ou substituição do filtro. Nesse caso, a separação é normalmente realizada numa faixa de partículas relativamente grandes, de tamanho de 1 µm a 100 µm (PAULSON et al., 1984).

No método de filtração tangencial por membranas, o fluido escoar em paralelo à superfície da membrana, gerando duas correntes distintas: a do permeado ou filtrado, constituída de componentes de tamanho menor que o dos poros da membrana e que por eles atravessaram; e a do retentado ou concentrado, enriquecida de solutos maiores, que não passaram através da membrana e podem ser recirculados no sistema. As partículas depositadas sobre a membrana são constantemente arrastadas pela própria corrente tangencial da alimentação, permitindo a manutenção do fluxo a um patamar mais alto ao longo do tempo. A filtração tangencial permite a separação de micro partículas e pode ser usada para soluções cuja concentração de solutos é mais alta, pode-se trabalhar com maior volume de matéria-prima e operar em sistemas contínuos (PAULSON et al., 1984 e DZIEZAK, 1990).

O fluxo transversal ou tangencial na microfiltração possibilita uma tecnologia industrial da separação na indústria de laticínios com várias aplicações: (i) remoção das bactérias (TROUVÉ et al., 1991), (ii) eliminação de gordura do soro; (iii) enriquecimento micelar da caseína para fabricação de queijos; e (iv) purificação de salmoura (SABOYA e MAUBOIS, 2000).

2.1.3. Classificação de processos

Dentre os processos de separação por membranas destacam-se: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, osmose reversa, eletrodialise e pervaporação. Estes processos se diferenciam quanto à força motriz necessária para que ocorra a separação, quanto às características e propriedades das membranas e quanto a suas aplicações (SCOTT; HUGHES, 1996).

Para a indústria de alimentos, os processos de maior interesse são a microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e a osmose reversa (CARVALHO; MAUBOIS, 2010). Estes processos, cuja força motriz é a pressão, tem o método de filtração tangencial, e se diferem basicamente no tamanho médio dos poros das membranas filtrantes, o que implica a necessidade de diferentes faixas de pressão transmembrana (PORTER, 1990).

A microfiltração utiliza membranas com diâmetro de poro na faixa entre 0,1 e 12 μm e pressão de aproximadamente 0,2 a 3,45 bars (1 bar = 0,9869 atm). Dentre as diversas aplicações da microfiltração esta a retenção de partículas do leite tais como células somáticas, glóbulos de gordura, bactérias e micelas de caseína. A microfiltração também é muito utilizada na clarificação de bebidas e na filtração esterilizante de soluções sensíveis ao calor, em razão de sua excelente retenção de micro-organismos (PAULSON et al., 1984; RAUTENBACH et al., 1989 e PORTER, 1990).

No processo de ultrafiltração, o termo massa molar de corte é o mais usado para descrever a capacidade potencial de separação da membrana, que no caso é de 500 a 300.000 Daltons (CHERYAN, 1998). Neste processo, utilizam-se membranas porosas, cujo diâmetro de poro varia entre 0,01 e 0,1 μm e pressão de 3,45 a 13,8 bars (PAULSON et al., 1984; DZIEZAK, 1990 e SCOTT; HUGHES, 1996). A ultrafiltração é aplicada na fabricação de queijos e recuperação das proteínas do soro, em indústria de laticínios e na indústria de bebidas (vinho e cerveja) (PORTER, 1990 e SOARES, 2004).

A nanofiltração é um processo baseado na pressão de separação por membranas porosas com diâmetro de tamanho médio de poros até 0,001 μm (1 nanômetro). Nanofiltração retém a lactose e todos os componentes maiores do leite, mas permite a permeação de íons solúveis monovalentes e água (CARVALHO; MAUBOIS, 2009).

A osmose reversa é o processo em que o solvente atravessa uma membrana semipermeável da região mais concentrada para a região de menor concentração de soluto. Para que este fenômeno inverso à osmose seja possível, é necessário que a pressão aplicada seja superior à pressão osmótica da solução e, portanto, é necessária a utilização de altas pressões (13,8 a 68,9 bars). As membranas usadas na osmose reversa são assimétricas e retém solutos de tamanhos inferiores a 0,001 μm incluindo sais, açúcares e íons. Este processo é utilizado na concentração de sucos e na remoção de sal da água (SCOTT; HUGHES, 1996; CHERYAN, 1998).

2.1.4. Configuração das membranas

As membranas são meios filtrantes semipermeáveis, produzidas, geralmente, a partir de materiais poliméricos, que apresentam poros de diâmetros variados, possibilitando a separação de partículas e moléculas de diferentes tamanhos e massas molares (OLIVEIRA, 2010). As membranas mais utilizadas no processo de separação por membranas são as de poliamidas, polissulfonas e as membranas inorgânicas feitas de materiais sintetizados ou cerâmicas. Estas são capazes de suportar temperaturas mais altas e faixa mais ampla de pH (FELLOWS, 2006).

O sistema de separação de membranas, sob gradiente de pressão, apresenta quatro configurações de membranas: sistema em espiral, fibras capilares, placas e tubular. Cada sistema apresenta vantagens e desvantagens quanto ao nível de investimento, manutenção, facilidade de limpeza, desempenho e de área instalada (MAUBOIS et al., 1969).

As membranas em espiral são, normalmente, feitas de polissulfonas. São consideradas relativamente baratas e possuem limitações na faixa de pH aceitável (1 a 12), resistência ao cloro (200 mg/l para limpeza e 50 mg/l para estocagem) (CHERYAN, 1998) e temperatura máxima de 80 °C. Seu formato não é plenamente satisfatório para limpeza e eficiência na desinfecção, especialmente quando são necessárias a microfiltração de altas concentrações em proteínas e gordura do leite (CARVALHO; MAUBOIS, 2009).

As membranas cerâmicas satisfazem todas as exigências das aplicações da microfiltração na indústria de laticínios, tais como: forte resistência mecânica, permite a utilização de alta velocidade de recirculação de retentados viscosos no processo de microfiltração; grande tolerância ao pH (0,5 a 13,5), permitindo uso de soda cáustica (até 3%) e ácido nítrico (até 2%) para limpeza; não são afetadas por altas doses de cloro (até 2000 ppm); e podem ser operadas a temperatura de até 350 °C. Suas camadas podem ser compostas totalmente de alumina ou em camada de membrana com óxido de zircônio ou óxido de titânio ou mistura de ambos apoiados por óxidos de alumina (SABOYA; MAUBOIS, 2000). Embora consideradas caras, as membranas cerâmicas, possuem uma durabilidade superior a 14 anos, bem maior que as de polissulfonas que estão em torno de 6 a 10 meses (CARVALHO; MAUBOIS, 2009).

Para serem efetivas num processo de separação, as membranas devem possuir as seguintes propriedades: alta permeabilidade e seletividade, estabilidade mecânica e térmica e resistência química (RAUTENBACH; ALBRECHT, 1989). A permeabilidade de uma membrana representa a capacidade do solvente para atravessar a membrana, podendo ser definida como a quantidade de solvente que permeia a membrana em função da pressão aplicada (CHERYAN, 1998).

O diâmetro dos poros, que também afeta a permeabilidade de uma membrana, representa a média dos diversos tamanhos desses poros e auxilia na definição dos principais tipos de processos utilizados na separação por membranas. O diâmetro do poro pode ser indicado pela massa molar de corte, que designa a massa molar do menor componente que será retido com uma eficiência de pelo menos 95 % (PETRUS, 1997).

2.1.5. Parâmetros operacionais

A eficiência de um processo de membrana é, essencialmente, determinada por dois parâmetros: o fluxo do permeado e a capacidade seletiva da membrana. Segundo Walstra (2001), o fluxo do permeado é a quantidade (q) de líquido que atravessa a membrana por unidade de tempo e área superficial. Aplicando a equação de Lei de Darcy a uma membrana, tem-se:

$$q = \left(\frac{\beta}{h}\right) \frac{\Delta\rho}{\eta} \quad \text{Equação (1)}$$

Em que B é o coeficiente de permeabilidade da membrana, h é a espessura efetiva da membrana, Δp é a diferença de pressão sobre a membrana e η é a viscosidade do líquido do permeado. B é aproximadamente proporcional ao quadrado do tamanho dos poros e a parte da superfície ocupada pelos poros. Portanto, q aumenta com o aumento do tamanho do poro.

A seletividade está relacionada à capacidade de retenção de determinados solutos, que pode ser afetada pelos seguintes fatores: tamanho e forma das partículas, tipo do material e configuração da membrana, concentração de substâncias retidas e adsorção de solutos na membrana (MULDER, 1991; CHERYAN, 1998).

A medida da capacidade seletiva é dada pelo coeficiente de rejeição (R), definido pela relação entre a concentração do permeado e sua concentração na alimentação, pela qual assume-se que a probabilidade de uma partícula atravessar a membrana é máxima quando $R = 0$, ou seja, a membrana não apresenta nenhuma capacidade seletiva para a substância. Por outro lado, $R = 1$ significa que a substância retida não está presente no permeado (NÓBREGA et al., 2005).

Atualmente, a maioria das plantas de microfiltração nas indústrias de alimentos opera de acordo com o conceito de hidráulica: pressão transmembrana uniforme (UTP). O conceito UTP no processo de microfiltração, desenvolvido por Sandblom (1974) possibilitou a introdução da microfiltração em escala industrial. Neste processo, ocorre a recirculação do permeado, o que permite uma pressão transmembrana constante e baixa ao longo da membrana de microfiltração, possibilitando a recirculação do retentado com velocidade de 7 m/s, minimizando, portanto, a formação de *fouling* (incrustações) (POULIOT, 2008).

A formação de *fouling* é um fator limitante para a aplicação de membranas de filtração de produtos lácteos. Com o tempo, a membrana tende a acumular depósitos em sua superfície e diminuir o fluxo e sua seletividade. Quando não existe a possibilidade de desincrustação e a perda do fluxo se torna irreversível, considera-se o fim da vida útil da membrana (ORSELLO et al., 2006).

Segundo Merin e Daufin (1990) o processo de microfiltração é susceptível a incrustações (Figura 1), sendo caracterizado por três principais pontos: (i) adsorção e adesão de partículas a superfícies; (ii) polarização de concentração e formação do aglomerado; e (iii) obstrução dos poros. Vários pesquisadores (TROUVÉ et al., 1991, GESAN et al., 1999) têm relatado que o entupimento ocorrido em membranas cerâmicas é devido à deposição de partículas na camada na superfície da membrana, alterando, assim, seu desempenho. Para minimizar este problema, torna-

se fundamental uma limpeza eficiente da membrana para a correta realização do processo de microfiltração.

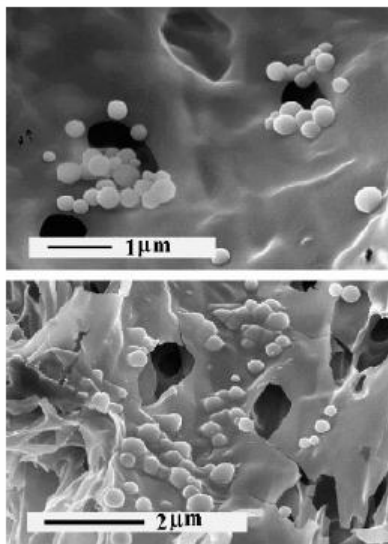


Figura 1: Incrustações formadas por proteínas durante a microfiltração

Fonte: JAMES et al. 2003

Os efeitos da polarização da concentração, da formação da camada de gel polarizada e do *fouling* devem ser controlados por meio do ajuste dos parâmetros operacionais do sistema, tais como o fluxo do permeado, pressão transmembrana, concentração da alimentação e velocidade tangencial, visando à viabilidade econômica do processo (CHERYAN, 1998).

Nos processos de separação por membranas que utilizam a pressão como força motriz, o fluxo de permeado, inicialmente, se eleva com o aumento da pressão transmembrana, principalmente quando o fluido não contém muitos componentes causadores do *fouling*. No entanto, o aumento progressivo da pressão resultará no aumento da resistência da camada de gel polarizada e do *fouling*, levando a uma diminuição acelerada do fluxo (PORTER, 1990).

De acordo com Cheryan (1998), o aumento da pressão transmembrana tende a aumentar o fluxo até a consolidação da camada de gel, após a qual o fluxo se torna independente da pressão. Assim, utilizando-se valores mais baixos de pressão, tem-se um fluxo inicial mais baixo, mas que será mantido com o tempo (PORTER, 1990).

O aumento da temperatura diminui a viscosidade do fluido, melhorando o fluxo de permeado. Entretanto, em temperaturas muito altas, pode haver precipitação de sais na superfície

da membrana, intensificando o *fouling* e, conseqüentemente, levando à diminuição do fluxo (CHERYAN, 1998).

Quanto maior a concentração de sólidos na alimentação durante o processo de microfiltração, maior será a viscosidade e a densidade do fluido, provocando uma diminuição na taxa de permeação. A transferência de massa também será menor devido ao menor gradiente de concentração na superfície da membrana. Quando a concentração da alimentação aproxima-se da concentração da camada polarizada, o fluxo tende a zero (CHERYAN, 1998).

O acréscimo da velocidade tangencial provoca um aumento no fluxo de permeado, devido à turbulência causada na superfície da membrana. Esta turbulência promove o arraste de partículas retidas, diminuindo a espessura da camada de gel polarizada e prevenindo o *fouling*. O aumento da velocidade tangencial também facilita o processo de limpeza, mas requer um aumento nos gastos com energia (PORTER, 1990).

2.1.6. Aplicação da microfiltração na indústria de laticínios

A utilização da microfiltração na indústria de laticínios teve início nos anos 80 com o desenvolvimento das membranas cerâmicas (GILLOT, 1984) época em que foi introduzido o conceito hidráulico revolucionário, pressão transmembrana uniforme (UTP), proposto por Sandblom (1974). O conceito de UTP reduz a formação de *fouling* na membrana de microfiltração, o qual resulta em uma elevada velocidade de fluxo transversal, proporcionando, alta permeabilidade e precisa seletividade (SABOYA e MAUBOIS, 2000).

A membrana de microfiltração oferece interessante alternativa ao tratamento térmico. Holm et al. (1986) e Piot et al. (1987) foram os primeiros a sugerir o uso da microfiltração para a remoção de bactérias do leite, introduziram a tecnologia e os equipamentos chamado "Bactocatch ®" pela Tetra Laval Co. Com microfiltração de leite a 50 °C, usando membranas de 1,4 µm, obtém-se valores de retenção de bactérias da ordem de 99,1 a 99,9 % (PENDERSEN, 1992) independentemente da contagem inicial no leite desnatado (MISTRY; MAUBOIS, 2004).

Na indústria de laticínios, a microfiltração é aplicada para remoção de bactérias, desnate do soro e enriquecimento de leite com caseína micelar para a produção de queijos, concentração de fosfocaseinato de cálcio e separação de caseína individual. No entanto, várias outras aplicações

têm sido investigadas, incluindo separação seletiva de células somáticas do leite, concentração e fracionamento de proteínas do soro e do leite, produção de isolado de soro e separação de gordura do leite (MAUBOIS, 1997).

Segundo Kelly e Tuohy (1997), o processo de microfiltração pode ser aplicado para diferentes finalidades como o aumento da vida de prateleira e da qualidade do leite, produção de queijos com menor risco de estufamento, desnate de soro e remoção de bactérias.

2.1.6.1. Aplicação de microfiltração na indústria de queijos

A técnica de microfiltração do leite para fabricação do queijo é realizada por meio da microfiltração do leite desnatado e posterior adição do creme tratado termicamente (115 a 120 °C por 3 s). Segundo Carvalho e Maubois (2009), queijos feitos com leite microfiltrado em membrana de 1,4 µm e adicionados de creme tratado termicamente são considerados, sob o ponto de vista higiênico, tão seguro, quanto os queijos feitos com leite pasteurizado.

O uso do leite microfiltrado para fabricação de queijos abre um campo de pesquisa na determinação e caracterização do papel exato, desempenhado na maturação do queijo, para cada espécie microbiana ou estirpe, que compõe o ecossistema durante a maturação, ou seja, bactérias do ácido láctico, bactérias lácticas não *starter* (NSLAB), propionibacteria, fungos e leveduras (MAUBOIS et al., 2000).

Estudos realizados com queijo Cheddar e Emmental, feitos de leite microfiltrado, conduziram a uma necessidade da adição de NSLAB tal como *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis* ou *Lb. fermentum*, em leite microfiltrado para fabricação de queijo em um nível ainda não determinado para contribuição positiva no desenvolvimento de sabor e aroma ao queijo durante a maturação (LAWRENCE et al., 2004).

A microfiltração do leite desnatado com membranas com tamanho de poro de 0,1 µm permite a separação de caseína micelar, isto é, fosfocaseinato de cálcio natural (MAUBOIS et al., 2001). Dependendo da quantidade de microfiltrado removido, o teor de caseína no retentado aumenta. Por conseguinte, na produção do queijo, as aplicações no retentado microfiltrado oferecem ao queijeiro possibilidade de otimizar o processo de fabricação de queijo e agregar valor aos co-produtos derivados (MAUBOIS et al., 2001).

Estudo realizado por Fauquant et al. (1988) demonstrou que a microfiltração de leite desnatado através de membrana com poros de 0,2 µm levou à retenção seletiva de caseína micelar. Os autores concluíram que esta tecnologia poderia ser utilizada tanto para o enriquecimento de caseína nativa específica na fabricação de queijos, quanto para a preparação no estado purificado de um novo produto: fosfocaseinato nativo.

Para fabricação de queijo por microfiltração, é necessário que se entenda as propriedades específicas das proteínas, pois, elas determinam fortemente a qualidade final do queijo (Carvalho e Maubois, 2009).

2.1.7. Remoção de bactérias

De acordo com Carvalho e Maubois (2009), apesar de o tratamento térmico garantir a segurança do leite e produtos lácteos, quase sempre provoca modificações irreversíveis nos componentes do leite, alterações físico-químicas de sais de cálcio, afeta negativamente a qualidade sensorial do leite fluido e produtos lácteos, assim como a produção de queijo. Além disso, as células das bactérias mortas durante tratamento térmico permanecem no leite com suas enzimas potencialmente ativas, que poderão causar alterações no leite durante o armazenamento, reduzindo, assim, a vida de prateleira comercial.

Membranas de microfiltração, com tamanho dos poros de 1,4 µm, foram estudadas por Madec, et al. (1992). Estes estudiosos observaram diminuição na contagem de mesófilos, *Salmonella* e *Listeria*, por um fator de 2 a 3 casas decimais no leite. De acordo com Jost e Jelen (1997), membranas minerais com poros da ordem de 0,1 a 1,0 µm removem efetivamente a gordura residual e as bactérias do soro.

A morfologia das bactérias e o volume celular influenciam ligeiramente a retenção na membrana de microfiltração. Níveis de retenção superior (99,98% e 99,99%) foram observados para bactérias formadoras de esporos, como *Bacillus cereus* (OLESEN e JENSEN, 1989) e *Clostridium tyrobutiricum* (TROUVÉ et al., 1991), o que segundo Mistry e Maubois (2004) é provavelmente devido a ligação de esporos de bactérias à parede celular, o que conseqüentemente resultou em um tamanho de célula aparentemente maior.

Olesen e Jesen (1989), utilizando membranas cerâmicas de 1,4 µm e a técnica de pressão transmembrana uniforme para microfiltração do leite desnatado, obtiveram redução de 99,99% no total de bactérias e 99,98% da concentração de esporos de *Bacillus cereus*.

Segundo Furtado (2007), a microfiltração tem sido recomendada para combater a presença de bactérias contaminantes indesejáveis em queijos. O uso de membranas com tamanho dos poros que varia de 0,8 e 1,4 µm de diâmetro é capaz de remover até 99,5 % de esporos presentes no leite.

Retenção de *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Salmonella* Typhimurium e *Mycobacterium tuberculosis* durante o processo de microfiltração, com dupla camada na membrana, mostrou uma redução decimal de 3,4, 4,0, 3,5 e 3,7, respectivamente (MADEC et al., 1992; SABOYA; MAUBOIS, 2000).

2.2. A microbiota dos queijos

A população de micro-organismos está presente em queijo durante todo o processo de maturação e possui um papel significativo no desenvolvimento de sabor e aroma e na caracterização da textura dos queijos (COGAN, 2000).

A cultura *starter* adicionadas no leite durante a produção do queijo é responsável pela produção de ácidos e contribui com o processo de produção e maturação do queijo. As bactérias do ácido láctico não *starter* (NSLAB), *Propionibacterium*, leveduras e/ou fungos filamentosos, tidas como cultura secundária não contribuem no processo de produção de ácido, mas tem papel significativo durante a maturação do queijo, no desenvolvimento de sabor e aroma e nas características originais de cada queijo (BERESFORD et al., 2001).

2.2.1. Cultura iniciadora (*starter*)

Cultura iniciadora (*starter*) pode ser definida como isolado capaz de produzir ácido suficiente para reduzir o pH do leite abaixo de 5,3 com o tempo de 6 horas e temperatura de 30 a 37 °C (BERESFORD et al., 2001).

Cultura *starter* é adicionada em produtos alimentícios para gerar rapidamente um grande número de micro-organismos desejáveis, reduzindo o tempo de fermentação e inibindo o crescimento de patógenos e bactérias deteriorantes (FELLOWS, 2006). Essas bactérias podem ser adicionadas no início da produção do queijo ou podem ser contaminantes naturais do leite, como é o caso de muitas variedades artesanais de queijos feitos com leite cru (BERESFORD et al., 2001).

As bactérias *starters* são utilizadas na fabricação de queijos e possuem importante papel no desenvolvimento de ácido e na sinerese durante a formação da coalhada (ROBINSON, 2002) contribuindo no processo de maturação dos queijos pela presença de suas enzimas que atuam na proteólise e na conversão de aminoácidos em compostos que contribuem para o sabor e aroma do queijo (FOX e WALLACE, 1997).

Durante a produção do queijo, o início do processo de fermentação começa com a adição de culturas iniciadoras ao leite. São utilizadas culturas iniciadoras mesofílicas e termofílicas, com temperaturas ótimas de multiplicação de aproximadamente 30 e 45 °C, respectivamente. As culturas mesofílicas são usadas na produção de Queijo Cheddar, Gouda, Edam, Blue e Camembert, e as culturas termofílicas são adicionadas para a produção de queijos duros e semiduros, típicos de variedades italianas e suíças (COGAN e HILL, 1993). As bactérias *starters* mais frequentemente encontradas são dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* (BERESFORD et al., 2001).

Em uma pesquisa realizada na Europa foram isoladas 4.379 bactérias de produtos lácteos, incluindo 25 queijos (COGAN et al., 1997). O estudo indicou que 38 % dos isolados foram *Lactococcus*, 17 % *Enterococcus*, 14 % *Streptococcus thermophilus*, 12 % *Lactobacillus* mesofílicos, 10 % *Leuconostoc* e 9 % *Lactobacillus* termofílicos. A produção de ácido pelos isolados variou consideravelmente. Apenas 8 % dos *Lactococcus* e 2 % dos *Lactobacillus* isolados produziram ácido suficiente para reduzir o pH do leite abaixo de 5,3 em 6 horas à temperatura de 30 °C. Por outro lado, 53 % de *Streptococcus termophilus*, 32 % *Lactobacillus* termofílicos e 13 % de *Enterococcus* isolados, reduziram o pH do leite para 5,3. Este estudo mostrou que bactérias mesofílicas isoladas de queijos artesanais não produziam ácido suficiente, quando testadas individualmente para produção de queijos, não estando em conformidade com a definição de culturas *starters*.

Os *Lactococcus* são constituídos de uma espécie, com duas designações nas sub espécies (AXELSSON, 2004). A espécie é denominada *Lactococcus lactis*. As sub-espécies são

Lactococcus lactis subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Dentro das sub-espécies possuem ainda dois tipos, citrato-negativo e citrato-positivo. A sub-espécies citrato positivo são designadas cit+ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, formalmente conhecida como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (ROBINSON, 2002). O habitat original do *Lactococcus* são plantas ou materiais vegetais, mas são bastante encontrados em leite e seus derivados. *Lactococcus* se desenvolve na escala de temperatura mesofílica e multiplica melhor em condições microaeróbicas (HENRIKSEN et al., 1999).

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

Segundo Kandler e Weiss (1986) os *Lactobacillus* são divididos em três grupos: (i) homofermentativos obrigatórios, (ii) heterofermentativos facultativos e (iii) heterofermentativos obrigatórios. Os *Lactobacillus* pertencentes a culturas *starters* como *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* e *Lb. acidiphilus* são homofermentativos obrigatórios (BERESFORD, 2004), ou seja, convertem a glicose em torno de 85 % de ácido lático (HOLT et al., 1994).

Os *Lactobacillus* constituem um dos maiores gêneros pertencentes ao grupo das bactérias láticas (AXELSSON, 2004). A espécie *Lactobacillus* utilizada como cultura *starter*, multiplica melhor em condições microaeróbicas, é termo tolerante, cresce no leite em temperatura ótima de 43 a 46 °C é ácido tolerante e produz alta acidez em leite (ROBINSON, 2002).

Temperatura ótima para o crescimento do *Streptococcus thermophilus* está entre 35 e 42°C. Em culturas isoladas do leite, as células são esféricas e encontradas na forma de cadeias longas. *Streptococcus thermophilus* possui β -galactose permease que transporta lactose para o interior da célula. Na célula a lactose é hidrolisada pela β -galactase em glucose e galactose (ROBINSON, 2002).

Em condições de estresse *Streptococcus thermophilus* possui baixa atividade proteolítica, mas possui atividade de urease normal. Sendo assim, eles podem ativamente hidrolisar a uréia presente no leite com formação de NH₃ e CO₂. A habilidade do *Streptococcus thermophilus* de fornecer CO₂ e aminoácidos constitui num importante papel para o crescimento simbiótico

especialmente de *Lactobacillus* como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (VEDAMUTHU, 1994).

Outra espécie microbiana que é usada como *starter* para fabricação de queijos pertence ao gênero *Leuconostoc*. As espécies de *Leuconostoc* que estão associadas com cultura láctica *starter* são *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc lactis*. Os *Leuconostoc* isolados de produtos lácteos são morfológicamente pequenos, apresentam células esféricas e longas. Eles são mais tolerantes ao ácido que os *Lactococcus* e possuem sistema enzimático para fermentar o citrato (AXELSSON, 2004).

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris* é um micro-organismo bastante sensível em seu processo de crescimento e em seu metabolismo. Produz lentamente quantidades muito pequenas de ácido láctico no leite (cerca de 0,20 %). São cocos mesófilos e produz quase que somente o ácido láctico na sua forma isomérica D(-). Seu crescimento inicial depende da presença de outra cultura para abaixar o pH em torno de 5 a 6, valor mínimo requerido para iniciar seu crescimento (FURTADO, 2002).

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

Ambos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc* inibem bactérias psicrotróficas tais como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragilis* e outros deteriorantes de produtos lácteos. A ação inibidora ocorre devido à combinação de efeitos dos compostos produzidos pelos *Lactococcus*, tais como, ácido láctico, ácido acético, CO₂ e outros componentes (ROBINSON, 2002).

2.2.2. Cultura secundária

A cultura secundária não desempenha atividade durante a fabricação do queijo, mas estão envolvidas com a cultura *starter* no processo de maturação (BERESFORD et al., 2004). Segundo Cogan et al. (1997) os micro-organismos da cultura secundária isolados em queijos podem ser divididos nos grupos: (i) Bactérias lácticas não *starter* (NSLAB); (ii) *Propionibacterium*; (iii) Fungos e (iv) Leveduras.

2.2.2.1 Bactérias lácticas não *starter* (NSLAB)

As bactérias lácticas não *starter* (NSLAB) representam uma significativa proporção dos micro-organismos presente durante a maturação nos mais variados tipos de queijos. Com exceção dos *Leuconostoc* essas bactérias não são adicionadas como culturas *starter* ou como culturas adjuntas, mas são autóctones no qual crescem durante a maturação do queijo. As principais bactérias envolvidas neste grupo são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Enterococcus* (BERESFORD, 2004).

Robinson (2002) descreve a variação da população dos micro-organismos *starters* e micro-organismos NSLAB em queijo Cheddar, maturado à temperatura de 6 °C (Figura 2). A população de cultura *starter* decresce nos primeiros dias após fabricação do queijo, enquanto que a população das culturas secundárias (NSLAB) aumenta até aproximadamente 120 dias de maturação.

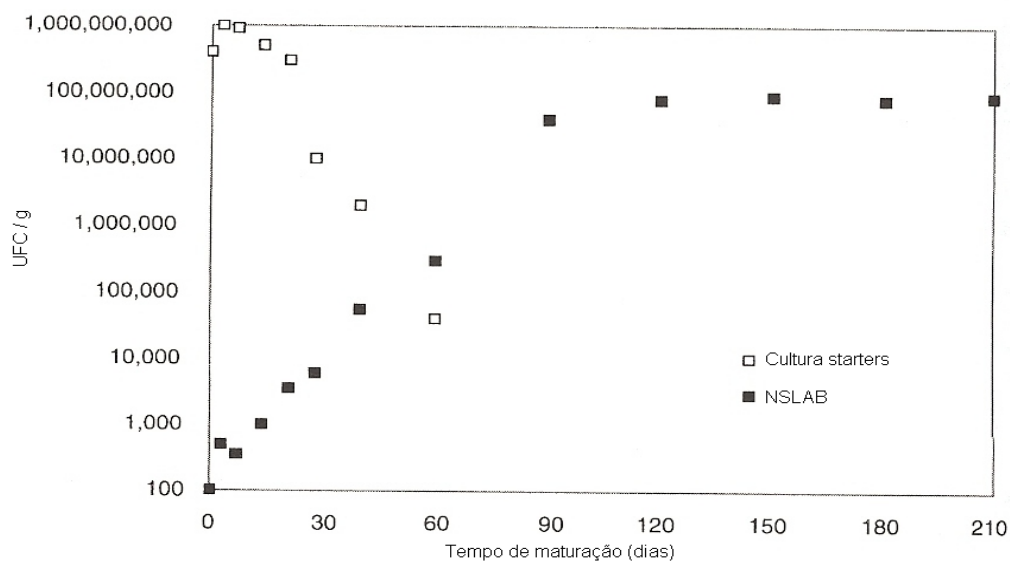


Figura 2: Variação da população das culturas *starters* e NSLAB em queijo Cheddar, maturado à temperatura de 6 °C.

Fonte: ROBINSON (2002).

Os *Lactobacillus* constituem a maioria da população de NSLAB em uma diversidade de queijos durante a maturação (BERESFORD et al., 2001). Os *Lactobacillus* NSLAB encontrados regularmente nos queijos são heterofermentativos facultativos, ou seja, produzem além do ácido

lático, também outros compostos como dióxido de carbono e ácido acético (HOLT et al., 1994) e são referidos como *Lactobacillus* facultativos heterofermentativos (FHL). Os heterofermentativos obrigatórios são menos frequentes em queijos (ROBINSON, 2002).

Muitas espécies de *Lactobacillus* não *starter* têm sido isoladas de queijos, sendo mais frequentemente encontradas *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus curvatus* (FITZSIMONS et al., 1999).

Um trabalho realizado por Thierry et al. (1998) de isolamento de NSLAB em queijo Emmental feito com leite termizado indicou a presença do grupo *Lactobacillus rhamnosus* e *Enterococcus*. Outro estudo realizado por Williams e Banks (1997) com queijo Cheddar, depois de seis meses de maturação, mostrou que o *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* foram as espécies dominantes. Entretanto, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus farciminis* e *Lactobacillus kefir* foram também isolados.

Em queijos tipo Suíço, foi observado que a intensidade do sabor esta associada à contagem de *Lactobacillus* heterofermentativos, *Propionibacterium* (PAB) e os *Enterococcus*, que estão presentes naturalmente no leite cru (Beuvier et al., 1997).

Do total de micro-organismos encontrados em queijos semiduros maturados como o Gouda, produzido com leite pasteurizado, 76 % foram de *Lactobacillus*, predominantemente, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* (LINBERG et al., 1996).

Um estudo da população de NSLAB de queijo Cheddar maturado mostrou que a microbiota de NSLAB consistiu de 55 % de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei*, 28 % de *Lactobacillus plantarum* e 14 % de *Lactobacillus curvatus* (JORDAN e CONGAN, 1993). Outro estudo similar realizado por Fitzsimons et al. (2001) com queijo Cheddar caracterizou 331 isolados no queijo com 94,4 % de *Lactobacillus paracasei*, 2,1 % *Lactobacillus plantarum*, 0,3 % *Lactobacillus curvatus*, 0,3 % *Lactobacillus brevis* e 0,9 % de outros não identificados.

Os *Pediococcus* têm sido reportados como bactérias NSLAB em queijo Cheddar no Canadá e Estados Unidos (FRYER e SHARPE, 1966), em queijo Manchego e Serra da Estrela (TAVARIA e MALCATA, 1998), Comtè (BOUTON et al., 1998) e Feta (HAYALOGLU et al., 2002). *Pediococcus acidilactis* e *Pediococcus pentosaceus* foram os *Pediococcus* encontrados nesses queijos (BERESFORD, 2001).

Espécies do gênero *Leuconostoc* produzem diacetil e acetoína a partir do citrato e são amplamente usados em culturas mistas. O CO₂ produzido é responsável pela formação de olhaduras em queijo (DELLAGLIO et al., 1995).

Enterococcus são bactérias classificadas dentro da definição geral das bactérias do ácido láctico por serem Gram positivas e catalase negativa. São frequentemente isolados de queijos artesanais produzidos, principalmente, com leite cru. Produzem compostos que atuam no sabor e aroma, como diacetil e acetoína (GIRAFÁ, 1997). A população final de *Enterococcus* em queijos maturados pode atingir 10⁵ a 10⁷ UFC/mL, embora a contagem possa alterar com a variedade do queijo. As espécies isoladas frequentemente são *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus durans* (BERESFORD, 2004).

Os *Enterococcus* são encontrados amplamente no ambiente, mas estão associados principalmente com o trato digestório, por causa disto, a presença de *Enterococcus* em alimentos é frequentemente interpretado como má higienização (BERESFORD, 2004). Entretanto, Franz et al. (1999) descrevem a utilização de *Enterococcus* em produtos de lácteos com capacidade de exibir características propiônicas e produção de bacteriocinas.

Os queijos tipo Suíço como Emmental, Gruyère e Comtè podem ser produzidos no país de origem com leite cru, termizado ou pasteurizado. A evolução de NSLAB em queijo tipo Suíço fabricado com leite cru e pasteurizado foi citado por Beuvier et al. (1997). A contagem de NSLAB no fim da maturação foi maior em queijo feito com leite cru (10⁸ UFC/g) do que em queijo feito com leite pasteurizado (10⁶ UFC/g). A população de NSLAB de queijo semi maturado foi composta primeiramente por *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*, e em queijo maturado por *Lactobacillus paracasei* (ROBINSON, 2002).

A fonte de energia utilizada pelas NSLAB para multiplicação ainda não é bem esclarecida, sabe-se que com o desenvolvimento das NSLAB a lactose é usada de forma exaustiva (TURNER e TOMAS, 1980). As bactérias NSLAB podem transformar o L-isômero do lactato em D- isômero (TOMAS e CROW, 1983), mas ele é pouco susceptível para atuar como fonte de energia.

O citrato pode ser encontrado em queijo Cheddar e alguns pesquisadores sugerem que ele pode atuar como fonte de energia para NSLAB (JIMENO et al. 1995). Entretanto, estudos realizados com queijo Cheddar indicaram que foi muito pouca a utilização do citrato em três dos quatro queijos analisados (JORGAN e CONGAN, 1993) implicando que, em alguns casos, alta

população de NSLAB pode multiplicar mesmo na ausência da utilização do citrato (BERESFORD et al., 2001).

A presença de NSLAB em queijo fabricado com leite cru ou pasteurizado tem sido motivo de muitos debates. No caso de queijos tradicionais da Europa fabricados com leite cru observa-se que a NSLAB está presente no leite utilizado para fabricação do queijo. Entretanto, na fabricação do queijo com leite pasteurizado, também se encontra uma microbiota NSLAB. Provavelmente a presença de NSLAB é devido a uma contaminação pós-pasteurização (MARTLEY e CROW, 1993) e em alguns casos são resistentes e/ou possuem enzimas resistentes ao processo de pasteurização (CHOISY et al., 1987).

A microbiologia do queijo, fabricado com leite cru é complexa devido às interações que ocorrem entre as NSLAB e as bactérias ácido lácticas nos queijos. Os estudos destas interações são difíceis por causa do complexo ecossistema microbiano encontrado no queijo (MARTLEY e CROW, 1993). Entretanto alguns progressos já foram feitos nessa área. Foi reportado por Lynch et al (1996) que *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* podem inibir bactérias propiônicas e *Enterococcus* em queijos. O mecanismo de inibição não é muito conhecido.

O papel das NSLAB no desenvolvimento do sabor e aroma do queijo Cheddar tem sido motivo de discussões há muitos anos. Lynch et al. (1996) relatam que existe vários estudos do efeito dos *Lactobacillus* no desenvolvimento do sabor e aroma do queijo Cheddar, realçando aumento do nível de proteólise durante período de maturação

2.2.2.2. Bactérias propiônicas

Bactérias propiônicas crescem numa diversidade de queijos durante a maturação, estão associadas com queijo tipo Suíço tal como Emmental, Gruyère e Comtè. Bactérias propiônicas são Gram positivas, bacilos curtos e metabolizam o lactato (ROBINSON, 2002).

As principais espécies de uso em laticínios são *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. O pH ideal de crescimento está entre 6,0 e 7,0 (mas podem crescer lentamente, nos limites extremos de pH 4,6 até 8,5). Bactérias propiônicas são mesófilas, com temperatura ideal de crescimento de 30 °C, mas podem crescer a 12 °C (FURTADO, 2007).

O queijo fabricado com leite cru possui um número suficiente de bactérias propiônicas. Entretanto, devido à pasteurização do leite essas bactérias são adicionadas no leite no início da fabricação para assegurar a presença de aproximadamente 10^3 UFC / g no queijo após fabricação (VOROBEVA, 1999).

Durante a maturação do queijo com olhaduras ocorre um aumento na temperatura de incubação para 18 a 22 °C, o que em pouco tempo inicia-se o crescimento das bactérias propiônicas que atinge 10^8 a 10^9 UFC / g no queijo (STEFFEN, 1993). Queijo tipo Suíço é submetido à fermentação propiônica durante 20 a 30 dias. O ácido propiônico e o acético produzido durante a fermentação contribuem para o desenvolvimento das características de sabor e aroma destes queijos, enquanto que o CO₂ produzido é responsável pela formação de olhaduras. Obtendo uma produção de olhaduras suficiente, o queijo é estocado a baixas temperaturas para retardar o crescimento e o metabolismo das bactérias propiônicas (BAER, 1995).

O estudo das interações entre bactérias propiônicas e outras bactérias são importante durante a maturação do queijo. Alekeeva et al. (1983) reportaram que nove de vinte e duas estirpes de *Lactobacillus* testadas foram antagônicas para bactérias propiônicas. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tem grande efeito inibidor, enquanto *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus helveticus* foram compatíveis com *Propionibacterium freudenreichii* e *Propionibacterium shermanii*.

Interações microbianas são fatores determinantes na velocidade e intensidade da fermentação propiônica. As escolhas das associações entre as espécies permite modular a fermentação do ácido propiônico. Os fenômenos de interação entre bactérias propiônicas e bactérias lácticas já foram observados em muitas espécies (incluindo *Lactococcus*), porém a maioria dos estudos em queijos diz respeito principalmente a microbiota de *Lactobacillus* termófilos e *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos (RICHOUX, 2005).

Em estudos realizados na Europa (Kerjean et al., 2000) associações de cinco estirpes de *Propionibacterium* e onze de *Lactobacillus* termófilos (*L. helveticus* ou *L. delbrukii* subsp. *lactis*) foram testadas em quatro queijos Emmental, os resultados demonstraram que existe uma grande susceptibilidade das bactérias propiônicas a interações microbianas. Para as estirpes mais sensíveis, a produção de ácido propiônico, após 30 dias em câmara quente, variou entre 12 mg/100g a 450 mg/100g, dependendo da associação entre bactérias lácticas.

Neste mesmo estudo, em relação às estirpes mais susceptíveis, duas classes foram distinguidas: uma com grande variedade de fermentação em função dos *Lactobacillus* associados, e uma baixa variabilidade de fermentação, mas com estímulo forte para algumas associações.

Os cientistas suíços atribuí esse estímulo às atividades peptidásicas dos *Lactobacillus* termofílicos e da sua produção de aminoácidos livres (BAER e RYBA, 1999). De acordo com Richoux (2005), a mesma estirpe pode ter uma interação mais forte com *P. freudereichii* e menos interação com outras estirpes.

Fenômenos de interações microbianas podem ser usados para inibir a fermentação de ácido propiônico em queijos. Algumas estirpes de *L. plantarum*, *L. paracasei* (Chamba, 2000), *L. casei*, (Sollberger, 1994) e de *L. rhamnosus* (Jimeno et al. 1995) são capazes de inibir a fermentação do ácido propiônico. A concentração deste ácido pode ser reduzida de 15 a 50 %. Esses tipos de estirpes são amplamente utilizados na Suíça para resolver defeitos de fermentação secundária.

2.2.2.3. Fungos filamentosos

Os queijos maturados por fungos são divididos em dois grupos: aqueles que são maturados com *Penicillium roquefort* que cresce no interior do queijo e formam veias azuis, tais como Roquefort, Gorgonzola e Danish Blue e aqueles que são maturados com *Penicillium camemberti* que cresce na superfície dos queijos, tais como Camembert e Brie (ROBINSON, 2002). Outros fungos como *Mucor*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Epicoccum* e *Sporotrichum* também são associados na produção de grande variedade de queijos, entretanto ainda não é muito conhecido seu impacto no processo de maturação (BERESFORD, 2001). No interior ou na superfície dos queijos maturados por fungos ocorre uma alta atividade bioquímica com produção intensiva de sabor e aroma típico (MOREAU, 1980).

O fungo pode ser adicionado diretamente ao leite ou na coalhada após a dessoragem. Na fabricação do tipo Roquefort o fungo é adicionado na massa, durante a enformagem (FURTADO, 2003). Após a dessoragem ocorre a salga e posteriormente os queijos são perfurados e maturados (BERESFORD et al., 2001).

No queijo Camembert, o *Penicillium camemberti* se desenvolve após 6 ou 7 dias de fabricação. *Penicillium camemberti* metaboliza o lactato para CO₂ e H₂O, resultando na desacidificação na superfície do queijo em três semanas, gerando, pelo consumo de ácido láctico,

um gradiente de pH entre a casca e centro do queijo, facilitando a degradação da proteína pelas proteases presentes na massa. A parte externa do Camembert é submetida a uma considerável modificação de textura e sua massa, que é firme no início da maturação, mais tarde torna-se macia. O amaciamento é visível num corte do queijo e gradualmente se estende em direção ao centro do queijo. O teor de água do queijo é de 55% e, caso seja muito elevado, a parte externa tende a se derreter ao corte. Essas mudanças são usualmente atribuídas à alta proteólise causada pelo *Penicillium camemberti* (GRIPON, 1993).

2.2.2.4. Leveduras

Em geral, a presença de leveduras em produtos lácteos é considerada como contaminante e tem aspectos negativos (IDF, 1998). Entretanto, certas espécies de leveduras são adicionadas no leite para produção de queijo e em aplicações específicas na indústria de laticínios (ROBINSON, 2002).

As leveduras são encontradas em uma grande diversidade de queijos. No entanto, seu papel na maturação de queijos ainda não é muito conhecido. O baixo pH, baixo conteúdo de umidade, baixa temperatura e alta concentração de sal na maturação dos queijos favorecem o crescimento das leveduras (BERESFORD et al., 2001). As leveduras metabolizam o lactato numa concentração de sal relativamente alta, crescem no início da maturação do queijo e auxiliam na desacidificação do queijo (WYDER e PUHAN, 1999).

Fox et al. (2000) descrevem as leveduras encontradas em diversas variedades de queijos. *Debaryomyces hansenii* foi a levedura dominante em todos os queijos incluindo Roquerfort, Cabrales, Camembert, St. Nectaire e Tilsit. As outras espécies mais importantes foram *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* e *Trichospora beigeli*.

Segundo Roostita e Fleet (1996), as leveduras contribuem positivamente para o sabor, aroma e textura dos queijos. Em queijo Roquefort, a maturação na superfície é atribuída à atividade proteolítica de algumas leveduras (KANAUCHI, YOSHIOKA e HAMMAMOTO, 1961). Em queijo Camembert foi realizado um estudo por Beresford et al. (2001) que relataram a presença de leveduras na superfície do queijo, com destaque para *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* e *Debaryomyces hansenii* dentre as espécies mais predominantes.

2.3. Defeitos nos queijos com olhaduras

Diversos tipos de defeitos podem ocorrer nos queijos. Alguns decorrentes da fabricação devido à tecnologia inadequada, outro, da má qualidade da matéria prima e ingredientes, ou ainda, dos tratamentos físicos inadequados aplicados ao queijo como, prensagem, cuidados na maturação e controle das temperaturas de maturação e estocagem (FURTADO, 1991). Os defeitos geralmente produzem alterações físicas, químicas e organolépticas tais como: sabor anormal de ranço e odor pútrido (SILIKER, 1980).

De acordo com Furtado (1991) o estufamento pode ocorrer ao final da fabricação ou no decorrer da maturação. O primeiro caso é conhecido como estufamento precoce, provocado por bactérias do grupo coliforme. No segundo, estufamento tardio, estão envolvidas as bactérias do gênero *Clostridium*, porém seu controle é mais complexo do que o anterior.

2.3.1. Estufamento tardio de queijos duros e semiduros

A fermentação ácido-butírica, comumente conhecida como estufamento tardio, constitui um defeito frequentemente observado nos queijos semiduros e duros e de maturação prolongada (FURTADO, 1985). Esse defeito é provocado pela presença de esporos de clostrídios que podem germinar, multiplicar e, assim, produzir gases, gerando consideráveis perdas do produto (PERRY, 2004), representando um elevado impacto econômico na produção de queijos (LE BOURHIS et al., 2005).

O fundamento bioquímico desse defeito baseia-se na fermentação do ácido láctico em ácido butírico, conferindo ao queijo um flavor de ranço e a presença dos gases CO₂ e H₂ que podem em casos extremos, provocar ruptura do queijo, causando rachaduras ou trincas (LE BOURHIS et al., 2005). O gás carbônico, bastante solúvel em água, só aparece como olhaduras em queijo depois de saturar completamente o meio aquoso em que está dissolvido. Já o hidrogênio, que não é solúvel em água, provoca a formação imediata de olhaduras que aumentam de tamanho à medida que o defeito se manifesta mais precocemente no queijo (PERRY, 2004).

Geralmente, o estufamento manifesta-se no período de dez dias até oito semanas após a fabricação do produto, pois os esporos só germinam sob certas condições, tais como: após

abaixamento do potencial de oxirredução do queijo ou, antes da distribuição uniforme do sal (BERESFORD et al., 2001). Os queijos apresentam-se bastante “inchados”, com áreas descoradas e macias, odor desagradável e sabor estranho. Internamente são observadas olhaduras grandes e irregulares na massa, resultantes do processo fermentativo que leva à produção de hidrogênio (MESQUITA et al., 2001). Segundo FURTADO (1985) não há consenso sobre o número mínimo de esporos capazes de provocar o defeito, mas sabe-se que acima de 200 esporos de *Clostridium* por litro de leite já ocorre o estufamento.

Bactérias esporogênicas do gênero *Clostridium* que sobrevivem ao processo de pasteurização têm sido apontado como responsável pela contaminação do leite (INGHAM et al., 1998) e como a principal causa da contaminação dos queijos (MESQUITA et al., 2001; LE BOURHIS et al., 2005). A matéria-prima contamina-se principalmente na ordenha, sendo a silagem de baixa qualidade microbiológica uma das principais fontes (COCOLIN et al., 2004).

As espécies de *Clostridium* que têm sido reportadas como causadoras do estufamento tardio são *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* (PERRY, 2004). Esses microorganismos são bastonetes móveis, Gram-positivos, medem de 0,8 a 6,0 µm de comprimento e crescem em uma faixa de temperatura ideal de 32 a 37 °C e pH entre 6,8 e 7,0 (FURTADO, 1991). Todas essas espécies são capazes de produzir ácido butírico e gás hidrogênio em vários meios de cultura artificiais (KLIJN et al., 1995).

Clostridium tyrobutyricum

É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica, apresenta mobilidade, formadora de esporos ovais e subtermais (HERMAN; BLOCK; WAES, 1995). É considerada por vários autores como o principal organismo responsável pelo estufamento tardio de queijos semiduros e duros (SU e INGHAM, 2000), sendo a sua presença um pré-requisito para a ocorrência da fermentação ácido-butírica em queijos (LE BOURHIS et al., 2007).

Esse micror-organismo fermenta ácido láctico para produzir ácido butírico, dióxido de carbono e hidrogênio. Os gases liberados causam o estufamento no queijo, enquanto o ácido butírico acima da concentração crítica de 500 mg/Kg de queijo confere sabor desagradável (FURTADO, 2007). A faixa de temperatura de multiplicação do *C. tyrobutyricum* ocorre entre 30 e 37 °C, sendo ótima de 25 °C. Sua multiplicação é estimada pela fermentação de carboidratos,

mas inibida por 6,5 (m/m) de NaCl. A cultura de *C. tyrobutyricum* não é patogênicas para humanos e outros animais (SNEATH, 1986).

Segundo Wasserfall e Teuber (1979) *C. tyrobutyricum* origina-se principalmente do emprego de silagem na alimentação do gado, e como seus esporos sobrevivem facilmente à temperatura de pasteurização, podem provocar o defeito estufamento tardio. De acordo Su e Ingham (2000), os esporos geralmente atingem o leite cru por meio da contaminação dos tetos pelo esterco durante a ordenha. No entanto, o micro-organismo também foi isolado de solo, produtos lácteos, fezes de cães, fezes bovinas e humanas, tanto de adultos quanto de crianças (SNEATH, 1986).

Clostridium butyricum

Bastonete Gram-positivo, anaeróbico estrito, móvel por flagelos peritríquios, que apresenta esporos ovais. A faixa de temperatura de multiplicação ocorre entre 30 e 37°C. A forma esporulada resiste 10 minutos a 80°C. É multiplicada pela fermentação de carboidratos e inibida por 6,5% de NaCl. Os produtos de fermentação são os ácidos butírico, acético e fórmico, além do ácido láctico e succínico. Butanol e etanol algumas vezes são produzidos (SNEATH, 1986).

O micro-organismo, assim como *C. tyrobutyricum*, também tem sido detectado em casos de deterioração em queijos com estufamento tardio. Mesquita et al. (2001) afirmaram que *C. butyricum* desenvolve-se muito rapidamente, com correspondente produção intensa de gás e estufamento com forte deformação no queijo.

C. butyricum tem sido isolado de várias fontes, como solo, água doce e queijo, rúmen de bezerros saudáveis, fezes de animais e humanos, incluindo de crianças saudáveis (SNEATH, 1986).

Clostridium sporogenes

Bastonete Gram-positivo, anaeróbico estrito (PREVOT, 1996), apresenta mobilidade por flagelos peritríquios, mede de 0,3 a 1,4 por 1,3 a 16,0 µm. Os esporos são ovais e subterminais (SNEATH, 1986) e resistem de 15 min. a 1 h à 100 °C (PREVOT, 1996). A faixa de temperatura ótima de multiplicação ocorre entre 30 e 40°C, com intervalo entre 25 e 45°C. A multiplicação ótima ocorre em atmosfera contendo 100% de CO₂. Os produtos de metabolismo incluem grandes quantidades de ácido acético e butírico e pequenas quantidades de ácidos isobutírico e isovalérico,

podendo ser produzido ácido propiônico, valérico, isocapróico, láctico e succínico. Também são produzidos etanol e abundante H₂ (SNEATH, 1986).

Esse micro-organismo foi isolado do solo, esterco, fezes de homens e animais, lago de água doce, carne conservada e produtos lácteos (PREVOT, 1996).

Assim como *C. tyrobutiricum* e *C. butyricum*, o *C. sporogenes* também tem sido detectado em queijos com estufamento tardio (LE BOURHIS et al., 2005), porém com pouca frequência e sempre associado com as outras espécies de *Clostridium*.

2.4. Sistema de pasteurização

A pasteurização é um tratamento térmico, no qual o alimento é aquecido à temperaturas menores que 100 °C. Em alimentos de baixa acidez (pH > 4,5), a pasteurização é utilizada para minimizar possíveis riscos à saúde devido a contaminações com células vegetativas de micro-organismos patogênicos e para aumentar a vida de prateleira. Em alimentos ácidos (pH < 4,5), a pasteurização é utilizada para eliminar os micro-organismos deteriorantes, assim como inativar as enzimas naturalmente presentes. Em ambos, haverá pequenas alterações nas características sensoriais e físico-químicas (FELLOWS, 2006).

O processo de pasteurização pode ser rápido (73-75 °C por 15 segundos) ou lento (62-65 °C por 30 minutos). Dentre as principais vantagens da pasteurização, destacam-se: a eliminação de micro-organismos patogênicos; o aumento da durabilidade do produto; a eliminação dos micro-organismos causadores do estufamento precoce. Dentre as principais desvantagens destacam-se: as alterações na caseína, tornando-a menos permeável, dificultando o ponto da coalhada aumentando o tempo de coagulação (FELLOWS, 2006).

A pasteurização de leite, seguido de resfriamento a temperatura de 4 °C, resulta em um produto com características de frescor natural e uma vida útil de até 12 dias, dependendo da qualidade microbiológica do leite e das condições sanitárias do processamento. Pasteurização, entretanto, pode resultar na sobrevivência de esporos, os quais podem afetar a qualidade do leite e do queijo fabricado. Por exemplo, esporos de *Bacillus cereus*, sobrevivem à pasteurização e podem produzir toxinas que causam doenças, assim como algumas células de psicrotróficos podem causar problemas na vida útil (PAFYLIAS et al., 1996) e esporos de *C. tyrobutyricum* também sobrevivem à pasteurização e podem produzir estufamento tardio em queijos duros e semi duros (FURTADO, 2001).

Segundo Fellows (2006), o processo de filtração com membrana apresenta vantagens em relação ao processo de pasteurização e dentre elas destacam-se: o alimento não é aquecido e, portanto, a perda de voláteis ou mudanças no valor nutricional e da qualidade sensorial é minimizada, o uso de energia é utilizado de modo mais eficiente e não há necessidade de caldeiras para a produção de vapor, as instalações são mais simples e com custos de mão de obra e de operações mais baixas.

2.5. Fase aquosa do queijo

As características físico-químicas do queijo referentes ao desenvolvimento das propriedades funcionais, tais como textura, proteólise, pH são amplamente descritas, na literatura (Fox, 1989; Lawrence et al., 1987; Fox et al., 1993). Entretanto, outros estudos (BARTHEL et al. 1928a; SANDBERG et al. 1930) têm sugerido que as mudanças nas propriedades funcionais dos queijos podem estar também relacionadas com a mudança do equilíbrio físico-químico entre a matriz protéica e a fase aquosa do queijo.

O queijo é definido como um sistema bifásico, compreendendo de uma rede sólida porosa de paracaseína que fixa a matéria gorda e uma fase aquosa (MAUBOIS e MOCQUOT, 1971; MORRIS et al, 1988). A fase aquosa é o meio no qual crescem os micro-organismos componentes do ecossistema intervindo durante a maturação e na qual se acumulam produtos hidrossolúveis resultantes do metabolismo bacteriano de reações enzimáticas, que dão origem ao aroma e sabor dos queijos (ADDA, 1987).

Em um estudo realizado por THIERRY (1999), 84 compostos voláteis foram identificados tanto na fase aquosa quanto na fase gordurosa do queijo em pelo menos um estágio de maturação, incluindo 18 aldeídos, 13 álcoois primários e 4 secundários, 16 ésteres, 14 cetonas e compostos sulfurados, 12 hidrocarbonetos e 2 compostos clorados. Mais compostos foram recuperados a partir da fase aquosa e da gordura do que nas amostras de queijo analisadas

Thierry et al. (1998) em outro estudo avaliaram a dinâmica da população bacteriana e a evolução da composição da fase aquosa. Segundo estes autores a extração da fase aquosa por prensagem tem várias vantagens para acompanhar as alterações bioquímicas no queijo, permitindo avaliar as mudanças minerais entre a rede de paracaseína e a fase aquosa durante a maturação do queijo.

2.5.1. Histórico

A extração da fase aquosa, obtida pela aplicação de uma forte pressão mecânica a uma mistura de queijo ralado com areia fina foi proposto por Barthel et al. (1928a) como meio para avaliar o grau da maturação e a ação do coalho sobre o queijo. A extração por água dos componentes solúveis do queijo já era criticada por estes autores por causa da susceptibilidade de alterar profundamente os equilíbrios físico-químicos e de conduzir assim a resultados errôneos sobre as formas solúveis de nitrogênio.

A metodologia proposta por Barthel et al. (1928a) foi retomada por Morris et al., (1988), com a ajuda de um equipamento de prensagem modernizado com o objetivo de estudar a composição de minerais e de aminoácidos livres de queijo Cheddar maturado por 1 mês. Por último, Lucey et al. (1993) utilizou um equipamento idêntico para um estudo comparativo do poder tampão do queijo Emmental e de sua “fase aquosa” nas diferentes etapas da maturação.

O equipamento desenvolvido por Morris et al. (1988) não permitindo a obtenção de mais do que 30 ml de fase aquosa por prensagem, o que limitava, portanto, a amplitude das análises que podiam ser realizadas, levou Salvat-Brunaud (1995) a construção de uma prensa hidráulica capaz de processar seis vezes mais a quantidade de queijo. Este material foi em seguida utilizado de acordo com um protocolo otimizado para a extração das fases aquosas de queijos Emmental em quatro fases da maturação. As fases aquosas foram caracterizadas sobre os planos bacteriológicos, físico-químicos e bioquímicos (SALVAT-BRUNAUD et al., 1995).

A aplicação da extração por pressão a diferentes tipos de queijos de massa dura permitiu demonstrar a atividade do coalho no queijo (Barthel et al. 1928b) e o crescimento dos teores de nitrogênio solúvel no decorrer da maturação (SANDBERG et al., 1930). Os teores de nitrogênio da fase aquosa extraídas de queijos como Emmental, Edam, Roquefort, Limburgo e Stilton foram avaliados (Sandberg et al., 1930), bem como analisados a evolução dos teores em lactose e ácido láctico do Cheddar (Mc Dowall e Dolby, 1936), e NaCl, Nitrogênio, Ca e P de queijo Edam durante a maturação (Monib, 1962, citado por Morris et al. 1988).

2.5.2. Desenvolvimento do método de extração

Barthel et al.(1928) acreditava que o papel desempenhado pelo coalho e pela microbiota presente no queijo não tinham sido definidos claramente porque essas duas ações são simultâneas e não poderiam ser estudadas separadamente.

O método convencional de nitrogênio, consistia essencialmente na determinação do nitrogênio total, nitrogênio solúvel, nitrogênio não solúvel e nitrogênio amoniacal de uma amostra de queijo extraído em água (Bather et al., 1928^a). Para este autor é possível que a extração com água provoque uma mudança no equilíbrio físico-químico existente na massa do queijo, podendo provocar alteração nos resultados das análises.

De acordo com Sandberg et al. (1930) a extração da massa de queijo por água altera o equilíbrio físico-químico e quando existem quantidades consideráveis de NaCl no queijo, a paracaseína é mais solúvel em água. Ainda de acordo com este autor, durante a maturação em alguns queijos são formadas substâncias proteicas em formato de globulinas, que são solúveis na fase aquosa, mas são precipitadas na extração do queijo com água. Segundo Bather et al. (1928), uma maneira de tentar resolver o problema mais diretamente, foi estudar a extração do queijo como é naturalmente dentro da massa de queijo.

Bather et al. (1928) procuraram obter um líquido, submetendo o queijo a uma forte pressão mecânica, depois de ter previamente misturado a massa do queijo com areia fina. Com os experimentos realizados observaram que sendo a massa do queijo muito elástica, sem a adição de areia a massa não eliminava nenhuma gota de líquido, mesmo a alta pressão, e ainda a massa saía pelas aberturas da forma.

Barther et al. (1930) encontrou uma taxa favorável entre a massa do queijo e a quantidade de areia (Tabela 1). Estudaram um queijo duro com maturação de dois meses. Foi utilizada uma prensa manual com capacidade de pressão máxima de 30.000 Kg/s.

Tabela 1: Resultados de experimentos da influência de diferentes proporções de queijo e areia sobre a quantidade de líquido obtido

Peso de queijo (g)	Peso de areia(g)	Proporção de queijo/areia	Quantidade de fase aquosa (mL)	Teor de água No queijo
1.000	0	1/0	0,0	53,5
1.000	650	1/0,65	3,5	52,3
1.000	1.000	1/1	12,0	51,5
1.000	2.000	1/2	62,0	52,0
1.000	3.000	1/3	44,0	-

A proporção entre areia e queijo mais favorável foi de 1/2. A areia tem duas funções básicas: primeiro, dá ao sistema estabilidade, reduzindo a elasticidade da massa, e segundo, serve como um filtro para a massa de queijo não ir para fora do cilindro. Barther et al. (1928) concluiu a partir de experimentos que a composição da fase aquosa do queijo é uniforme em toda massa do queijo e que o tecido utilizado não retém nitrogênio por adesão.

Segundo Thierry et al. (1998), este método para extração da fase aquosa por prensagem tem várias vantagens para acompanhar as alterações bioquímicas no queijo, permitindo avaliar as mudanças minerais entre a rede de paracaseína e a fase aquosa durante a maturação do queijo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laticínios Escola - Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE), no Laboratório de Leite e Derivados e no Laboratório de Culturas Lácticas no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

3.1 Culturas iniciadoras

Para fabricação dos queijos com olhaduras, foram adicionadas no leite culturas lácticas termofílicas contendo *Lactobacillus helveticus*, *S. thermophilus* e bactérias mesofílicas, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, adquiridas na CHR HANSEN BRASIL. Essas culturas foram diluídas em Leite Desnatado Reconstituído (LDR) estéril e armazenadas a temperatura de -20°C. As quantidades de culturas adicionadas no queijo foram de acordo com o especificado pelo fabricante.

3.2 Culturas NSLAB

As bactérias lácticas não *starter* (NSLAB) *Enterococcus durans* ATCC 6056 e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 foram fornecidas pelo laboratório de micro-organismos de referência na Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Para reidratação e ativação do *Enterococcus durans* foi utilizado o meio de cultura MRS, e para o *Lactobacillus rhamnosus* o meio Brain Heart Infusion (BHI). Após ativação, as culturas foram armazenadas a temperatura de -20 °C. A quantidade adicionada das culturas NSLAB foi de acordo com Bouton et al. (2009) que descreve uma quantidade de 10^3 UFC/ml de bactérias no leite.

3.1.Tecnologia de fabricação

Os queijos com olhaduras, fabricado com leite pasteurizado e com leite cru microfiltrado, foram produzidos de acordo com o fluxograma (Figura 3) (FURTADO, 2007). No processo de microfiltração do leite para fabricação do queijo, o leite cru foi desnatado, aquecido a 50 °C e microfiltrado em membrana com geometria cilíndrica tubular de cerâmica e óxido de zircônia (Marca Membralox) com tamanho de poro de 1,4µm. O creme obtido no desnate foi esterilizado em autoclave a 115 °C por 15 minutos, resfriado até a temperatura de 40 °C e misturado ao leite desnatado microfiltrado para fabricação do queijo. Os queijos foram produzidos em peças de 3 Kg a partir de 130 litros de leite com teor de gordura de 3,3 % .

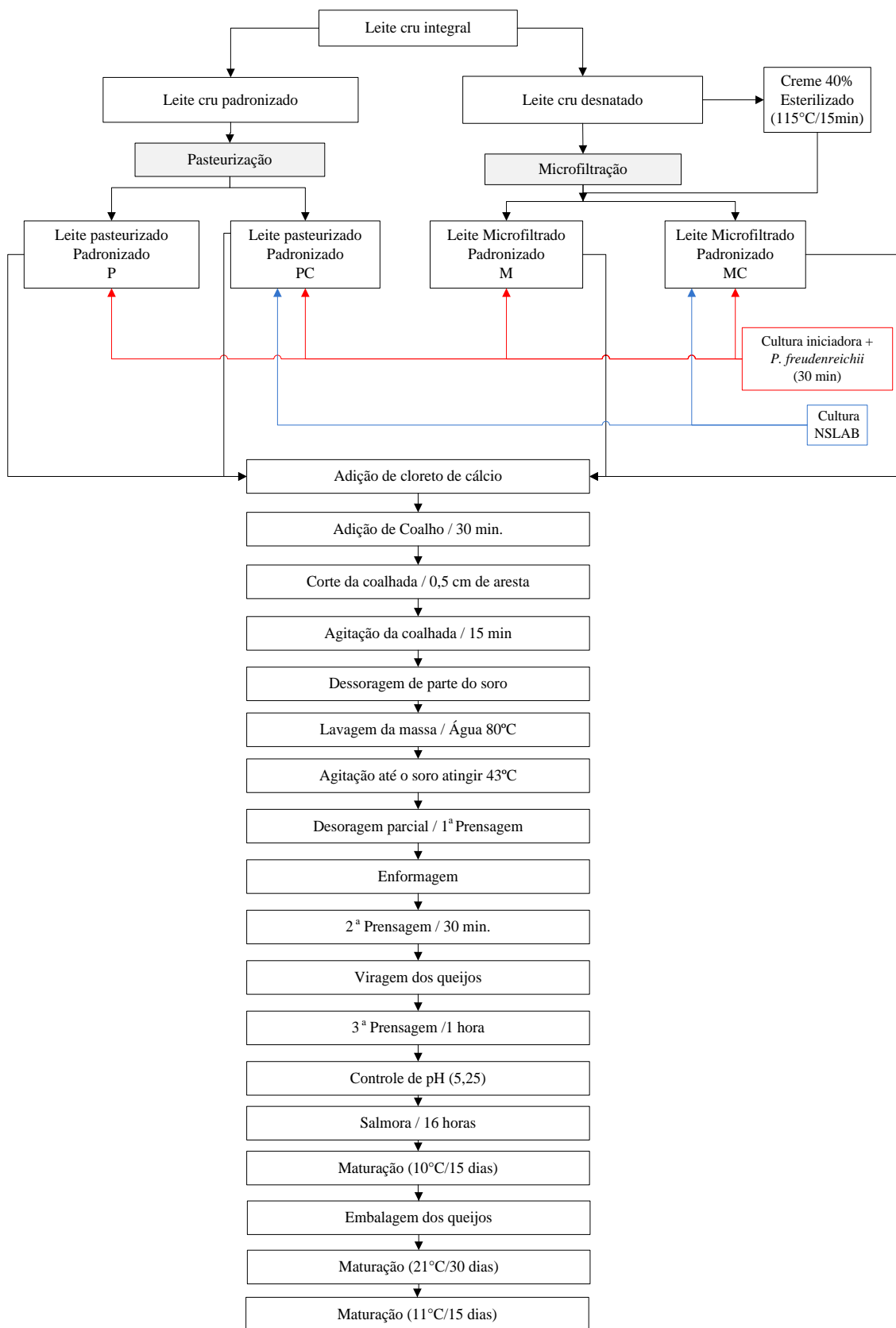


Figura 3 - Fluxograma de produção de queijo com olhaduras

3.4. Extração da fase aquosa do queijo com olhaduras

A extração da fase aquosa dos queijos com olhaduras, obedeceu à metodologia descrita por Salvat-Brunaud et al. (1995). Os queijos foram ralados e 1.800 g misturados a 3.600 g de areia com granulometria entre 150 a 250 μm . A mistura foi colocada em uma tela descartável (tela de filtro, Smith and Nephew extruded Films LTDA) e em seguida em um molde de inox perfurado que permite o escoamento da fase aquosa. Esse molde foi então colocado em uma placa de aço inoxidável e prensado durante 180 minutos usando uma prensa hidráulica (ABF technology – França) (Figura 4). O cálculo do rendimento da fase aquosa e o aumento de pressão na prensa hidráulica foram realizados de acordo com Salvat-Brunaud et al.(1995). A fase aquosa foi então filtrada em papel de filtro (Whatman nº 41) e amostras de aproximadamente 100 mL foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguida de degelo em câmara fria ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) no momento da análise.



Figura 4 – Prensa hidráulica utilizada para obtenção da fase aquosa a partir do queijo com olhaduras misturado com areia.

3.5. Análises físico-químicas no leite

3.5.1. Determinação de acidez titulável, gordura, pH e proteína

Para determinação da acidez titulável, gordura, pH e proteína do leite destinado à fabricação do queijo com olhaduras, foram utilizados os métodos oficiais, descritos na Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006.

Análises físico-químicas no queijo e na fase aquosa

As análises físico-químicas no queijo e na fase aquosa foram realizadas em quatro estágios de maturação: saída da salmoura (2 dias de fabricação), saída da câmara fria e entrada na câmara quente (15 dias), saída da câmara quente e entrada da câmara fria (45 dias) e, saída da câmara fria (60 dias). As análises do teor de gordura, extrato seco total, proteína e gordura no extrato seco no queijo foram realizadas apenas no primeiro estágio.

3.6 Análises realizadas no queijo

3.6.1 Determinação da atividade de água

A determinação da atividade de água foi realizada, utilizando-se medidor digital Aqualab modelo CX2T – Decagon Devices.

3.6.2 Acidez titulável

Esta técnica baseia-se na extração de ácido livres solúveis em água a 40°C e neutralizados até o ponto de equivalência, com solução alcalina de concentração conhecida, utilizando-se com solução indicadora a fenolftaleína 1 % (BRASIL, 2006). O resultado foi expresso em % de ácido láctico e dado pela fórmula:

$$\% \text{ Ácido láctico} = \frac{V \times f \times 0,9}{m} \quad \text{Equação (2)}$$

Sendo:

V= volume da solução de hidróxido de sódio 0,1N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1N; e

m = massa da amostra na alíquota, em gramas.

3.6.3. Determinação de gordura

A gordura do queijo foi realizada pelo método butirômétrico com butirômetro específico para queijo (Brasil, 2006).

3.6.4. Determinação de gordura no extrato seco

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

$$\% \text{GES} = \frac{\% \text{GD}}{\% \text{ES}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

3.6.5. Extensão de maturação

A extensão de maturação foi calculada indiretamente por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e nitrogênio total (NT), multiplicando o resultado por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

$$\text{EM} = \frac{(\text{NSpH4,6})}{\text{NT}} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

3.6.6. Profundidade de maturação

A profundidade de maturação (PM) foi quantificada de forma indireta por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA 12%) e nitrogênio total (NT), multiplicando-se o resultado por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

$$\text{PM} = \frac{(\text{NSTCA 12\%})}{\text{NT}} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

3.7. Análises realizadas no queijo e na fase aquosa

3.7.1. Cloreto de sódio

O Cloreto de sódio foi determinado pelo método de extração a partir das cinzas (BRASIL, 2006). Para avaliação da difusão de sal na massa do queijo a análise foi realizada no centro, na casca e no queijo homogêneo durante período de maturação. O resultado foi obtido a partir da fórmula abaixo:

$$\%NaCl = \frac{V \times f \times N \times 0,0585}{m} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Sendo:

V = volume da solução de nitrato de prata 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de nitrato de prata 0,1 N;

m = massa da amostra, em gramas;

N = normalidade da solução de nitrato de prata 0,1 N;

0,0585 = miliequivalente-grama do cloreto de sódio.

3.7.2. Determinação de umidade e extrato seco

Para determinação do teor de umidade, adotou-se o procedimento gravimétrico em estufa a 105°C, conforme descrito em (FIL- IDF 4a, 1982). O resíduo obtido após evaporação representou o extrato seco da amostra. O resultado foi obtido a partir da fórmula abaixo:

$$\% \text{ Umidade} = 100 - ES \quad \text{Equação (7)}$$

$$\% \text{ Extrato seco} = \frac{m_2 - T}{m_1} \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

Sendo:

m_1 = placa com areia, bastão e adição da amostra;

m_2 = placa com areia, bastão e amostra após incineração;

T = Tara da placa com areia e bastão.

3.7.3. Cinzas

Baseia-se na eliminação da matéria orgânica a temperatura de 550°C (Brasil, 2006). O produto obtido é denominado de resíduo mineral fixo ou cinzas. O resultado foi obtido a partir da fórmula abaixo:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{(m_2 - m_1)}{m_0} \times 100 \quad \text{Equação (9)}$$

Sendo:

m_2 = massa do cadinho com amostra após incineração, em gramas;

m_1 = massa do cadinho vazio, em gramas;

m_0 = massa da amostra, em gramas.

3.7.4. pH

A determinação do pH do queijo com olhaduras foi realizada pelo método potenciométrico utilizando-se medidor de pH modelo Tecnal, pH Meter Tec-2, introduzindo-se o eletrodo na parte interna do queijo (FIL- IDF, 115a, 1989).

3.7.5. Proteína total

A proteína total (PT) foi determinada por meio da dosagem de Nitrogênio realizada pelo método Kjeldhal multiplicando-se o percentual de nitrogênio total (NT) pelo fator de conversão 6,38, indicado para proteína derivada de leite (IDF-FIL 20b, 1982).

3.7.6. Nitrogênio Solúvel em pH 4,6 (NCN) e Nitrogênio Solúvel em TCA 12 % (NPN)

O teor de NCN foi determinado em filtrado obtido a partir da fase aquosa acidificada a pH 4,6 utilizando ácido clorídrico 1,41 mol/L. A concentração de NPN foi mensurada em filtrado obtido pela diluição das amostras com volume duas vezes maior de TCA 24% (m/v). O teor de nitrogênio foi determinado segundo método de Kjeldahl (FIL 20B:1993).

3.7.7. Análises de ácidos orgânicos

O ácido láctico, acético, butírico, propiônico, foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise foi realizada em Cromatógrafo (HPLC), marca SHIMADZU, modelo SPD-10A VP acoplado ao Detector Ultra Violeta (UV) utilizando-se um comprimento de ondas 210 nm e coluna C18. A fase móvel utilizado foi uma solução de água com 1% de ácido fosfórico até pH de 4,5 (Mullin e Emmons, 1997).

Preparo das amostras

Para extração dos ácidos orgânicos foram pesados 0,5 g de queijo em um béquer de 100 mL adicionado de 50 mL de água destilada a 50 °C e homogeneizado com bastão magnético com máxima agitação por 5 min. Logo após o béquer com amostra foi transferido para um Banho Maria a 50 °C com agitação suave. Uma parcela de 10 mL da solução foi retirada com seringa abaixo da superfície para evitar a inclusão de gordura. Uma unidade filtrante de 0,45U de poro, 13 mm (Millipore) foi anexada ao conector da seringa, o liquido foi então forçado a passar pelo filtro. O filtrado foi então congelado a -20 °C e posteriormente analisado em HPLC.

Para extração dos ácidos orgânicos da fase aquosa foi colocado 1 mL de fase aquosa em um béquer de 100 mL adicionado de 50 mL de água destilada a 50 °C e homogeneizado com bastão magnético com agitação máxima por 5 min. Uma parcela de 10 mL da solução foi retirada com seringa abaixo da superfície para evitar a inclusão de gordura. Uma unidade filtrante de 0,45 U de poro, 13 mm (Millipore) foi anexada ao conector da seringa, o liquido foi então forçado a passar pelo filtro. O filtrado foi congelado a - 20 °C e posteriormente analisado em HPLC (Mullin e Emmons, 1997).

3.8. Análises microbiológicas no leite

Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas para o leite cru padronizado, leite desnatado, leite microfiltrado, leite microfiltrado padronizado e leite pasteurizado.

3.8.1. Contagem de micro-organismos mesófilos e anaeróbicos facultativos

Para a contagem padrão em placas, utilizou-se o método Petrifilm Aerobic Count Plate, 3M, NM –USA (AOAC 991.12 - Contagem de Aeróbicos em Alimentos, Filme Reidratável Seco).

3.8.2. Contagem de coliforme a 30°C e *Escherichia coli*

Para a contagem de Coliformes a 30°C e *E. coli.*, utilizou-se o método Petrifilm Coliformes/*E. coli*, 3M, NM –USA (AOAC 991.14 - Contagem de Coliforme e *E. coli* em alimentos, Película Reidratável seca) conforme recomendação pelo fabricante.

3.8.3. Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para contagem de *Staphylococcus aureus*, utilizou-se Petrifilm Staph Express Count Plate, 3M, NM –USA (AOAC 2003.08 – Método para Contagem de *Staphylococcus aureus* em Laticínios) conforme recomendação pelo fabricante.

3.8.4. Presença de esporulados

Para contagem de esporos do leite foi utilizada a metodologia segundo Standard Methods (Wehr e Frank, 2004). O meio de cultura utilizado foi restrito para *Clostridium* sp, Reinforced Clostridial Agar (RCM) (SENYK, 1989).

3.9. Análises microbiológicas no creme

3.9.1. Contagem de micro-organismos mesófilos e anaeróbicos facultativos

Para a contagem padrão em placas, utilizou-se o método Petrifilm Aerobic Count Plate 3M, NM –USA (AOAC 991.12 - Contagem de Aeróbicos em Alimentos, Filme Reidratável Seco) conforme recomendação pelo fabricante.

3.9.2. Contagem de coliforme 30°C e *Escherichia coli*

Para a contagem de Coliformes a 30°C e *E. coli.*, utilizou-se o método Petrifilm Coliformes/*E. coli.* 3M, NM – USA (AOAC 991.14 - Contagem de Coliforme e *E. coli* em alimentos, Película Reidratável seca) conforme recomendação pelo fabricante.

3.9.3. Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para contagem de *Staphylococcus aureus*, utilizou-se Petrifilm Staph Express Count Plate, 3M, NM –USA (AOAC 2003.08 – Método para Contagem de *Staphylococcus aureus* em Laticínios) conforme recomendação pelo fabricante.

3.9.4. Presença de esporulados

Para contagem de esporos do creme foi utilizado a metodologia segundo Standard Methods (Wehr e Frank, 2004). O meio de cultura utilizado foi restrito para *Clostridium* sp, Reinforced Clostridial Agar (RCM) (SENYK, 1989).

3.10. Análises microbiológicas no queijo

Preparo das amostras

Para o preparo do homogenato, 25g de queijo foram diluídas em 225 mL de água salina 0,85% esterilizada e posteriormente homogeneizada em um stomacher, por 2 minutos. Foram realizadas diluições decimais e em seguida os plaqueamentos em duplicata para cada diluição. As análises microbiológicas dos queijos foram realizadas após um dia de fabricação.

3.10.1. Contagem de coliforme 30°C e *Escherichia coli*

Para a contagem de coliformes a 30°C e *E. coli.*, utilizou-se o método Petrifilm Coliformes/*E. coli.* 3M, NM –USA (AOAC 991.14 - Contagem de Coliforme e *E. coli* em alimentos, Película Reidratável seca) conforme recomendação pelo fabricante.

3.10.2. Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para contagem de *Staphylococcus aureus*, utilizou-se Petrifilm Staph Express Count Plate, 3M, NM –USA (AOAC 2003.08 – Método para Contagem de *Staphylococcus aureus* em Laticínios) conforme recomendação pelo fabricante.

3.10.3. Presença de *Salmonella* sp.

Análises conduzidas conforme constante na IN nº 62 de 26 de agosto de 2003 do ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

3.10.4. Presença de *Listeria monocytogenes*

Análises conduzidas conforme constante na IN nº 62 de 26 de agosto de 2003 do ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

3.10.5. Presença de esporulado

Para contagem de esporos do queijo foi utilizado a metodologia segundo Standard Methods (Wehr e Frank, 2004). O meio de cultura utilizado foi restrito para *Clostridium* sp, Reinforced Clostridial Agar (RCM) (SENYK, 1989).

3.11. Avaliação sensorial

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

As amostras de queijo com 60 dias de maturação foram avaliadas quanto a aceitação, por 100 provadores selecionados pelo hábito de consumo de queijo com olhaduras, em relação aos atributos sabor, textura e impressão global.

Foram apresentadas aos provadores, as amostras contendo aproximadamente 30 g de queijo de cada tratamento à temperatura de 20°C, devidamente codificadas com três dígitos e servidas de modo aleatório. Um copo de água filtrada e uma uva foram fornecidos aos provadores para enxaguar a boca e diminuir a interferência entre as amostras.

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

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

3.12. Delineamento experimental

O leite utilizado para fabricação dos queijos experimentais foi obtido de produtores da região de Viçosa, Minas Gerais. O experimento constou dos seguintes tratamentos: produção de queijo com olhaduras a partir de leite pasteurizado (P); produção de queijo com olhaduras a partir de leite pasteurizado adicionado de cultura NSLAB (PC); produção de queijo com olhaduras a partir de leite microfiltrado (M); e produção de queijo com olhaduras a partir de leite microfiltrado adicionado de cultura NSLAB (MC). Nos quatro tratamentos foram adicionadas culturas iniciadoras e *Propionibacterium freudenreichii*.

Os resultados foram submetidos à análise de variância com delineamento em blocos casualizados (DBC), cada unidade experimental foi representada por um tanque de fabricação de queijo com três repetições. Para análises dos resultados utilizou-se o programa SAS (*Statistical Analysis System*), versão 9.2, licenciado para Universidade Federal de Viçosa (SAS, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características físico-químicas do leite utilizado na fabricação do queijo

Os dados referentes à gordura, pH, acidez, e proteína do leite utilizado na fabricação dos queijos apresentam-se na Tabela 2. De acordo com os resultados pode-se observar que o leite cru microfiltrado padronizado e o leite pasteurizado encontraram-se com características semelhantes e segundo FURTADO (2007) com características físico-químicas adequadas para fabricação de queijo com olhaduras.

Tabela 2 - Valores médios das análises de gordura, pH, acidez e proteína do leite empregado na fabricação dos queijos com olhaduras

Amostras	Gordura (%)	pH	Acidez (%AL)	Proteína (%)
Leite cru padronizado	3,33 ($\pm 0,15$)	6,73 ($\pm 0,04$)	0,15 ($\pm 0,01$)	3,11 ($\pm 0,01$)
Leite cru desnatado	0,10 ($\pm 0,00$)	6,66 ($\pm 0,01$)	0,15 ($\pm 0,01$)	3,10 ($\pm 0,10$)
Leite pasteurizado	3,30 ($\pm 0,10$)	6,73 ($\pm 0,03$)	0,16 ($\pm 0,00$)	3,08 ($\pm 0,11$)
Leite microfiltrado	0,00 ($\pm 0,00$)	6,64 ($\pm 0,06$)	0,15 ($\pm 0,01$)	2,96 ($\pm 0,09$)
Leite microfiltrado padronizado	3,33 ($\pm 0,25$)	6,77 ($\pm 0,04$)	0,15 ($\pm 0,01$)	3,00 ($\pm 0,10$)

Dados de três repetições realizadas em duplicata.

4.2. Análises físico-químicas do queijo com olhaduras após dois dias de fabricação

Os teores de gordura, extrato seco, gordura no extrato seco, cinzas e proteína dos queijos com olhaduras encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios das análises de gordura, extrato seco, cinzas e proteína dos queijos com olhaduras com dois dias de fabricação

Análises\ Tratamentos	P	PC	M	MC
Gordura (%)	29,20 ($\pm 1,04$)	29,00 ($\pm 0,50$)	29,50 ($\pm 1,32$)	29,80 ($\pm 0,76$)
Extrato seco (%)	59,74 ($\pm 0,74$)	59,73 ($\pm 0,05$)	60,56 ($\pm 0,56$)	60,66 (0,29)
Cinzas (%)	3,72 ($\pm 0,45$)	3,88 ($\pm 0,28$)	4,06 ($\pm 0,40$)	3,76 ($\pm 0,48$)
GES (%)	48,52 ($\pm 1,12$)	49,22 ($\pm 1,21$)	48,95 ($\pm 1,03$)	48,33 ($\pm 1,56$)
Proteína (%)	22,01 ($\pm 0,31$)	22,06 ($\pm 0,20$)	22,00 ($\pm 0,24$)	22,00 ($\pm 0,38$)

Dados de três repetições realizadas em duplicata

GES: Gordura no extrato seco

P: queijo produzido com leite pasteurizado; PC: queijo produzido com leite pasteurizado adicionado de cultura; M: queijo

Produzido com leite microfiltrado; MC: queijo produzido com leite microfiltrado adicionado de cultura.

Os resultados encontraram-se dentro da faixa considerada normal para queijos com olhaduras, de acordo com BEUVIER (1997), não apresentando grandes variações entre os tratamentos. Os teores de proteína e extrato seco dos quatro tratamentos apresentaram-se menores que os citados por Furtado (2007) e Thierry (1998). Porém estes resultados não influenciaram as características finais dos queijos.

Extração da fase aquosa

Na extração da fase aquosa do queijo o aumento da pressão da prensa hidráulica foi realizado lentamente, seguindo uma cinética de fluxo descrita por Salvat-Brunaud et al. (1995). A cinética de fluxo da fase aquosa variou dependendo do estágio da maturação do queijo (Figura 4), quanto mais longa a maturação do queijo, mais lento foi o fluxo da fase aquosa e mais rápido o fluxo da fase lipídica. Segundo Thierry et al. (1998) essas variações refletem diferenças na organização estruturais do queijo devido às mudanças na composição e possíveis rearranjos moleculares.

O fluxo da fase lipídica depende do estado do glóbulo de gordura, a deterioração da sua membrana durante a maturação pode facilitar a extração da fase lipídica. Foi obtido um volume de 40 a 180 mL de fase lipídica e 190 a 300 mL da fase aquosa, dependendo do estágio de maturação.

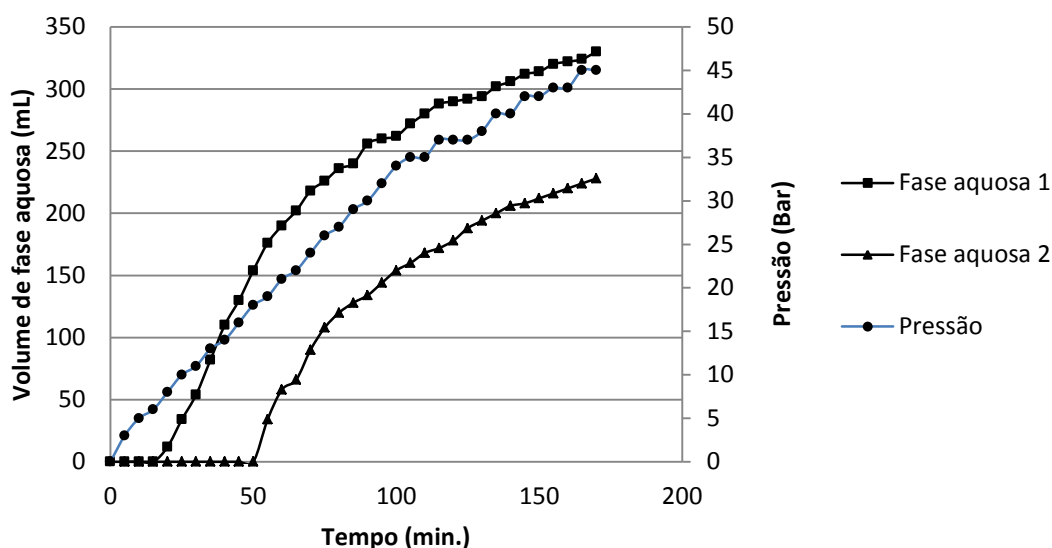


Figura 4 – Cinética de fluxo da fase aquosa extraído de 1800g de queijo com olhadura: (—■—) fase aquosa do queijo fresco; (—▲—) fase aquosa do queijo com 60 dias de maturação; (—●—) pressão exercida durante prensagem.

A média do rendimento da fase lipídica foi de 9,05 % variando de 7,38 a 16,71%. A fase aquosa obteve um rendimento de 13,28 % ou 239 g obtidos de 1800 g de queijo. Como comentado anteriormente este rendimento é variável e depende do estágio da maturação. Os resultados obtidos do rendimento da fase aquosa estão acima dos encontrados por Salvat-Brunaud et al.(1995) que obteve uma média de 8,9% de fase aquosa.

4.3. Características físico-químicas do queijo durante período de maturação.

Atividade de água

Com relação a atividade de água (Figura 5) não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos, mas foi significativo ($P < 0,05$) em consideração o tempo de maturação dos queijos.

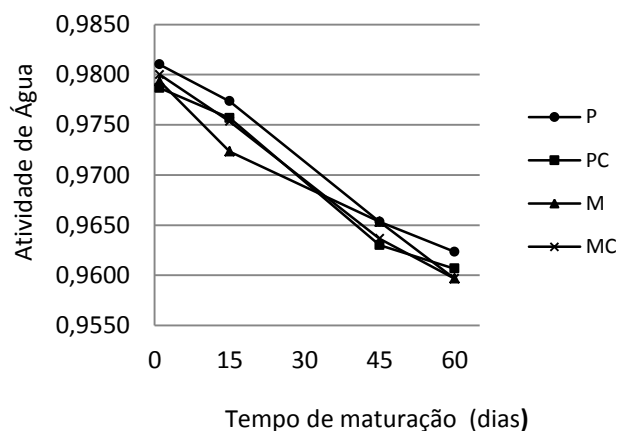


Figura 5 - Evolução dos resultados da atividade de água dos queijos em função do tempo de maturação.

A atividade de água de um queijo tende a baixar à medida que avança sua maturação, isto se deve a fenômenos bioquímicos que liberam eletrólitos, compostos ionizados e outros elementos solúveis em água e a evaporação da água do queijo que é considerada baixa devido a embalagem dos queijos. É importante que a atividade de água do queijo com olhaduras esteja acima de 0,955, pois este é o limite para a multiplicação das bactérias *Propionicbacterium*.

Acidez

Os parâmetros da acidez titulável apresentaram diferença ($P < 0,05$) em relação ao tempo de maturação para os 4 tratamentos. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) de acidez titulável entre os tratamentos. Pode-se observar na Figura 6, que até 15 dias de maturação em temperaturas baixas ocorre um declínio da acidez titulável, o que segundo Kosikowisk (1977) é explicado pela conversão do ácido láctico em lactato de cálcio em presença de cálcio. No entanto, a temperatura de 21°C no período de 15 a 45 dias de maturação ocorre um aumento da acidez, em função do aumento da velocidade das reações enzimáticas e metabólicas dos micro-organismos.

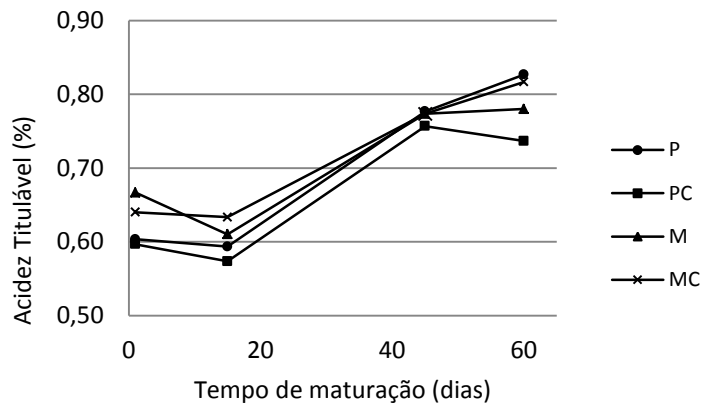


Figura 6 - Evolução dos resultados da acidez dos queijos em função do tempo de maturação.

Extensão de maturação

A extensão da maturação é um fator indicativo da proteólise primária e ocorre principalmente pela ação proteolítica do coalho ou coagulante residual no queijo, sobre a α 1-caseína e, em menor escala sobre a β -caseína dando origem a peptídeos de alto e médio peso molecular (FOX, 1989).

O Índice de extensão de maturação (Figura 7) variou ($P < 0,05$) ao longo do período de maturação dos queijos. Pode-se observar um aumento acelerado entre os dias 15 a 45 de maturação a temperatura de 21°C. FOX (1993) relata que a temperatura mais elevada favorece a proteólise primária, representada pelo NS em pH 4,6, formado pela hidrólise das proteínas durante a maturação dos queijos, envolvendo primeiramente a conversão da caseína em grandes peptídeos, principalmente por causa da ação residual do agente coagulante sobre a α -s1, β e γ caseína. O Índice de extensão de maturação não apresentou diferença ($P > 0,05$) com relação aos tratamentos aplicados.

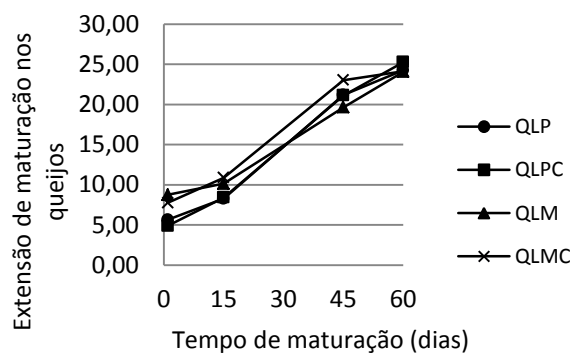


Figura 7 – Evolução da extensão de maturação dos queijos em função do tempo de maturação.

Profundidade de maturação

O índice de profundidade de maturação está relacionado com a presença de enzimas proteolíticas oriundas de micro-organismos, que hidrolisam os peptídeos resultantes da ação do coalho e da plasmina sobre as caseínas (FOX, 1989).

O aumento nos valores dos índices de profundidade da maturação dos queijos diferiu ($P < 0,05$) durante todo período de estocagem. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Pode-se observar (Figura 8) no queijo fabricado com leite microfiltrado e adicionado de cultura NSLAB (MC) um teor elevado no índice de profundidade de maturação aos sessenta dias de estocagem. Esses teores podem ser explicados pela ação dessas culturas, aumentando a presença de substâncias de baixo peso molecular (aminoácido, oligopeptídeos, aminase outros compostos), também responsáveis pelo sabor e aroma dos queijos, acumuladas durante o período de maturação, principalmente em virtude da ação proteolítica das enzimas desses micro-organismos. Lynch et al. (1996) relataram que *Lactobacillus* atuam no desenvolvimento do sabor e aroma do queijo Cheddar, realçando aumento da proteólise durante período de maturação.

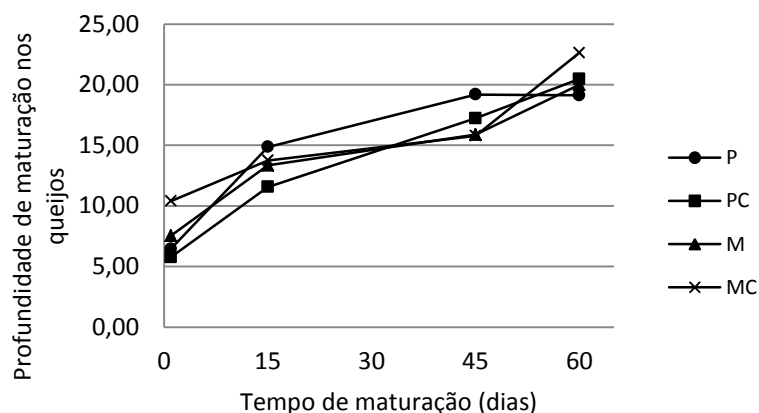


Figura 8 – Evolução da profundidade de maturação dos queijos em função do tempo.

4.3 Características físico-químicas do queijo e na fase aquosa durante período de maturação.

Cloreto de sódio (NaCl)

O aumento do teor de cloreto de sódio diferiu ($P < 0,05$) ao longo dos sessenta dias de maturação (Figura 9). O aumento está relacionado com a diminuição da umidade e atividade de água do queijo ao longo da maturação. O teor de sal não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos, tendo um valor de aproximadamente 0,8% estando de acordo com o indicado por FURTADO

(2007) para queijo com olhaduras, pois a presença de cloreto de sódio acima deste valor exerce uma ação negativa para a microbiota de *Propionicbacterium* responsáveis pela formação de olhaduras no queijo.

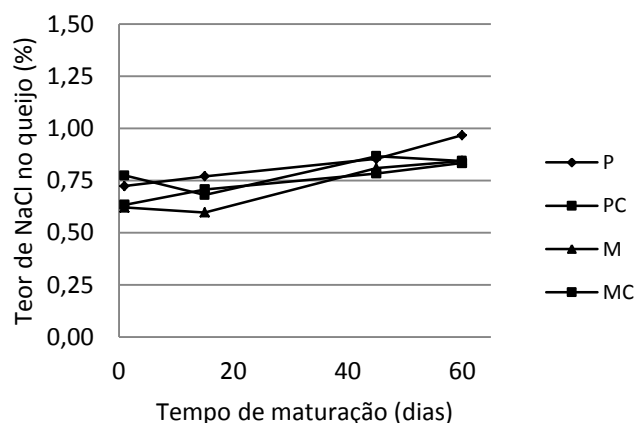


Figura 9 - Evolução do teor de cloreto de sódio em queijos com olhaduras em função do tempo de maturação.

O teor de NaCl nos queijos, tanto na casca, quanto no centro do queijo (Figuras 10 e 11) foi diferente ($P < 0,05$) durante a maturação, porém não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Pode-se observar que nos primeiros quinze dias a porcentagem de sal presente na casca do queijo aproximou-se do teor de sal do queijo homogêneo com aproximadamente 0,8 % de sal. Já no centro do queijo com 15 dias de fabricação o teor de sal foi de 0,10 a 0,15%. A baixa concentração de sal no centro aliada a outras características como pH acima de 5,3 e temperatura de 18 a 20°C favorece o crescimento de *Clostridium tyrobutiricum*, o principal agente causador de estufamento tardio em queijos devido sua sensibilidade à presença de sal.

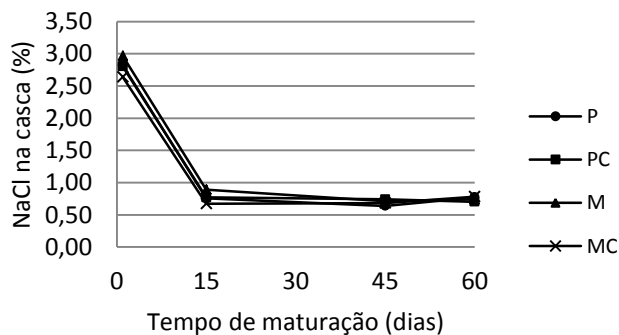


Figura 10 - Evolução do teor de NaCl na casca dos queijos em função do tempo de maturação.

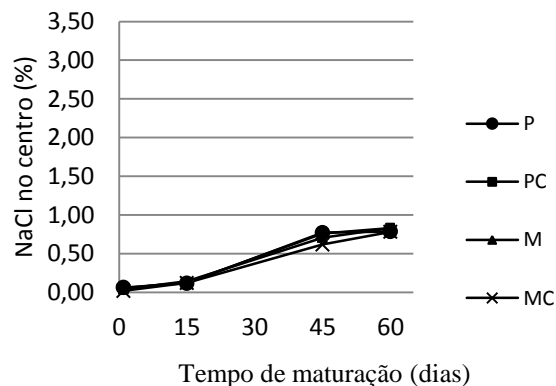


Figura 11 - Evolução do teor de NaCl no centro dos queijos em função do tempo de maturação.

Os resultados do teor de cloreto de sódio na fase aquosa dos queijos (Figura 12) não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos, ficando entre 2,30 a 2,73% sendo superiores ($P<0,05$) àqueles obtidos diretamente do queijo (1,70 a 2,40%) (Figura 13). Segundo Furtado (2007), o sal é um inibidor da fermentação propiônica, por aumentar a fase de crescimento exponencial da microbiota e o tempo de multiplicação celular, reduzindo a contagem total e o metabolismo celular. De acordo com o mesmo autor o nível crítico para queijos com olhaduras é de apenas 3% de sal na umidade do queijo. Esse valor está relacionado com a baixa tolerância a sal do *Propionibacterium*, micro-organismo responsável pela formação de olhaduras nos queijos.

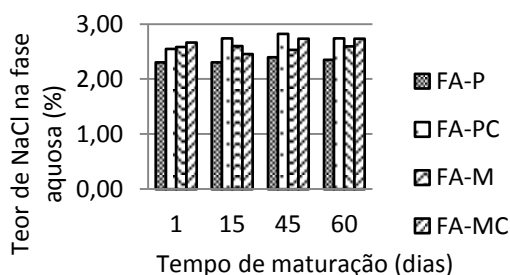


Figura 12 - Evolução do teor de sal na fase aquosa dos queijos em função do tempo de maturação.

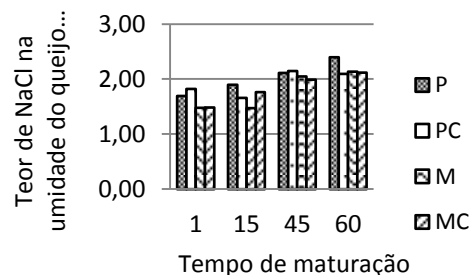


Figura 13 - Evolução do teor de NaCl na umidade dos queijos em função do tempo de maturação.

Umidade

A diminuição do teor de umidade (Figura 14) diferiu ($P < 0,05$) ao longo dos sessenta dias de maturação, não diferindo ($P > 0,05$) entre os tratamentos, indicando, que o processo de microfiltração do leite para fabricação do queijo não interfere no teor de umidade dos queijos. A diminuição da umidade nos primeiros 15 dias esta relacionada com a evaporação da água do queijo em câmara fria. Depois do queijo embalado a evaporação diminui, neste caso o abaixamento da umidade se deve a proteólise durante processo de maturação do queijo. Os compostos formados durante processo de proteólise reagem com a água presente diminuindo, conseqüentemente, o conteúdo de água nos queijos.

O teor de umidade no queijo com olhaduras é importante não somente para formação de olhaduras, mas também para outras características como a textura, atividade de água, intensidade e aceleração da proteólise (FURTADO, 2007).

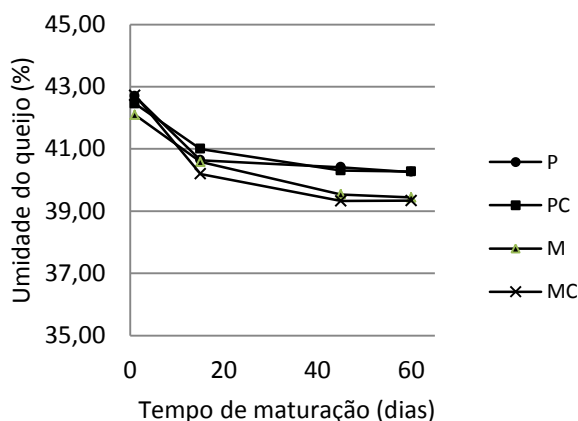


Figura 14 - Evolução do teor da umidade nos queijos em função do tempo de maturação.

O teor de umidade da fase aquosa do queijo (Figura 15) diminuiu ($P < 0,05$) para os quatro tratamentos durante o tempo de maturação. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os quatro tratamentos. Esta inclinação está relacionada com o desenvolvimento da proteólise do queijo durante período de maturação.

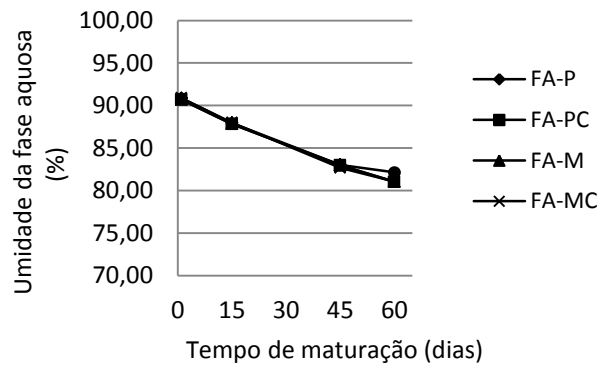


Figura 15 - Evolução do teor de umidade da fase aquosa dos queijos em função do tempo de maturação.

Os teores de extrato seco dos queijos (Tabela 4) diferiram ($P < 0,05$) ao longo do tempo de maturação. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos analisados. Os resultados foram compatível com os resultados obtidos por Salvat-Brunaud et al. (1995) e Lucey et al. (1993). Pode-se observar que os teores do extrato seco da fase aquosa do estágio D, praticamente duplicaram em relação ao estágio A. De acordo com Thierry et al. (1998) este aumento do extrato seco está vinculado à proteólise na câmara quente, devido a solubilização de compostos nitrogenados.

Tabela 4 - Resultado do extrato seco da fase aquosa nos quatro estágios de maturação dos queijos

Amostras	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
FA-P	9,14 ($\pm 0,40$) ^a	12,05 ($\pm 0,50$) ^b	16,98 ($\pm 0,75$) ^c	17,87 ($\pm 0,28$) ^d
FA-PC	9,31 ($\pm 0,26$) ^a	12,18 ($\pm 0,32$) ^b	17,05 ($\pm 0,21$) ^c	18,99 ($\pm 0,49$) ^d
FA-M	9,30 ($\pm 0,52$) ^a	12,17 ($\pm 0,78$) ^b	17,05 ($\pm 0,28$) ^c	18,97 ($\pm 0,49$) ^d
FA-MC	9,11 ($\pm 0,51$) ^a	12,01 ($\pm 0,44$) ^b	17,35 ($\pm 0,48$) ^c	18,65 ($\pm 0,80$) ^d

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, para cada variável, não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Estágios: (A) saída da salmoura (2 dias), (B) saída da câmara fria e entrada na câmara quente (15 dias), (C) saída da câmara quente e entrada da câmara fria (45 dias) e (D) saída da câmara fria, comercialização (60 dias).

pH

O aumento ($P < 0,05$) dos valores de pH (Figura 16) durante a maturação dos queijos, pode ser decorrente da degradação protéica proveniente das atividades das enzimas produzidas pelo

micro-organismos, com formação de compostos nitrogenados alcalinos. Os queijos elaborados com adição de cultura NSLAB (PC e MC) apresentaram pH mais elevado ($P>0,05$) que os tratamentos P e M (não adicionados de NSLAB) o que pode ser explicado pela adição das culturas NSLAB que contribuíram no desenvolvimento da proteólise. Estes resultados estão de acordo com Bouton et al. (2009) que adicionou culturas de *Lactobacillus* e *Enterococcus* em queijo fabricado com leite microfiltrado e obteve resultados semelhantes.

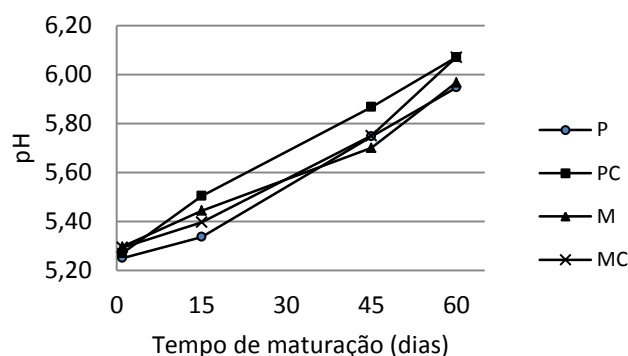


Figura 16 – Evolução do pH dos queijos em função do tempo de maturação.

O pH da fase aquosa aumentou ($P<0,05$) durante o período de maturação dos queijos (Tabela 5).

Tabela 5: Valores de pH da fase aquosa dos queijos nos quatro estágios de maturação

Amostras/ Tempo	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
FA-P	5,34 ($\pm 0,04$) ^a	5,58 ($\pm 0,06$) ^b	5,62 ($\pm 0,11$) ^c	5,77 ($\pm 0,05$) ^d
FA-PC	5,46 ($\pm 0,04$) ^b	5,57 ($\pm 0,02$) ^b	5,72 ($\pm 0,18$) ^b	5,90 ($\pm 0,02$) ^b
FA-M	5,33 ($\pm 0,28$) ^a	5,53 ($\pm 0,04$) ^a	5,77 ($\pm 0,05$) ^b	5,86 ($\pm 0,08$) ^b
FA-MC	5,47 ($\pm 0,08$) ^b	5,61 ($\pm 0,02$) ^b	5,85 ($\pm 0,01$) ^b	5,88 ($\pm 0,02$) ^b

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, para cada variável, não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Três repetições em duplicata

A: Fase aquosa obtida de queijos com 2 dias de fabricação; B: Fase aquosa obtida de queijos com 15 dias de fabricação; C: Fase aquosa obtida de queijos com 45 dias de fabricação; e D: Fase aquosa obtida de queijos com 60 dias de fabricação.

Os valores de pH da fase aquosa do tratamento FA-MC diferiram ($P < 0,05$) dos outros tratamentos. Nos tratamentos FA-PC e FA-MC obteve-se valor de pH mais elevado que os tratamentos FA-P e FA-M durante todo período de maturação, o que pode ser explicado pela adição das culturas NSLAB que contribuem do desenvolvimento da proteólise. Os resultados do pH da fase aquosa (Tabela 3) estão de acordo com os descritos por Salvat-Brunaud et al., (1995).

Proteína

Pode-se observar nos resultados referentes ao teor de proteína na fase aquosa (Figura 17) que a maturação em câmara quente multiplicou em 5 vezes o nitrogênio total atingindo um valor de aproximadamente 12% de proteína ($NT * 6,38$). Estes resultados estão de acordo com Salvat-Brunaud et al., (1995).

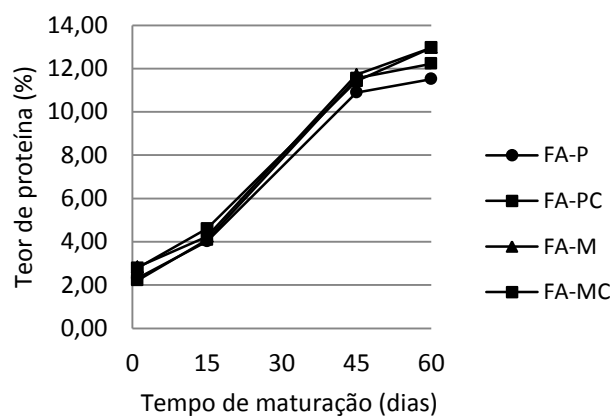


Figura 17 - Evolução do teor de proteína bruta da fase aquosa dos queijos em função do tempo de maturação.

O nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NCN) nos queijos e na fase aquosa (Figura 18 e 19) variou ($P < 0,05$) ao longo do período de maturação dos queijos. O teor de NCN não apresentou diferença ($P > 0,05$) com relação aos tratamentos aplicados. Pode-se observar um aumento acelerado entre os dias 15 a 45 de maturação a temperatura de 21°C. FOX (1993) relata que a temperatura mais elevada favorece a proteólise primária, representada pelo NS em pH 4,6, formada pela quebra das proteínas durante a maturação dos queijos, envolvendo primeiramente a conversão da caseína em grandes peptídeos, principalmente por causa da ação residual do agente coagulante sobre a α -s1, β e γ caseína. Os resultados no NCN da fase aquosa foram maiores,

diferindo ($P < 0,05$) daqueles encontrados utilizando a metodologia da dissolução do queijo em água e citrato.

O aumento nos valores de NPN nos queijos e na fase aquosa diferiu ($P < 0,05$) durante todo período de maturação. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Figura 20 e 21). Os resultados da fase aquosa foram superiores, diferindo ($P < 0,05$) daqueles encontrados utilizando a metodologia da dissolução do queijo em água e citrato. O nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético está relacionado à presença de enzimas proteolíticas oriundas de micro-organismos, que hidrolisam os peptídeos resultantes da ação do coalho e da plasmina sobre as caseínas (FOX, 1989).

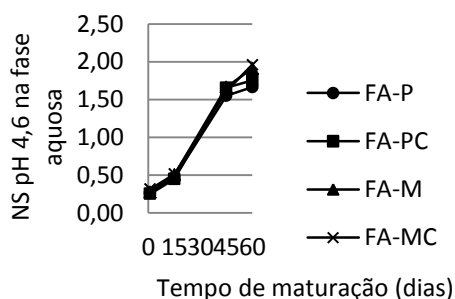


Figura 18 – Evolução do teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 na fase aquosa dos queijos em função do tempo de maturação.

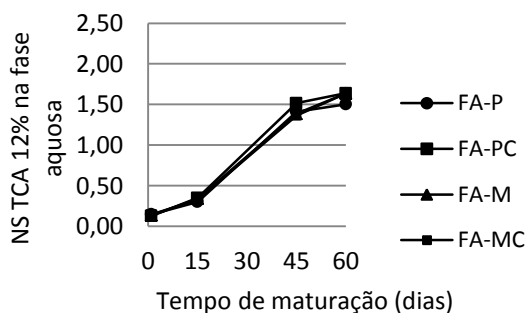


Figura 20: Evolução do teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 na fase aquosa dos queijos em função do tempo de maturação.

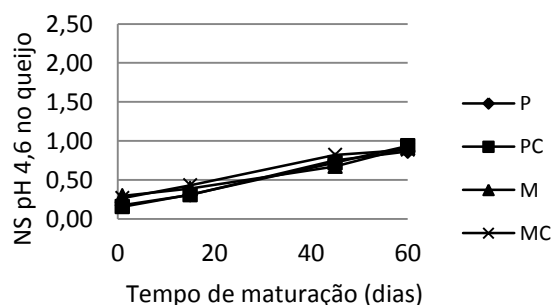


Figura 19 - Evolução do teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 nos queijos em função do tempo de maturação.

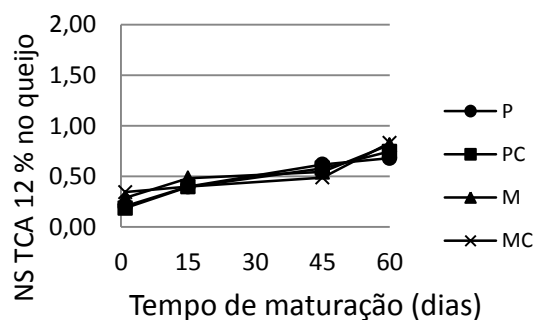


Figura 21: Evolução dos resultados do teor de nitrogênio solúvel em TCA 12 % nos queijos em função do tempo de maturação.

Ácidos orgânicos

Os teores de ácido butírico nos queijos (Figura 22) e na fase aquosa (Figura 23) foram semelhantes a Bouton (2009) e Furtado (2007) variando de 0,2 a 0,9 mg/g no queijo com 60 dias de maturação. Os tratamentos P e PC e FA-P e FA-PC diferiram ($P < 0,05$) dos tratamentos M e MC e FA-M e FA-MC respectivamente quanto à quantificação de ácido butírico. Essa diferença é resultado da microfiltração do leite para fabricação do queijo com olhaduras. A microfiltração é capaz de eliminar 99,99 % da microbiota de *Clostridium* sp. responsável pela produção de ácido butírico no queijo. Segundo Furtado (2007) concentrações de 0,5 a 1,0 mg/g de ácido butírico são necessárias para causar sabor e odor desagradáveis nos queijos. Os teores de ácido butírico na fase aquosa foram semelhantes a Bouton et al. (2009), Beuvier et al. (1997). Não foi observado diferenças ($P > 0,05$) entre os teores de ácido butírico presentes nos queijos com aqueles encontrados na fase aquosa.

Os teores de ácido acético nos queijos (Figura 24) e na fase aquosa (Figura 25) não diferiram entre os tratamentos. Seus resultados foram semelhantes aquele mencionado por Beuvier (1997), que analisou a concentração deste ácido em queijos Tipo Suíço fabricado com leite pasteurizado e microfiltrado. Os teores de ácido acético foram maiores na fase aquosa, diferindo ($P < 0,05$) daqueles encontrados nas análises realizadas no queijo. Os teores de ácido acético foram maiores na fase aquosa, diferindo ($P < 0,05$) daqueles encontrados nas análises realizadas no queijo.

De acordo com o gráfico (Figura 26) e (Figura 27) observa-se que a diminuição dos teores de ácido láctico dos queijos e da fase aquosa diferiram ($P < 0,05$) durante período de maturação. Não foi observado diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos quanto ao teor de ácido láctico. O ácido láctico na forma de lactato é fermentado pelas bactérias propiônicas em ácido propiônico e ácido acético dando sabor e aroma típicos do queijo com olhaduras. Segundo McSweeney e Fox (2004), a lactose que permanece não fermentada pelas bactérias *starter* é metabolizada pelas bactérias não *starter* (NSLAB) o que pode ser observado pelo aumento dos teores de ácido láctico a partir do décimo quinto dia de maturação para os tratamentos adicionados de NSLAB comparados com aqueles sem adição. A concentração de ácido láctico foi mais elevada nas análises realizadas na fase aquosa diferindo ($P < 0,05$) da concentração deste ácido nas análises realizadas no queijo.

Os teores de ácido propiônico nos queijos (Figura 28) e na fase aquosa (Figura 29) não diferiram ($P < 0,05$) entres os quatro tratamentos. Estes resultados estão de acordo com Bouton (2009) que estudou o efeito da adição de *Lactobacillus* e *Enterococcus* em queijo Emmental

fabricado com leite microfiltrado. Foi observado que houve uma menor concentração de ácido propiônico nos queijos maturados com adição de cultura NSLAB, este fato é explicado por Lynch et al. (1996) que relatam que *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* podem inibir bactérias propiônicas em queijos. Os teores de ácido propiônico foram maiores na fase aquosa, diferindo ($P < 0,05$) daqueles encontrados nas análises realizadas no queijo.

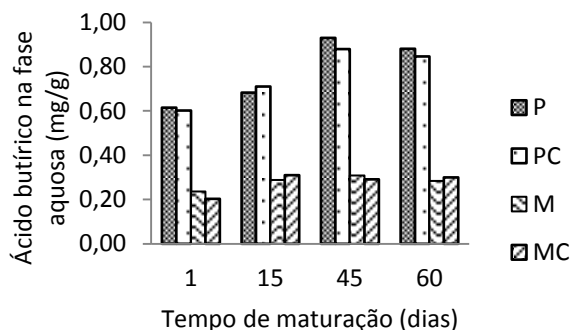


Figura 22 – Concentração de ácido butírico da fase aquosa dos queijos com olhaduras durante período de maturação

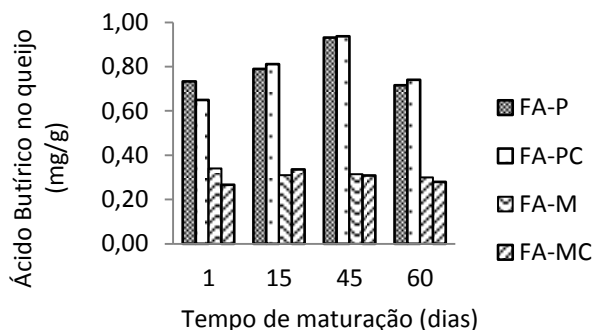


Figura 23 – Concentração de ácido butírico durante maturação nos queijos com olhaduras.

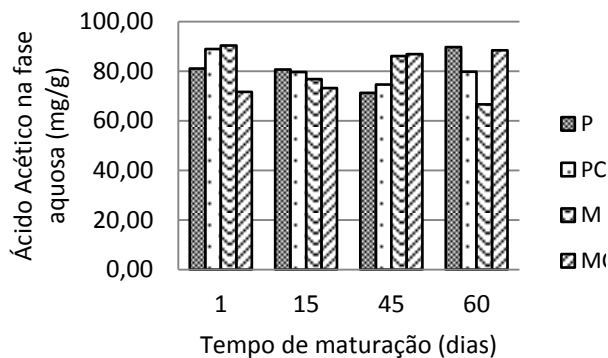


Figura 24 – Concentração de ácido acético na fase aquosa durante período de maturação.

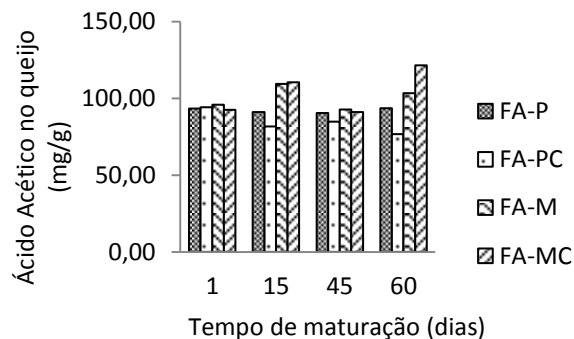


Figura 25 – Concentração de ácido acético nos queijos durante período de maturação.

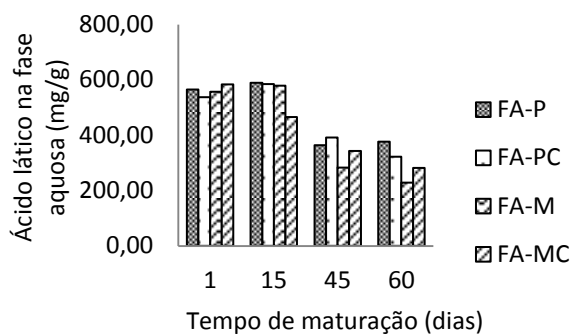


Figura 26 – Concentração de ácido láctico na fase aquosa dos queijos durante período de maturação.

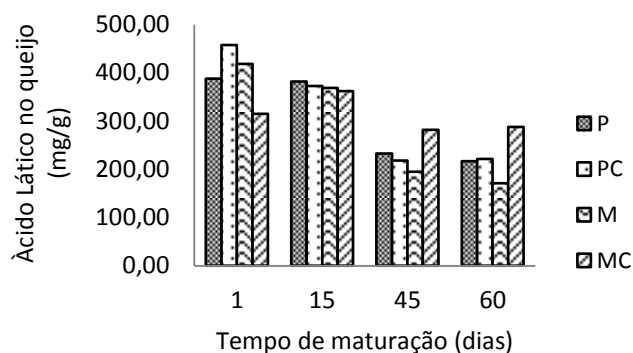


Figura 27 – Concentração de ácido láctico nos queijos durante período de maturação.

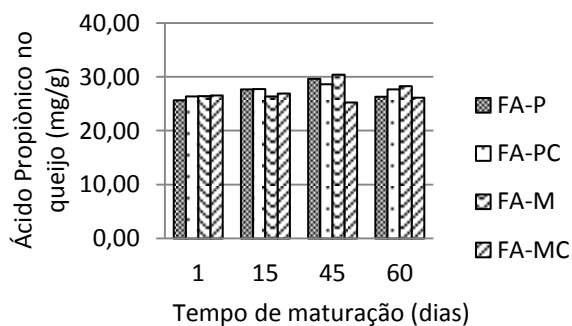


Figura 28 – Concentração de ácido propiônico da fase aquosa dos queijos durante período de maturação.

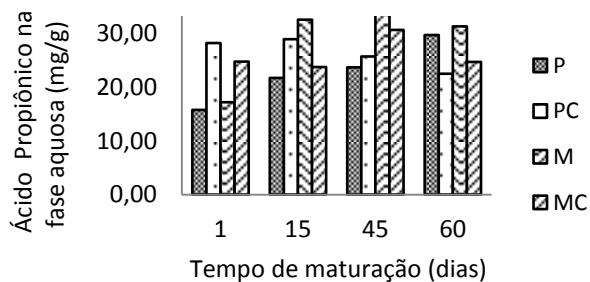


Figura 29 – Concentração de ácido propiônico nos queijos durante período de maturação.

Na Figura 30 observa-se o cromatograma com resultados do ácido láctico, acético, propiônico e butírico analisados.

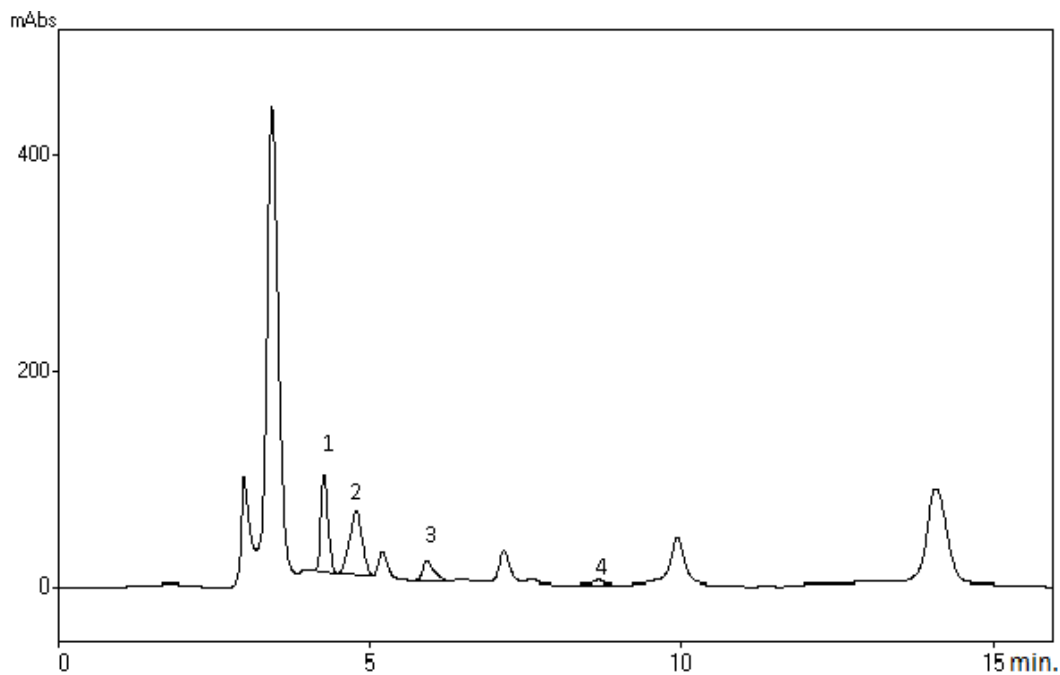


Figura 30 - Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) de ácidos orgânicos da amostra de queijo do tratamento MC com 2 dias de maturação - terceira repetição. (1) ácido láctico (2) ácido acético (3) ácido propiônico (4) ácido butírico.

Teor de cinzas

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos analisados com relação ao teor de cinzas. O teor de cinzas da fase aquosa (Tabela 6) foi similar aos resultados obtidos por Salvat-Brunaud et al., (1995).

Tabela 6- Teor de cinzas da fase aquosa com dois dias de fabricação dos queijos

	FA-P	FA-PC	FA-M	FA-MC
Cinzas	4,26(±0,92) ^a	4,27(±0,41) ^a	4,35(±0,05) ^a	4,34(±0,19) ^a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na linha, para cada variável, não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Três repetições realizadas em duplicata.

4.4. Análises microbiológicas do leite

De acordo com os resultados (Tabela 7), tanto o processo de tratamento térmico quanto o processo de microfiltração do leite em membrana de poro de 1,4 µm foram eficientes para eliminação dos micro-organismos deterioradores e patogênicos do leite. No entanto, pode-se observar que apenas a microfiltração foi capaz de eliminar a presença de esporos do leite, como os *Clostridium* sp, causadores de estufamento tardio em queijos duros e semi duros. Segundo Furtado, (2007), acima de 200 esporos por litro de leite já é suficiente para causar estufamento tardio em queijos.

Tabela 7 – Contagem de mesófilos aeróbicos e anaeróbicos, Coliformes totais, *Escherichia coli*, *S.aureus* e esporos de *Clostridium* sp. das amostras de leite utilizado na fabricação do queijo com olhaduras (UFC/mL)

Amostras/ Análises	Contagem de mesófilos aeróbicos e anaeróbicos	Coliformes 30 °C	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Clostridium</i> sp.
Leite cru padronizado	$4,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$	$4,1 \times 10^3$	$6,8 \times 10^2$	$1,9 \times 10^4$
Leite cru desnatado	$3,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$	$8,2 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$
Leite pasteurizado	$3,3 \times 10^2$	Ausente	Ausente	Ausente	$5,7 \times 10^2$
Leite microfiltrado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Leite microfiltrado padronizado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Dados de três repetições realizadas em duplicatas

A contagem de mesófilos aeróbicos e anaeróbicos do leite cru de $4,1 \times 10^7$ UFC/mL está acima do permitido pela IN 51, (2002) com limite máximo de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL. Essa contagem reflete a má qualidade do leite de alguns produtores da Região da Zona da Mata Mineira, que precisam se adequar o mais rápido as exigências da legislação vigente. Essa alta contagem microbiana pode afetar diretamente a qualidade do queijo, pela produção de enzimas, proteolíticas resistentes ao processo de pasteurização, que são capazes de passar pela membrana de microfiltração. Como pode ser observado, apesar da alta contagem, tanto o processo de pasteurização e microfiltração foram eficientes na diminuição desses micro-organismos para uma contagem dentro dos padrões exigidos pela legislação.

Na Tabela 8, estão apresentados os resultados das análises microbiológicas realizadas no creme utilizado na fabricação dos queijos com olhaduras. Pode-se observar que a esterilização em autoclave por 15 minutos foi eficiente na eliminação total dos micro-organismos e esporos.

Tabela 8- Contagem de mesófilos aeróbicos e anaeróbicos, Coliformes 30 °C, *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Clostridium* sp. nas amostras de creme utilizada na fabricação dos queijos com olhaduras fabricado com leite microfiltrado (UFC/mL)

Amostras/ Análises	Contagem de mesófilos aeróbicos e anaeróbicos	Coliformes 30 °C	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Clostridium</i> sp.
Creme cru	1,1 x 10 ⁸	4,8 x 10 ⁵	3,3 x 10 ³	3,6 x 10 ³	1,2 x 10 ⁵
Creme estéril	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Dados de três repetições realizadas em duplicatas

4.5. Análises microbiológicas no queijo

Na Tabela 9 pode-se observar os resultados das análises microbiológicas realizados nas amostras de queijo após 2 dias de fabricação. Os resultados de coliformes 30 °C, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* encontraram-se dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação federal (BRASIL, 1996). Quanto aos resultados de esporos de *Clostridium* sp. nos queijos fabricados com leite microfiltrado houve diminuição significativa (P<0,05) da presença de esporos.

Tabela 9 - Coliformes 30 °C, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e esporos nas amostras de queijo com olhaduras (UFC/g)

Amostras	Coliformes 30 °C	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Esporos
P	48 x 10 ¹	<10	<10	Ausente*	Ausente*	1,3 x 10 ³
PC	1 x 10 ¹	<10	<10	Ausente*	Ausente*	2,7 x 10 ³
M	15 x 10 ¹	<10	<10	Ausente*	Ausente*	2,0 x 10 ⁰
MC	38 x 10 ¹	<10	<10	Ausente*	Ausente*	1,0 x 10 ⁰

Dados de três repetições realizadas em duplicatas

*Ausência em 25g de queijo

P: queijo produzido com leite pasteurizado; PC: queijo produzido com leite pasteurizado adicionado de cultura; M: queijo produzido com leite microfiltrado; MC: queijo produzido com leite microfiltrado adicionado de cultura.

Nos queijos fabricados com leite pasteurizado com e sem adição de NSLAB a quantidade de esporos provocou estufamento tardio como indicado na Figura 31 (P e PC). Já nos queijos fabricados com leite microfiltrado com e sem adição de NSLAB (Figura 31 M e MC) a quantidade de esporos não foi suficiente para provocar problemas de estufamento tardio nos queijos, ou seja, o processo de microfiltração foi eficiente na eliminação dos esporos de *Clostridium* sp.

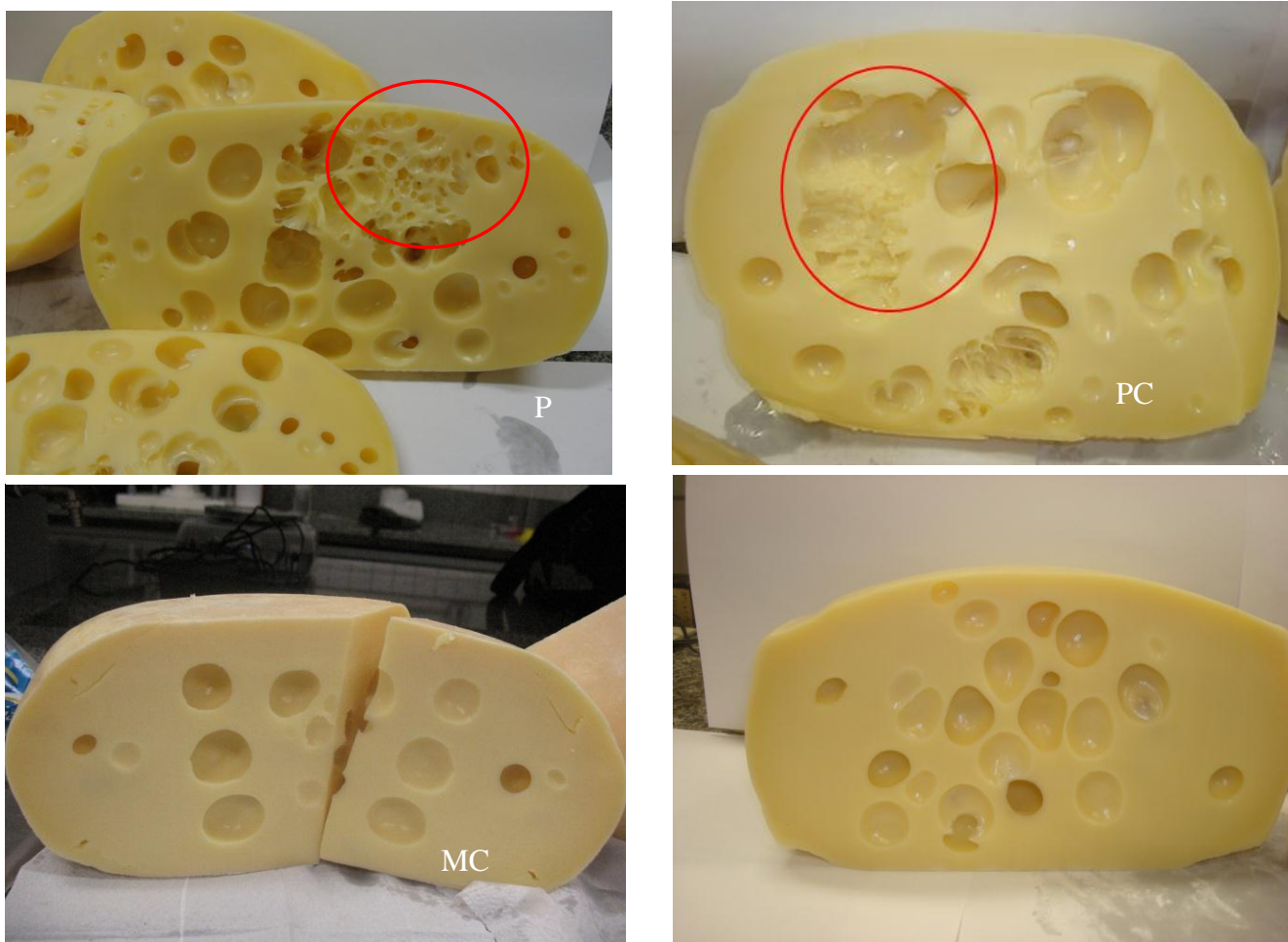


Figura 31 – Queijos com 60 dias de maturação: (P) Queijo produzido com leite pasteurizado; (PC) Queijo produzido com leite pasteurizado adicionado de cultura NSLAB; (M) Queijo produzido com leite microfiltrado; e (MC) Queijo produzido com leite microfiltrado adicionado de cultura NSLAB.

4.6. Análise sensorial

Resultados das análises sensoriais de aceitabilidade realizadas quanto ao atributo sabor, textura e impressão global estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores médios obtidos durante teste de aceitação dos queijos com olhaduras com 60 dias de maturação em relação ao atributo sabor, textura e impressão global.

Tratamentos	Sabor	Textura	Impressão Global
P	7,08 ab	7,66 a	7,36 a
PC	7,18 ab	7,66 a	7,38 a
M	6,98 b	7,34 b	7,22 a
MC	7,45 a	7,63 ab	7,45 a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, para cada variável, não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

P: queijo produzido com leite pasteurizado; PC: queijo produzido com leite pasteurizado adicionado de cultura; M: queijo

Produzido com leite microfiltrado; MC: queijo produzido com leite microfiltrado adicionado de cultura.

Considerando, o atributo sabor, o tratamento MC obteve maior média ($P < 0,05$) ficando entre gostei moderadamente e gostei muito, não diferindo ($P > 0,05$) dos tratamentos P e PC. O Tratamento PC, queijo produzido com leite pasteurizado adicionado de NSLAB, obteve a segunda maior nota não diferindo ($P > 0,05$) dos tratamentos P e M. Estes valores podem estar relacionados com a adição de cultura NSLAB. Segundo Giraffa (1997) *Enterococcus* produzem compostos que atuam no sabor e aroma, como diacetil e acetoína. Bouton et al. (2009) descreveu a importância dos *Lactobacillus* (FHL) no metabolismo de aminoácidos como serina, alanina, leucina e na formação de numerosos compostos responsáveis pelo sabor como acetaldeído, álcoois e ésteres. De acordo com o mesmo autor os *Enterococcus* parecem ter um papel limitado na formação de compostos voláteis, provavelmente pela baixa presença ao longo da maturação, aproximadamente 10^5 UFC/g, em comparação com *Lactobacillus* (FHL) que é aproximadamente 10^8 UFC/g a partir de três semanas de maturação.

Considerando o atributo textura, o tratamento P e PC obtiveram maiores notas, ficando entre gostei moderadamente e gostei muito, diferindo ($P < 0,05$) apenas do tratamento M. Os tratamentos M e MC não diferiram entre si ($P > 0,05$), apresentando menores notas.

Considerando o atributo impressão global, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos. As notas obtidas ficaram entre gostei moderadamente e gostei muito na escala hedônica.

5. CONCLUSÃO

A qualidade do leite produzido no Brasil, de uma maneira geral, não permite sua utilização no estado cru para a fabricação de queijos duros e semiduros. Primeiramente pela sua qualidade microbiológica, expondo os consumidores ao risco de incorrer em doenças veiculadas pelo leite no seu estado de natural, como acontece nos casos de doenças no rebanho, razão pela qual a legislação impõe restrições a essa prática. Em segundo plano, pela variedade de micro-organismos e enzimas indesejáveis que se encontram no leite cru, ocasionando uma série de defeitos de sabor e textura nos queijos.

Um dos principais defeitos que acometem os queijos de longa maturação é a presença de bactérias esporuladas produtoras de gás, do gênero *Clostridium*, no leite. Mesmo após o processo de pasteurização esses esporos são capazes de germinar e causar o estufamento tardio dos queijos.

A principal conclusão deste trabalho foi demonstrar que o processo de microfiltração por membranas permitiu a fabricação de um queijo com olhaduras a partir de leite cru, preservando todas as qualidades físico-químicas do leite, mantendo suas características originais e eliminando todo o risco de contaminação microbiológica, uma vez que a membrana foi capaz de separar todos os micro-organismos deterioradores e patogênicos do leite, e principalmente, eliminar por completo a presença indesejável dos esporos butíricos, causadores dos defeitos de estufamento dos queijos duros e semiduros.

A Universidade Federal de Viçosa é pioneira nos trabalhos com tecnologia de membrana de microfiltração de leite no Brasil. Os queijos feitos neste experimento foram os primeiros elaborados com esta tecnologia no país e pelos resultados promissores obtidos, poderão incentivar as indústrias a utilizar essa tecnologia para a elaboração de queijos de longa maturação, com manutenção de suas características originais, reduzindo significativamente os prejuízos causados pelo emprego do leite pasteurizado, que não elimina a presença das bactérias do gênero *clostridium*.

Outra significância desse experimento é que ele irá permitir a abertura de novas linhas de pesquisas na área, focando no ponto de vista do queijo como um produto seguro do ponto de vista microbiológico e subsidiando os órgãos de controle e inspeção federais com resultados que permitiriam a legalização do uso de leite cru microfiltrado na fabricação de queijos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS DE QUEIJOS. Consumo de queijos em diversos países. Informação pessoal : abiq@abiq.com.br.05/09/2011.

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

ALEKSEEVA, M. A.; ANISCHENKO, I. P.; SCHLEGEL, A. H., OTT, E. F.; VOROBEVA, L. I. Improving criteria of selection of propionibacteria for cheesemaking. In: A. H. Shlegel (Ed.), *Nauchno-Technichesky Progress Barnaul, Altaiskii*. 1983. p. 117 – 129.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**.16thed. Washington: APHA, 1992, p. 516-518.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC International**. VII. 17th. ed. Gaithersburg, 2000.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 17th ed. Washington, D.C., 2001.

AULDIST, M.J.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.53, p.28-36, 1998.

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

BAER, A. Influence of casein proteolysis by starter bacteria, rennet and plasmin on the growth of propionibacteria in Swiss-type cheese. **Lait**, 75, 391 – 400. 1995

BAER, A.; RYBA, I.; Interactions between propionic acid bacteria and thermophilic acid bacteria. **Lait** 79. 79 – 92. 1999.

BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Escola de Engenharia. Porto Alegre, RS. 2008. 163p.

BARTHEL, C. ; SANDERG, E.; HAGLUND, E. Recherches sur la présure dans les fromages. **Lait** 8, 762-768 e 891-897. 1928b.

BARTHEL, C. ; SANDERG, E. ; HAGLUND, E. Recherches sur la présure dans les fromages. **Lait** 8, 762-768 et 891-897. 1928b.

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

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

BOLTZ, D.F.; MELLON, M.G. Spectrometric determination of phosphorus as molybdiphosphoric acid. **Analytical Chemistry**, v, 20, n. 8, p. 749 -751, 1948.

BOUTON, Y.; BUCHIN, B.; GABRIEL, D. B.; POCHE, B.; BEUVIER, B. Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese. **Food Microbiology** 26:183–191. 2009.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 68 de 12 de dezembro de 2006.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL. Diário Oficial da União – D.O.U. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Brasília, 3977 – 3986, 11 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de setembro de 2003.

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

CHAMBA, J. F. L'emmental, um écosystème complexe. Conséquences sur la sélection et l'utilisation des ferments. **Sci. Aliments**, 20, 37 – 54. 2000.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa – MG: Ed. UFV, Universidade Federal de Viçosa, 1996. p. 54-57. Apostila nº 325.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. Lancaster: Technomic, 1998. 527 p.

CHOISY, C.; DESMAZEAUD, M. J.; GRIPON, J. C. ;LAMBERET, G.;LENOIR, J.; TOURNEUR, C. Os fenômenos microbiológicos e enzimáticos e a bioquímica da maturação. In: ECK, A. O queijo. 1 ed., v.1, 1987. p. 337.

COCOLIN, L.; INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M; COMI, G. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on based PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 83 -91, 2004.

COGAN, T. M.. Cheese microbiology. In. Fox, P. F, Guinee, T., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (Eds.), **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers. 2000

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

COGAN, T. M.; HILL, C. Cheese starter cultures. In: **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, Vol 1: General Aspects, 2nd ed, p 193–256. Fox P F, ed. London: Chapman & Hall. 1993

DELLAGLIO, E.; DICKS, L.M.T.; TORRIANI, S. The genus *Leuconostoc*. In: **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H., eds, Blackie Academic and Professional, Glasgow. 1995. pp. 235-278.

DZIEZAK, J. D. Membrane separation technology offers processors unlimited potential. **Food technology**, v. 44, n. 9, p. 108-113, 1990.

FAUQUANT, J.; MAUBOIS, J. L. Pierre A. Microfiltration du lait sur membrane minérale. *Tech Lait Market* 1028, 21-23. 1988.

FAVROT, C. Croissance de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* dans le lait: effet de la coagulation par la présure. Thèse, **ENSA**, Rennes, 1994.

FAVRE, E. Pioneers in membrane transport: Graham, von Wroblewski... and Lhermite, **Journal of Membrane Science**, v.229, n.1-2, pp. 241-242.). 2004.

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

FITZSIMONS, N. A.; COGAN, T. M.; CONDON, S.; BERESFORD, T. **Phenotypic and genotypic characterisation of non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese**. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1999. 3418 – 3426.

FOX, P.F. Proteolysis during Cheese Manufacture and Ripening. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1379-1400, 1989.

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

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

FRANZ, C. M. A. R; HOLAPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety. **Int. Journal Food Microbiol.** 47, 1-24. 1999.

FURTADO, M. M. O estufamento tardio dos queijos: características e prevenção - uma revisão. **Revista do Instituto Candido Tostes.** n. 40, p. 3 – 39, 1985.

FURTADO, M. M. Defeitos relacionados com problemas de fermentação. In: **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção.** São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. p. 39 -70.

FURTADO, M. M. **Queijos com olhaduras.** Fonte Comunicações e Editora Ltda. São Paulo – Brasil. 2007. p.135.

FURTADO, MOZART M.. **Isolamento de Bactérias Láticas de leite Cru e Soro de Queijo de Leite da região do Serro, Minas Gerais.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 1990. p.22.

GESAN, G. ; BOYAVAL, E. ; DAUFIN, G. Critical stability conditions in crossflow microfiltration of skimmed milk : transition to irreversible deposition. **Journal Membrane Science.**, 158, 211-222. 1999.

GILLOT, J. ; BRINKMAN, G.; GARCERA, D. Nouveaux médias filtrants céramiques pour la microfiltration tangentielle et ultrafiltration. Congrès Filtra, **Société Française de Filtration**, Paris. 1984.

GIRAFFA, G. ; CARMINATI, D. ; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products : a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v.60, p. 732-738.1997.

HERMAN, L. M. F.; BLOCK, J. H. G. E.; WAES, G. M. A. V. J. A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.12, p. 4141 – 4146, 1995.

HENRIKSEN, C.M.; NILSON, D.; HANSEN, S.; JOHANSEN, E. Industrial applications of genetically modified microorganisms: gene technology at Chr. Hansen A/S. **International Dairy Journal**. 9: 17-23. 1999.

HOLM, S.; MALMERG, R.; SVENSSON, K. Method and plant for producing milk with a low bacterial count. Int Patent, PCT n° WO 86/01687. 1986.

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

INGHAM, S. C.; HASSLER, J.R.; TSAI, Y. W.; INGHAM, B. H. Differentiation of lactate fermenting, gas producing *Clostridium* spp. Isolated from milk. **International Journal of Food Microbiology**. v. 43, n. 3, p. 173 -183, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, v. 1.1985.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION STANDART. Cheese and cheese Processed Cheese **Determination of the Total Solids Content**, 4A: 1982. Brussels, 1982.

JAMES, B. J.; JING, Y.; CHEN, X. D. Membrane fouling during filtration of milk – a microstructural study. *Journal of Food Engineering*, v.60, p.431-437, 2003.

JIMENO, J.; LAZARO, M. J.; SOLLBERGER, H. Antagonistic interactions between propionic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria. *Lait*, 75, 401 – 413. 1995a.

JORDAN, K. N.; COGAN, T. M. Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Journal of Agriculture and Food Research*, 32, 47 – 55. 1993.

JOST, R.; JELEN, P. Cross-flow microfiltration – Na extension of membrane processing of milk and whey. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Brussels, n° 320, p 9-15, 1997.

KANAUCHI, T.; YOSHIOKA, Y.; HAMMAMOTO, M. Microbiological studies on blue veined cheese. I. Microflora of blue veined cheese in ripeningperiod. *Dairy Science Abstracts*, 23, 3526. 1961.

KELLY, P.M.; TUOHY, J. J. The effectiveness of microfiltration for the removal of microorganisms. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Brussels, n° 320, p.16-25, 1997.

KERJEAN J. R.; CONDON S.; LODI R.; KALANTZOPOULOS G.; CHAMBA J. F.; SUOMALAINEN T.; COGAN T.; MOREAU D. Improving the quality os European hard – cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionicbacteria. *Food Res Int.*, 33, 281 – 287. 2000.

KLIJN, N.; NIEUWENHOF, F. J.; HOOLWERF, J, D.; VAN der WAALS, C. R.; WEERKAMP, A.H. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in chesse by species-specific PCR amplication. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 8, p. 2919-2924, 1995.

KOSEOGLU, S. S.; LAWHON, J. T.; LUSAS, E. W. Vegetable juices produced with membrane technology. **Food Technology**, v.45, p.124-127, 1991.

LE BOURHIS, A. G.; DORÉ, J., CARLIER, J. P.; CHAMBA, J. F.; POPOFF, M. R.;THOLOZAN, L. L. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113,. 154-163, 2007.

LE BOURHIS, A. G.; SAUNIRE, K.; DORÉ, J.; CARLIER, J. P.; CHAMBA, J. F., POPOFF M. R.;THOLOZAN, L. L. Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. In: **Cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.1, p. 29 – 38, 2005.

LUCEY J. A.; GORRY C, FOX P. F. Changes in the acid-base buffering curves during the ripening of Emmental cheese. *Milchwissenschaft* 48,183-186. 1993.

LYNCH, C. M.; MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; COGAN, T. M.; DRINAN, F. D. Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. **International Dairy Journal**, 6, 851 – 867. 1996.

MADEC, M. N.; MEJEAN, S.; MAUBOIS, J. L. Retention of *Listeria* and *Salmonella* cells contaminating skim milk by tangential membrane microfiltration ("Bactocatch" process). **Lait** 72,327-332. 1992.

MARTLEY, F. G.; CROW, V. L. Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. **International Dairy Journal**, 3, 461 – 483. 1993.

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

MAUBOIS, J.L. Current uses and future perspectives of microfiltration technology in the dairy industry. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, nº 320, p. 37-40, 1997.

MAUBOIS, J.L.; MOCQUOT, G. Préparation de fromage à partir de pré-fromage liquide obtenu par ultrafiltration du lait. **Lait**. 51, 1971, p. 495-533.

MAUBOIS, J. L.; MOCQUOT, G.; VASSAL, L. **Procede de traitement du lait et de sous produits laitiers**. Patent Française 2.052.121, Paris, France, 1969.

MCSWEENEY, PLH, Fox PF, Lucey JA, Jordan KN, Cogan TM Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. **International Dairy Journal** 3,613-634. 1993.

MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA. A. N.; BORGES, G. T.; NICOLAU, E. S.; SOUZA, A. A. G. D. **Estudo qualitativo e quantitativo da microbiota anaeróbia em amostras de queijos provolone, parmesão e prato**. *Ciência Animal Brasileira*, v. 2, n.1, p.27 -34, 2001.

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

MISTRY, V. V.; MAUBOIS, J. L. Application of membrane separation technology to cheese production in cheese: chemistry, physics and microbiology. v.1, Ed: PF Fox, PLH, 2004.

MOREAU, C. L. Penicillium roqueforti, morphologie, physiologie, interest en industrie fromagere mycotoxines. **Lait**, 60, 254 – 271. 1980.

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

MOURA, J. M. L. N. **Degomagem de óleo de soja bruto através de ultrafiltração**. 88f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. [s.i.]: Kluwer Academic Publishers, 1991.

MULLIN, W.J. ; EMMONS, D.B. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. **Food Research International**, vol 30.n 2, p 147 – 151. 1997.

NÓBREGA, R.; BORGES, C. P.; HABERT, A. C. Processos de separação por membrana. In: **P. J. A, & K. V. B, Purificação de produtos biotecnológicos**, pp. 37-88, São Paulo: Ed. Manole, 2005.

OLESEN, N.; JESEN, F. Microfiltration: the influence of operation parameters on the process. **Milchwissenschaft**, Munich, v. 44, nº 8, p. 476, 1989.

OLIVEIRA, P. H. B. Tecnologia de Membranas. **Leite & Derivados** – Anuário Brasileiro de Produtos e Serviços. n 117, jan./fev. 2010, p.102- 111.

ORSELLO, C. D.; LI, W.; HO, C. C. A three mechanism model to describe fouling of microfiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 2006.

PAFYLIAS, I.; CHERYAN, M.; MEHAIAN, M. A.; SALGAM, N.,. Microfiltration of milk with ceramic membranes. **Food Journal International**. V. 29. nº 2, p. 141-146, 1996.

PAULSON, D. J; WILSON, R. L; SPATZ, D. D. Crossflow membrane technology and its applications. **Food Technology**, v. 38, nº 12, p. 77-87; 111, 1984.

PENDERSEN, P.J. Microfiltration for the reduction of bacteria in milk and brine. In: IDF Special Issue 9201: New applications of membranes processes. Brussels: **International Dairy Federation**, cap 4, p.33-50, 1992.

PERRY, K. S. P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos**. Química nova. v. 27, n. 2, p.293 -300, 2004.

PETRUS, J. C. C. **Preparação, modificação e caracterização de membranas assimétricas para a clarificação de sucos de frutas**. 139 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

PIOT, M.; VACHOT, J.C.; VEAUX, M.; MAUBOIS, J. L.; BRINKMAN, G. E. Écrémage et épuration bactérienne du lait entier cru par microfiltration sur membrane en flux tangentiel. **Tech Lait Market** 1016, 42-46. 1987.

PORTER, M. C. **Handbook of industrial membrane technology**. New Jersey: Noyes, 1990. 604 p.

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

PREVOT, A. R. Sporulales. In: **Manual for the classification and determination of the anaerobic bacteria**. Primeira edição. Montreal:Lea & Febiger, 1996, cap. 6 200-302.

RAUTENBACH, R.; ALBRECHT, R. **Membrane processes**. Chichester: John Wiley e Sons, 1989. 359p.

RICHOUX, R. **Dairy Propionic acid bacteria**. Microbial Interactions. Ed. Standa Industrie - CAEN (2005). 320.

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

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

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

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

SANDBLOM, RM (Alfa Laval). **Filtering process**. Brevet suédois n° 74 16257.1974.

SAS/STAT. 9.2 User's Guide, Second Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2009.

SCOTT, K.; HUGHES, R. **Industrial membrane separation technology**. 2.ed. [s.i.]: Blackie Academic e Professional, 1996. 305p.

SENYK, G. F.; SCHEIB, J. A.; BROWN, J. M.; LEDFORD, R. A. Evaluation of Methods for Determination of Spore-Formers Responsible for the Late Gas-Blowing Defect in Cheese. **Journal Dairy Science**.. 72:360-366. 1989.

SILIKER, J. H. Leche y productos lácteos. In: **Ecología microbiana de los alimentos: productos alimentícios**. Zaragoza. Editorial Acribia. v. 2, cap. 18, p. 472 – 517, 1980.

SNEATH, P. H. A. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In: Murry, R. G. E. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 2, p. 1104-1207, 1986.

SOARES, M. S. **Processamento de óleo de soja utilizando ultrafiltração em micela na etapa de degomagem e na obtenção de lecitina.** 182f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SOLLBERGER, H. Parameter zur Fruherfassung des Nachgärungsrisikos beim emmentaler – Käse. Schweiz. Milch. Forschung 23, 20 -24. 1994.

STEFFEN, C.; EBERHARD, P.; BOSSET, J. O.; RUEGG, M. Swiss-type varieties. In P. F. Fox (Ed.), **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**, 1993. vol. 2 (pp. 83 – 110). London: Elsevier Applied Science.

STRATHMANN, H. Synthetic membranes and their preparation. In: PORTER, Mark C. (ed.) **Handbook of industrial membrane technology.** Park Ridge: Noyes Publications, 1990. Cap.1, p.1-56.

SU, Y.C.; INGHAM, S. C.; Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by Clostridium spp. In: Gouda cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 147-154, 2000.

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

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

THOMAS, T. D.; CROW, V. L. Mechanism of d(-)-lactic acid formation in Cheddar cheese. NewZealand. **Journal of Dairy Science and Technology**, 18, 131 – 141. 1983.

TROUVÉ, E.; MAUBOIS, J. L.; PIOF, M. M. N; FAUQUANT, J.; ROUAULT, A.; TABARD, J.; BRINKMAN, G. Retention de différentes espèces microbiennes lors de l'épuration du lait par microfiltration en flux tangentiel. **Lait**, v.71, p.1-13, 1991.

TURNER, K. W.; THOMAS, T. D. Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. New Zealand. **Journal of Dairy Science and Technology**, 15, 265 – 276. 1980.

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

VOROBJEVA, L. I. **Economic and medical applications**. In L. I. Vorobjeva (Ed.), Propionibacteria (pp. 209 – 243). Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1999.

WALSTRA, P.; GEURT, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M. A. J. S. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Wageningen Agricultural University. Wageningen, Países Bajos. Editorial Acribia, S. A. 2001. 706p.

WASSERFALL, F. TEUBER, M. Action of egg white lysozyme on *Clostridium tyrobutyricum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 197 -199, 1979.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products** In: American Public Health Association. 17th ed. Washington, 2004.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Revista Boletim do leite**. Rio de Janeiro, v. 51, nº 661, p. 1-8, 1983.

ANEXO - Modelo de ficha de avaliação para os testes de aceitação para os atributos sabor, textura e impressão global.

Teste de aceitação		
Nome: _____	Sexo F () M ()	Idade: _____
Data: _____		
Por favor, avalie a amostra codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da amostra.		
Código da Amostra _____		
9. gostei extremamente	Sabor	_____
8. gostei muito		
7. gostei moderadamente	Textura	_____
6. gostei ligeiramente		
5. indiferente	Impressão Global	_____
4. desgostei ligeiramente		
3. desgostei moderadamente		
2. desgostei muito		
1. desgostei extremamente		
Comentários: _____		
