



**ALEX UZÊDA DE MAGALHÃES**

**VIABILIDADE TECNOLÓGICA DO  
CONGELAMENTO DA MASSA NA PRODUÇÃO  
DE QUEIJO TIPO MUSSARELA**

**LAVRAS – MG  
2013**

**ALEX UZÊDA DE MAGALHÃES**

**VIABILIDADE TECNOLÓGICA DO CONGELAMENTO DA MASSA  
NA PRODUÇÃO DE QUEIJO TIPO MUSSARELA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção  
do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

**LAVRAS – MG  
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Magalhães, Alex Uzêda de.

Viabilidade tecnológica do congelamento da massa na produção de queijo tipo mussarela / Alex Uzêda de Magalhães. – Lavras : UFLA, 2013.

141 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.

Bibliografia.

1. Cultura *starter*. 2. Microscopia eletrônica de transmissão. 3. Perfil de textura. 4. Teste de relaxação. 5. Compressão uniaxial. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 637.35

**ALEX UZÊDA DE MAGALHÃES**

**VIABILIDADE TECNOLÓGICA DO CONGELAMENTO DA MASSA  
NA PRODUÇÃO DE QUEIJO TIPO MUSSARELA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção  
do título de Doutor.

APROVADA em 30 de agosto de 2013

Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima	DCA
Dra. Sandra Maria Pinto	DCA
Dr. Eduardo Alves	FIT
Dr. Fernando Antônio Resplande Magalhães	EPAMIG

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2013**

*Aos meus pais Antônio Carlos e Eunice  
e a minha amada Érica*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que está acima de todos nós

Agradeço aos meus pais, Antônio Carlos e Eunice pelo amor e pela educação. Reconheço, a cada passo, a importância de vocês na minha vida.

À minha amada Érica, pelo amor, carinho e companheirismo. Juntos seremos eternos.

Aos meus irmãos Daniel e Eduardo pela amizade e compreensão.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) pela oportunidade.

Ao meu orientador Luiz Ronaldo de Abreu pelo carinho, cumplicidade e aconselhamentos.

À professora Patrícia pelo apoio e ensinamentos.

Ao Departamento de Fitopatologia, principalmente à Cláudia pela disponibilidade e paciência.

Aos membros da banca pelas valiosas sugestões.

Aos funcionários do DCA, em especial à Creuza pelos momentos alegres e principalmente pela atenção e suporte.

Ao Instituto Federal do Sul de Minas – Campus Machado e aos colegas, funcionários e alunos por toda assistência neste projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO GERAL

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a influência da utilização do congelamento da massa nas características reológicas, físico-químicas e microestrutura do queijo tipo mussarela. Foram utilizados quatro tratamentos: Cultura termofílica e massa não congelada (TnF); cultura termofílica e massa congelada (TF); cultura mesofílica e massa não congelada (MnF); cultura mesofílica e massa congelada (MF). Os queijos foram fabricados seguindo metodologia tradicional. Os valores de extensão de maturação de todas as amostras dos tratamentos aumentaram durante o período de armazenamento. O congelamento da massa não afetou os atributos sensoriais aroma, cor, sabor, textura e avaliação geral. Características funcionais do queijo tipo mussarela foram afetadas pelo congelamento da massa e pelo tipo de cultura starter, porém não comprometendo a qualidade final do produto. Para a avaliação da influência do congelamento da massa no comportamento reológico dos queijos durante o período de estocagem, três tipos de análise de textura foram utilizadas: perfil de textura, teste de relaxamento e compressão uniaxial. Todas as propriedades reológicas estudadas apresentaram diferenças significativas durante o período de armazenamento. Em relação ao parâmetro dureza, foi possível observar um amolecimento de todos os queijos durante o período de estocagem. Em queijos obtidos pelo processo de congelamento da massa ocorreu maior dureza em relação aos queijos mussarela convencionais ao longo do período de armazenamento. Eletromicrografias de transmissão permitiram avaliar que os tratamentos afetaram as características da microestrutura. Foi possível observar comportamentos diferentes dos glóbulos de gordura e da matriz proteica entre os tratamentos durante o período de armazenamento. Conclui-se, que o congelamento da massa com a utilização de qualquer das culturas utilizadas é um processo tecnologicamente viável para a produção do queijo em questão.

Palavras-chave: Qualidade. Cultura *starter*. Microscopia eletrônica de transmissão. Perfil de textura. Teste de relaxação. Compressão uniaxial.

## GENERAL ABSTRACT

The study was conducted with the objective of evaluating the influence of freezing of curd upon microstructure, rheology and physicochemical properties and of mozzarella cheese. Four treatments were utilized: termophilic starter culture and no frozen curd (TnF); termophilic starter culture and frozen curd (TF); mesophilic starter culture and no frozen curd (MnF); mesophilic starter culture and frozen curd (MnF). Cheeses were processed following traditional methodology. The values of extent of maturation of all cheeses treatments increased during storage period. Freezing of curd did not affect the sensorial attributes; aroma, color, taste, texture and overall aspect. Functional properties of mozzarella cheeses were affected by freezing of curd and starter cultures, but did not compromised the final quality of product. To evaluate the influence of frozen curd in rheological proprieties of cheese during storage period were utilized texture profile analysis, relaxation test and uniaxial compression. Rheological proprieties show differences during storage period. Regarding to hardness was observed softening in cheeses during storage period. In cheeses produced with freezing of curd occurred higher hardness compared with conventional mozzarella cheeses, during the storage period. Electromicrographs obtained by transmission electron microscopy allowed evaluating that treatments affected the characteristics of microstructure. It was possible to observe different behaviors of fat globules and protein matrix among treatments during storage time. It may conclude that freezing of curd, with both of starter cultures studied, is a technological process feasible to manufacturing of mozzarella cheese.

Keywords: Quality. Starter cultures. Transmission electron microscopy. Texture profile. Relaxation test. Uniaxial compression.



## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....</b>	<b>63</b>
	<b>ARTIGO 1 Sensory and functional properties of mozzarella cheese as affected by freezing of curd.....</b>	<b>64</b>
	<b>ARTIGO 2 The effect of freezing of curd on texture and rheological properties of mozzarella cheese.....</b>	<b>97</b>
	<b>ARTIGO 3 Microstructure of mozzarella cheese produced with frozen curd.....</b>	<b>129</b>

**PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

O queijo tipo mussarela é uma variedade de pasta filata originado na região de Battipaglia na Itália. Atualmente é um produto com ampla aceitação mundial, sendo processado na Europa, Estados Unidos, Brasil, entre outros países, utilizando leite de vaca ou búfala e apresentando modificações ao processamento original. É caracterizado por ser um queijo de coloração mais clara, macio e que possui boa elasticidade, sendo amplamente utilizado para a preparação de diversos pratos populares, como pizzas e lasanhas.

O queijo tipo mussarela é obtido por filagem de uma massa acidificada (produto intermediário obtido por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. Em função do teor de umidade e matéria gorda em extrato seco é classificado em média, alta ou muito alta umidade e extragordo, gordo a semigordo (BRASIL, 1997). Segundo Heinen et al. (2009) o queijo tipo mussarela é considerado um dos mais consumidos, seja na forma *in natura* ou como ingrediente de salgados e pizzas.

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2012), a produção de leite no Brasil vem crescendo desde o ano 2000. Entre 2000 e 2010 o Brasil manteve o quinto lugar em produção de toneladas de leite, correspondendo a 5,3% da produção mundial. Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais é o maior produtor de leite com produção média de 8.388 toneladas, representando 27,3% do total nacional.

O mercado de queijos no Brasil vem crescendo impulsionado por um aumento de vendas no varejo e devido ao sucesso dos *fast foods*, representando um incremento no consumo de queijos destinados a esse mercado. No total são comercializados 50 tipos de queijo, dentre eles, 234 marcas de queijo tipo prato, 353 de mussarela, 263 de minas frescal, 164 de provolone, 147 de minas padrão

e 45 de queijo ralado (CHALITA et al., 2009). No Brasil, o queijo de maior produção em toneladas é o queijo mussarela (144,690 ton) seguido dos queijos prato (102,480 ton) e minas frescal (28,875 ton) (EMBRAPA, 2012).

Comparado com outros países, o consumo de queijo no Brasil ainda é pequeno, aproximadamente 3 Kg/hab./ano, enquanto na França é de 23 Kg/hab./ano e na Argentina 11 Kg/hab./ano. E, desses, quase 50% do consumo são dos queijos tipo mussarela e prato para uso culinário, porém o consumo de queijos finos vem aumentando significativamente (REZENDE, 2004).

A diferenciação e singularidade do produto (variabilidade e qualidade) são principalmente definidas no nível internacional pela Europa, a partir da forte influência da tradição francesa (CHALITA, 2010).

A estocagem de queijo tipo mussarela em temperatura de congelamento é de interesse comercial significativo como um meio de se evitar mudanças físico-químicas no queijo durante a estabilização, prolongando sua vida de prateleira e minimizando fatores de logística na comercialização interna e potencial exportação. No entanto, pesquisas anteriores (GRAIVER; ZARITZKY; CALIFANO, 2004; KUO; GUNASEKARAN, 2009; RIBERO et al., 2007) indicam efeitos adversos sobre as propriedades reológicas, propriedades funcionais e proteólise em queijos devido ao congelamento.

Uma alternativa para o congelamento do queijo seria o congelamento da massa pronta para a filagem, o que poderia evitar os problemas causados pelo congelamento do queijo.

Face ao exposto e a flutuação na comercialização do queijo tipo mussarela, o trabalho teve como objetivo:

Verificar a viabilidade tecnológica do congelamento da massa pré-filagem obtida com fermento termofílico e mesofílico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Produção do queijo tipo mussarela

A produção de queijo tipo mussarela pode ser dividida nas seguintes etapas.

#### 2.1.1 Preparação do leite

O leite é a matéria prima na fabricação de queijo tipo mussarela. Os principais componentes do leite são água, gordura, proteína, açúcar (lactose) e enzimas (GUNASEKARAN; AK, 2003). Outros menores constituintes incluem vitaminas e cinzas.

A preparação do leite normalmente envolve controle de qualidade, filtração, padronização, pasteurização e estocagem. Os dois principais objetivos da padronização são: atingir a uniformidade do queijo com o máximo de rendimento e boa qualidade e uma utilização econômica de todos os componentes do leite (SCOTT, 1998). Outras razões para padronizar o leite podem ser: produção de queijo contendo diferentes concentrações de gordura, compensar alterações no leite devido à sazonalidade e raças e ser capaz de utilizar leite recombinado, quando existir falta de oferta de leite.

Uma qualidade satisfatória do queijo tipo mussarela pode ser alcançada utilizando leite de vaca ou búfala padronizado com 3,0 a 6,0% de gordura, respectivamente. Porém, o uso de leite com menor quantidade de gordura resulta em uma textura com maior dureza e perda de *flavor* (PATEL; VYAS; UPADHYAY, 1986). O conteúdo de gordura, o rendimento, a derretibilidade e o óleo livre do queijo aumentam com o incremento dos níveis de gordura do leite. Um teor de gordura de 2,5% é considerado, segundo Valle et al. (2004), como

um produto ideal para a utilização em pizza. Queijo tipo mussarela fabricado por Ali e Abdel-Razing (2011), com leite de vaca padronizado com 5,0% de gordura produziu resultados superiores àqueles obtidos com leite contendo 0,3 ou 7,0% de gordura.

### **2.1.2 Pasteurização**

Pasteurização ou tratamento térmico é a etapa do processo que melhora a qualidade biológica do leite, destruindo os microrganismos patogênicos, boa parte dos deteriorantes e algumas enzimas. O tratamento térmico ocorre em condições controladas para prevenir temperaturas acima ou abaixo da ideal. Tradicionalmente, o queijo tipo mussarela é produzido de leite cru. Porém, a pasteurização é recomendada para os queijos que são consumidos frescos, porque o processo de filagem não garante a destruição de patógenos (CASERIO et al., 1977). O tratamento térmico a 72°C no leite para fabricação de queijo tipo mussarela aumentou a recuperação das proteínas e dos sólidos totais. Embora diminua a recuperação de gordura, amolece o corpo do queijo, incrementa o *flavor* e mantém a qualidade e a segurança do alimento (PATEL; VYAS; UPADHYAY, 1986). Segundo Abreu (2000), a pasteurização do leite é uma operação indispensável na fabricação de queijo, porém o aquecimento acima de 72°C diminui a ação da quimosina (enzima coagulante), devido à insolubilidade da parte dos sais de cálcio, o que irá prejudicar a coagulação do leite e a maturação do queijo.

### **2.1.3 Adição de cálcio**

O cálcio tanto na forma ionizada ( $\text{Ca}^{++}$ ) como micelar (coloidal ou insolúvel) tem um papel importante no processo de coagulação. O cálcio

ionizado ajuda na formação da rede de massa por estabelecer pontes entre as micelas coaguladas pelo coalho (renina e/ou pepsina). O cálcio micelar, sob a forma de fosfocaseinato de cálcio inorgânico “sequestrado”, mantido em estado coloidal intimamente ligado à caseína ajuda na definição da firmeza do coágulo. Quando se adiciona cloreto de cálcio ao leite, reduz-se o tempo de coagulação e aumenta-se a firmeza da massa (KNIPSCHILDT, 1976).

O conteúdo de cálcio afeta a extensão e o grau com que a agregação das proteínas ocorre, determinando a estrutura básica e a textura dos queijos (LUCEY; JOHNSON; HORNE, 2003; PASTORINO; HANSEN; MCMAHON, 2003). Tanto a concentração de cálcio quanto o pH influenciam a habilidade da massa se tornar plástica durante o processo de filagem (LEE; JOHNSON; LUCEY, 2005; MCMAHON; PAULSON; OBERG, 2005).

#### **2.1.4 Coagulação**

Coagulação é a etapa do processamento de queijo que tem o objetivo de aglutinar a proteína do leite, formando uma rede de caseínas unidas por pontes de cálcio, retendo água, gordura e demais constituintes do leite, formando uma estrutura em forma de gel. A massa é então obtida pela dessora do coágulo e seguida de moldagem de acordo com as especificações de mercado. Esse processo está relacionado à perda de estabilidade da caseína pela ação de agentes químicos e físicos. A acidificação promovendo descalcificação e a ação das enzimas proteolíticas desempenha um papel muito importante na correta etapa de filagem da massa (OLIVEIRA, 1986).

O coalho é o principal elemento da coagulação do leite, constituído por um complexo de enzimas com predominância da quimosina e pepsina. A quimosina pura tem um poder coagulante de 1:5.000.000. É destruída por clorofórmio, calor, formol e agentes oxidantes. A sua característica mais

importante é não ser destruída pelos halogênios (cloro, flúor, iodo) e pelo peróxido de hidrogênio. A faixa de pH de atuação da quimosina é de 2 a 5,3, sendo que o ótimo é pH 3,8 (ABREU, 2000).

Existem três tipos de coalhos:

- a) Coalho Bovino. O agente coagulante convencional utilizado na produção de queijos é o coalho de bezerro, que é extraído do quarto estômago de bezerras em lactação (YOUSIF; McMAHON; SHAMMET, 1996). Este coalho é composto pelas enzimas quimosina e pepsina, em proporção de cerca de 85-95% de quimosina para 5-15% de pepsina. A demanda de estômagos de bezerro para a extração de coalho é muito elevada, o que se torna um fator que dificulta a produção, devido não só ao alto custo, mas também à escassez da matéria-prima. Em bovinos adultos a proporção é de 20% de quimosina para 80% de pepsina (USTUNOL; HICKS, 1990).
- b) Coagulante Fúngico. Microrganismos como *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae* e *Irpex lactics* são extensivamente usados para a produção de proteinases para uso como agentes coagulantes de leite. Os coagulantes microbianos são atualmente utilizados em cerca de 1/3 de toda a produção mundial de queijo e possuem capacidade proteolítica maior do que o coalho bovino (NEELAKANTAN; MOHANTY; KAUSSEHIK, 1999).
- c) Genético. Outra alternativa para o coalho de bezerro no mercado é o chamado “coalho genético”, que é constituído de quimosina pura. A sua obtenção foi possível graças à tecnologia do DNA recombinante, que permitiu a clonagem do gene que codifica para a quimosina de bezerro em células de *Escherichia coli*,



*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis*, *A. nidulans*, *A. niger* e *Trichoderma reesei* (NEELAKANTAN; MOHANTY; KAUSSEHIK, 1999).

Importante fator a ser considerado com relação ao coagulante utilizado diz respeito ao seu efeito sobre o rendimento e sobre as características sensoriais do queijo, como sabor e textura, sendo a atividade proteolítica das enzimas que exerce grande influência nesses fatores. Além da ligação Phe105-Met106 na  $\kappa$ -caseína, cuja hidrólise determina a coagulação enzimática do leite, outras ligações peptídicas são hidrolisadas a taxas que variam de acordo com a enzima utilizada (atividade proteolítica não específica). As enzimas coagulantes variam amplamente com respeito à atividade proteolítica e algumas são tão ativas a ponto de não ser possível o seu aproveitamento para a produção de queijos duros. Geralmente, os coalhos microbianos apresentam maiores atividades proteolíticas que os coalhos de bezerro e genético (LIMA; MAGALHÃES. ABREU, 1996).

Para o rendimento em base úmida, o mesmo comportamento acima descrito foi obtido no que diz respeito às diferenças entre os coalhos e os valores de pH. Diversos trabalhos publicados (LIMA; MAGALHÃES. ABREU, 1996; LOPEZ-FANDINMO et al., 1997; USTUNOL; HICKS, 1990) descrevem que a maior atividade proteolítica de coagulantes microbianos pode proporcionar menor rendimento em massa de coágulo.

O leite possui diversas enzimas nativas, mas a mais significativa é a plasmina, associada quase que exclusivamente à micela de caseína em pH normal do leite, mas dissociada das micelas quando o pH é reduzido (NIELSEN, 2002; VISSER; VAN DEN BERG, 2002).

Boa parte da plasmina é desnaturada no queijo tipo mussarela, graças ao processo de filagem da massa em altas temperaturas (de 58° a 60°C), porém a

plasmina contribui para a proteólise deste queijo (FEENEY; FOX; GUINEE, 2001).

### **2.1.5 Acidificação**

A acidificação é o processo base para a produção da maioria das variedades de queijo. Um tempo e taxa de acidificação adequados é um passo vital para a produção de um queijo de qualidade, afetando uma série de aspectos, como o controle e prevenção do crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes; o efeito na atividade do coagulante durante o processamento e maturação; a solubilização do fosfato de cálcio coloidal que afeta a textura dos queijos; a promoção da sinerese e com isso a composição do queijo; a influência sobre a atividade da enzima que afeta a qualidade e o *flavor* (BARBANO, 1999; FOX et al., 2000; MCSWEENEY, 2007).

A acidificação do leite pode ser conduzida normalmente através da produção de ácido láctico por culturas *starters*, apesar da utilização de acidificação direta sem a utilização de culturas *starters* para a produção de algumas variedades de queijo, como tipo mussarela, cottage ou feta está em crescente uso (FOX; MCSWEENEY, 2004).

Os microrganismos são classificados de acordo com a sua temperatura ótima de crescimento. Bactérias mesofílicas, como *Lactococcus* e *Leuconostoc*, possuem temperatura ótima de crescimento entre 25°C e 30°C, enquanto bactérias termofílicas tais como *Lactobacillus*, *Streptococcus ssp thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, possuindo temperatura ótima de 40°C

a 45°C (DURLU-OZAKYA et al., 2001; MARTH; STEELE, 2001).

Para a produção do tipo mussarela pode-se utilizar *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, microrganismos *starters* termofílicos homofermentativos. Ambos transportam lactose para a célula via sistema de permease, onde é hidrolisada a galactose e glicose pela  $\beta$ -galactosidase. A glicose é então metabolizada pela via glicolítica, enquanto algumas cepas não conseguem metabolizar a galactose, sendo esta excretada para fora da célula. Outro microrganismo termofílico homofermentativo utilizado para a produção de mussarela é o *Lactobacillus helveticus*, que possui a habilidade de metabolizar a galactose via glucose-6-fosfato usando a rota de Leloir (WALSTRA et al.,1999). *S. thermophilus* e *L. helveticus* produzem ácido láctico L(+) enquanto *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* produz ácido láctico D(-).

#### 2.1.6 Culturas *starters*

Podemos definir as culturas como:

##### a) Mesofílico

Cultura associada dominada por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

As culturas lácticas mesofílicas são utilizadas largamente na fabricação de queijos frescos, de massa crua e de massa semicozida. Os queijos podem ter olhaduras ou massa compacta, sem aberturas. Para se obter o efeito desejado no queijo, o fermento poderá ter poder acidificante, aromatizante ou uma combinação dos dois. No Brasil, culturas tipo “O”, à base de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* têm sido comumente empregadas na

fabricação de queijos Prato, Minas, Mussarela e Saint-Paulin (FURTADO, 1990).

Algumas cepas de *L. Lactis* metabolizam citrato, presente no leite, a diacetil, componente de sabor importante e liberam dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em algumas reações. Elas são consideradas citrato positivas (Cit +) ou biovariantes *diacetylactis* de *L. lactis*. O *L. lactis* é homofermentativo e metaboliza lactose produzindo (L+) lactato pela via glicolítica (STANLEY, 1998).

O uso de mesofílicos é comum na fabricação de queijos para consumo direto, já que na elaboração a massa não é aquecida de maneira geral a temperaturas superiores a 40°C. Mantém-se, assim, um teor de umidade mais alto na massa. Assim, a massa após a dessoragem fica em uma câmara fria (8 - 10°C) ou em imersão em água gelada; no dia seguinte, deixa-se à temperatura ambiente até que se atinja a acidez ideal para a filagem (FOX; MCSWEENEY, 2004).

#### b) Termofílico

Cultura associada dominada por *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*.

Esta cultura, à base de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, possui fortes produtores de ácido (*S. thermophilus* inicia rapidamente a produção de ácido durante a elaboração, por ser menos sensível do que *L. bulgaricus* à temperatura de cozimento); é geralmente empregada no processo de elaboração da mussarela para pizza, que requer um queijo com menor teor de umidade e de corpo mais firme. Empregando-se a cultura termofílica, a massa pode ser filada no mesmo dia de fabricação – geralmente em torno de quatro a seis horas após a adição do fermento (FURTADO, 1990).

De acordo com Stanley (1998), a galactose acumulada no meio pode causar problemas em certos produtos lácteos, por exemplo, ela pode agir como uma fonte de energia para bactérias do ácido lático não iniciantes em variedades de queijos suíços aumentando o desenvolvimento de sabor indesejável e, em mussarela para pizza a galactose pode causar “browning” (reação de Maillard) durante a tosta da pizza. Outra importante diferença taxonômica e econômica das bactérias do ácido lático termofílicas se relaciona às habilidades para metabolizar a galactose: somente *Lb. helveticus* (e possivelmente poucas cepas de *L. bulgaricus*) pode realizar essa ação metabólica, enquanto os outros excretam galactose para o meio.

### 2.1.7 Sinerese

O coágulo obtido por acidificação ou ação de enzimas no leite, quando cortado ou quebrado, provoca a contração da matriz de paracaseína e a consequente expulsão da fase aquosa presente no gel. Esse processo de sinerese permite o controle da umidade do queijo, da atividade dos microrganismos e ação das enzimas, da bioquímica da maturação e da estabilidade do queijo (FOX et al., 2000).

A massa deve ser cortada cuidadosamente em cubos com lira. O processo de sinerese resultante da contração na estrutura proteica do leite é favorecido com o aumento da temperatura, menor tamanho dos grãos, redução do pH e intensidade e duração da mexedura. A umidade final depende da taxa de contração da estrutura proteica (JERÔNIMO, 2005).

O corte da coalhada para a produção de mussarela deve ser feita objetivando-se a obtenção de grãos de tamanho semelhante a uma ervilha visando eliminar o soro, originando uma massa compacta. Para que os grãos percam a quantidade adequada de soro é necessária a agitação ou mexedura da

mistura soro e grãos, mantendo esses grãos dispersos. Essa agitação deve ser contínua com movimentos lentos no início, devido à fragilidade dos grãos. À medida que os grãos se tornam mais firmes devido à dessoragem, a agitação pode ser mais intensa (OLIVEIRA, 1986).

a) 1ª Mexedura

Deve ser realizada lentamente por 10 minutos a fim de favorecer a liberação do soro e consequente a perda de umidade, tornando o grão mais firme e menos quebradiço. Deve ser realizada de forma mais lenta, evitando-se quebrar excessivamente os grãos, preparando-os para a segunda mexedura (WALSTRA, 2006).

b) 2ª Mexedura

É realizada com movimentos mais intensos quando comparado aos realizados na primeira mexedura e tem a finalidade de retirar o soro dos grãos (sinérese) até alcançar o ponto (FOX; MCSWEENEY, 2004).

### **2.1.8 Fermentação**

A acidificação da massa é uma etapa imprescindível e deve ser cuidadosamente controlada, pois a conversão da tricálcio-paracaseína em dicálcio-paracaseína, realizada pelo ácido láctico durante a exposição à alta temperatura da água é que dará a elasticidade adequada ao queijo (TEIXEIRA; BASTIA NETTO; OLIVEIRA, 2005).

Para que ocorra a acidificação, a massa deverá ficar exposta à temperatura ambiente (quando se tratar de cultura mesofílica) até atingir o pH ideal, que varia de 4,8 a 5,4.

Quando se trabalha com cultivos mesofílicos se usa sempre uma combinação de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (denominação antiga *Streptococcus lactis*) e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (denominação antiga *Streptococcus cremoris*) (FURTADO, 1997). Estes tipos de cultivo são mais lentos para produzir acidez e geralmente só permitem a filagem da massa no dia seguinte à fabricação (FURTADO, 1997).

Tem-se observado na prática, que a inclusão de *L. helveticus* é interessante, pois, de acordo com Oberg et al. (1991) houve um aumento na elasticidade e um decréscimo no escurecimento, já que o *L. helveticus* degrada a galactose reduzindo o efeito de “browning” em mussarelas.

### **2.1.9 Filagem**

Pelo termo “filata”, entende-se os queijos cuja massa fermentada é submetida a um tratamento térmico que lhe confere uma plasticidade singular. O queijo passa então a apresentar uma estrutura fibrosa característica, com fibras orientadas na mesma direção em resultado do processo de filagem. Essas fibras podem ser alongadas consideravelmente sem se romper. Essa elasticidade está relacionada a dois fatores fundamentais: à presença predominante de caseína intacta e à concentração típica de cálcio na massa (FURTADO, 1997).

A característica que permite à mussarela ser esticada ou filada é dada pela remoção de cálcio da massa durante a fermentação e essa capacidade da massa de sofrer esticamento é um fenômeno químico. Quando o coalho (renina) é adicionado ao leite no pH=6,2 é formado o paracaseinato dicálcio que é insolúvel e sofre precipitação, originando uma rede tridimensional, a massa do queijo. Com a subsequente atuação do ácido láctico (produzido pela fermentação bacteriana ou adicionado ao leite), o paracaseinato dicálcio é convertido a

paracaseinato monocálcio, que apresenta as características de esticamento (CORTEZ, 1998).

### 2.1.10 Adição de sal

A adição de sal, além da característica sensorial que confere ao produto, possui algumas interferências tecnológicas de interesse para a indústria. Concentrações moderadas de NaCl aumentam a volumosidade das micelas de caseína nativas (FAMELART; LE GRAET; RAULOT, 1999) e as coaguladas por enzimas (CREAMER, 1985). Observações em microscopia eletrônica indicam que o volume da matriz de caseína aumenta e o volume da fase intersticial diluída diminui em mussarela salgada (PAULSON; MCMAHON; OBERG, 1998).

A hidrólise da  $\alpha_{s1}$ -caseína por enzimas coagulantes no leite é fortemente influenciada pela concentração de NaCl. A atividade proteolítica da quimosina, pepsina e coalho obtidos por *Rhizomucor miehei* e *Cryphonectria parasítica* e diluído em frações de caseína são estimuladas pelo aumento da concentração de NaCl, até uma concentração ótima de 6% w/w (GOUDA, 1987). Em concentrações superiores de NaCl, ocorre uma inibição da atividade, mas uma proteólise limitada pode ocorrer sobre a  $\alpha_{s1}$ -caseína ao nível de 20% w/w de NaCl (GOUDA, 1987).

Em todo o caso, a degradação da  $\alpha_{s1}$ -caseína é retardada por concentrações muito baixas de NaCl em mussarela (1,36% w/w) (GUO; GILMORE; KINDSTEDT, 1997).

Após a moldagem e resfriamento, os queijos são salgados em salmoura mantida em temperatura de 10 a 12°C, por 18 horas para cada quilo de queijo em



forma de bloco. Por 20 minutos para queijos em formato de bolinhas (40 gramas cada) e 10 minutos para queijos em formato de palitos (20 a 30 gramas cada). Após a salga, os queijos podem ser embalados ou consumidos.

Para a preparação da salmoura calcula-se a quantidade de 3 litros para cada quilo de queijo. Para cada 10 litros de água deve-se utilizar 2,2 a 2,4 quilos de sal (FOX; MCSWEENEY, 2004).

### **2.1.11 Estabilização**

Durante o período de estabilização do queijo ocorrem transformações necessárias para o desenvolvimento de suas características desejáveis, ocasionadas pela atividade proteolítica do tipo de cultura e do agente coagulante residuais no queijo. Nesse período a matriz proteica, composta de caseína insolúvel, dilata-se a nível microestrutural, formando gel hidratado. Paralelamente, ocorre a solubilização progressiva da caseína intacta devido à ação do NaCl proveniente da salga do queijo. Nesse período ocorrem duas fases distintas no desenvolvimento da textura, decorrente do papel desempenhado pela  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ -caseínas. Na primeira fase a  $\alpha_{s1}$ -caseína intacta, que impõe rigidez à matriz do queijo, experimenta uma hidrólise pelo agente coagulante, surgindo o  $\alpha_{s1}$ -I peptídeo, resultando no enfraquecimento da rede de caseína do queijo, responsável pelo desenvolvimento das propriedades funcionais ou reológicas durante os primeiros 14 dias, tornado a textura borrachenta da massa do queijo jovem em um produto mais liso e homogêneo. Durante o período de armazenagem e em altas temperaturas, as  $\alpha_{s1}$ -caseína restantes são desdobradas. A segunda fase envolve uma mudança gradual na textura do queijo, onde a  $\beta$ -caseína intacta torna-se um fator significativo na manutenção da estrutura do queijo em temperatura mais elevada (WALSTRA, 2006).

A atividade proteica tem sua ação auxiliada pelo teor de umidade acumulada na matriz proteica, derivada da fase soro/gordura, que contribui para o desenvolvimento das características dos queijos. No queijo tipo mussarela a distribuição de água é diferente dos outros queijos, resultando na sua microestrutura incomum causada pela filagem (FOX; MCSWEENEY, 2004).

Queijos que passaram pelo processo de coagulação enzimática são maturados por um período de duas semanas, por exemplo, a mussarela, até dois anos ou mais, como o parmesão. A maturação é um processo muito complexo no queijo e se encarrega de mudanças bioquímicas e microbiológicas na massa que resultam em desenvolvimento das características de *flavor* e textura de diferentes variedades (FOX et al., 2000).

A temperatura recomendada para o armazenamento refrigerado de produtos lácteos situa-se entre 4°C a 8°C, sendo 10°C a temperatura máxima admissível para a estocagem de todos os alimentos perecíveis (HOBBS; ROBERS, 1993). A adição de bactérias produtoras de ácido láctico destinado à fabricação de queijo, além de fermentar a lactose também é de extrema importância para prover enzimas proteolíticas que favoreçam a degradação proteica durante o processo de maturação (VISSER, 1998). O uso de cultura de *L. helveticus* aumenta a proteólise do queijo. Assim, a proteólise tem sido confirmada como o evento mais importante, pois não somente intervém no desenvolvimento do sabor como também contribui para as mudanças texturais do queijo (SOUZA; ARDO; McWEENEY, 2001). A produção de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres é resultante das proteinases e peptidases das bactérias lácteas sobre os peptídeos de alto e baixo peso molecular produzidos a partir da hidrólise da  $\alpha$ S1-caseína pela quimosina (FOX et al., 1996). Na mussarela, devido ao curto tempo de maturação, o principal agente de cura é o coalho responsável pela proteólise primária do queijo (CREAMER, 1976).

A proteólise ocorre em função de alguns agentes de cura, dependendo da variedade do queijo: coagulante residual; enzimas naturais do leite, por exemplo a plasmina; fermento láctico e suas enzimas; fermento secundário, como as bactérias propiônicas, leveduras, mofos e suas enzimas e bactérias contaminantes (FOX et al.,1988).

## **2.2 Congelamento**

Há um interesse comercial nos efeitos do congelamento dos queijos visando prolongar a sua vida útil ou adaptar o seu processo produtivo a variações de mercado. Isso se torna especialmente importante para produtores que enfrentam flutuações de mercado e sazonalidades de produção. O congelamento, a estocagem em temperaturas de congelamento e o derretimento podem afetar as propriedades físicas do queijo. As melhores condições reportadas para alguns tipos de queijo foram as de congelamento logo após a salga, procedendo com a maturação após o descongelamento (FONTECHA et al., 1996).

Existem relativamente poucos estudos sobre o efeito do congelamento, sobre as características físico-químicas e sobre as microestruturas do queijo (FONTECHA et al.,1996; PEREZ-MUNUERA; LLUNCH, 1999; TEJADA et al., 2002). Esses estudos mostraram que as modificações das propriedades físico-químicas do queijo tipo mussarela devido ao processo de congelamento variam muito, dependendo da metodologia e das condições de operação do congelamento, estocagem e descongelamento.

Chaves, Viotto e Grosso (1999) observaram que imediatamente após o descongelamento, amostras de queijo tipo mussarela apresentaram maior capacidade de derretimento, mas após uma semana de estocagem a 4°C não foi encontrada diferença entre as amostras resfriadas e aquelas descongeladas.

Califano e Bevilacqua (1999) reportam que a composição de ácidos orgânicos em amostras de mussarela que foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes da maturação completa não diferiram significativamente das amostras refrigeradas a  $4^{\circ}\text{C}$  com o mesmo tempo de estocagem. Kuo e Gunasekaran (2003) comparou o período de estocagem a  $7^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$  em relação ao derretimento, elasticidade e a microestrutura de mussarela pasta filata e non pasta filata. Eles concluíram que a mussarela pasta filata deve ser estocada por uma semana a  $7^{\circ}\text{C}$  antes de ser congelada e pode ser mantida por quatro semanas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para se obter um bom derretimento e elasticidade, desde que o produto final seja resfriado por sete dias antes do consumo.

O processo de congelamento é hoje prática corrente por parte de alguns produtores de queijo, mas na generalidade aplica-se empiricamente sem conhecimento dos respectivos efeitos, negativos ou positivos. Os danos podem depender do tipo de queijo (composição e tecnologia de produção), condições de congelamento/descongelamento e mesmo dos parâmetros usados para avaliá-los.

### **2.3 Propriedades funcionais**

A funcionalidade do queijo é definida pela sua reologia, físico-química e microestrutura, que afeta o comportamento do queijo no alimento durante a sua preparação, processamento, estocagem, cozimento ou consumo (FOX et al., 2000). As propriedades funcionais são essenciais para determinar a qualidade e aceitação do queijo tipo mussarela (KINDSTEDT; CARIĆ; MILANOVIĆ, 2004). Podemos nomear as propriedades funcionais como sendo: elasticidade, derretibilidade, escurecimento e formação de óleo livre em queijo tipo mussarela, sendo estas altamente dependentes da composição e estrutura do queijo. Umidade, pH, gordura, minerais e a proteólise interferem nas funcionalidades do queijo (GUINEE et al., 2002; KINDSTEDT; GUO, 1997;

METZGER et al., 2001). As características de textura dos queijos são determinadas pelas propriedades estruturais combinadas da matriz proteica e dos glóbulos de gordura presentes no meio (LOBATO-CALLEROS et al., 2007).

a) Derretibilidade

A habilidade das partículas do queijo fluírem em uma massa fundida contínua e uniforme é definida como derretibilidade (KINDSTEDT, 1993). O conteúdo de gordura e as interações entre as proteínas com a água são os dois principais fatores determinantes para a derretibilidade da mussarela (MCMAHON; FIFE; OBERG, 1999). O tipo de matriz proteica desempenha um papel chave na determinação da derretibilidade do queijo tipo mussarela (GUO; GILMORE; KINDSTEDT, 1997; MCMAHON; OBERG, 1998; MCMAHON; FIFE; OBERG, 1999). É sugerido que durante a maturação, as proteínas absorvem soro das imediações, aumentando a derretibilidade pela transferência de água dos canais da interação gordura soro para a matriz proteica, resultando em uma diminuição das interações hidrofóbicas na matriz proteica (MCMAHON; FIFE; OBERG, 1999). A homogeneização reduz o tamanho do glóbulo de gordura proporcionando um tamponante forte na matriz de caseína, resultando em um decréscimo da derretibilidade (TUNICK, 1994). A derretibilidade dos queijos também depende do tipo de coagulante. Três tipos de coagulantes são utilizados na produção de mussarela: protease *Endothia parasitica*, quimosina e protease *Mucor miehei*. Durante 50 dias de estocagem a 4°C observa-se que queijos produzidos com *Endothia parasitica* obtiveram maior derretibilidade, menor viscosidade aparente e maior liberação de óleo do que os outros queijos, sendo que os outros dois tratamentos possuíram características funcionais similares (YUN; BARBANO; KINDSTEDT, 1993).

b) Elasticidade

Elasticidade é a tendência de algo formar um fio fibroso estendido (KINDSTEDT, 1993). Essa propriedade única do queijo tipo mussarela torna o seu uso adequado como ingrediente de pizza (GUINEE; O'CALLAGHAN, 1997). Pelas ações, pelo calor e movimentos de tração, a massa é transformada em uma estrutura fibrosa, processo conhecido como filagem. Essa plastificação necessita de um rearranjo da matriz de paracaseína com aprisionamento de gordura e água em grandes bolsas paralelas às fibras de proteína (FOX et al., 2000). O tratamento térmico aplicado à mussarela durante a filagem também afeta a microbiota e as propriedades proteolíticas durante os períodos de estabilização e estocagem. Entretanto, quando a temperatura de filagem for abaixo de 60°C, as bactérias *starters* termofílicas e coagulantes residuais permanecem ativas no queijo durante a estabilização (KINDSTED et al., 2004). Durante a estabilização, a proteólise resulta no aumento de porosidade da matriz de caseína e, por isso, a resistência da elasticidade é diminuída (BERTOLA et al., 1996; TUNICK et al., 1997). Durante a estabilização as interações proteína-proteína e proteína-cálcio submetem a reversão parcial com a dissociação do cálcio e a interação da água com fibras de paracaseína. Isso, por sua vez, desencadeia mudanças na microestrutura e no desenvolvimento de mais fluidez, elasticidade e menos consistência adesiva.

### c) Óleo livre

A formação de óleo livre é geralmente conhecida como um vazamento de óleo ou desprendimento de gordura líquida da massa de queijo derretido, formando bolsões na superfície do produto. Óleo livre limitado ou excessivo é considerado defeito de qualidade do queijo tipo mussarela. A liberação de óleo ocorre por uma falha na matriz proteica, conseqüentemente permitindo a

combinação dos glóbulos de gordura e a movimentação para a superfície de bolsas de óleo (ROWNEY et al., 1999). Existe uma correlação entre a magnitude da aglomeração e o tamanho do glóbulo de gordura para a consistência do glóbulo e a interação da interface óleo e água (CANO-RUIZ; RICHTER, 1997; OBERG; MCMANUS; MCMAHON, 1993). Além do mais, na produção de queijo o perfil de derretimento da gordura do leite também foi correlacionado com o conteúdo de óleo livre na mussarela (ROWNEY et al., 1999).

## **2.4 Reologia**

Qualquer material sob uma força externa apresenta uma resposta entre as duas extremidades do comportamento ideal, um sólido elástico e um líquido viscoso (GUILLET, 2010; GUNASEKARAN; AK, 2003). A maior parte dos alimentos se comporta como um material viscoelástico. Por esse motivo, dependendo da tensão aplicada e da escala de tempo, um corpo sólido pode apresentar propriedades da fase líquida e um material líquido pode apresentar propriedades de um corpo sólido. O comportamento viscoelástico de alimentos é estudado em reômetros que cisalham a amostra, para caracterização da textura de produtos alimentícios, utilizando parâmetros reológicos em tração e compressão (ISHIHARA et al., 2011; KARAMAN et al., 2011; KUMAGAI et al., 2009). Propriedades reológicas e de textura do queijo são afetadas por inúmeros fatores, muitos deles também influenciam o *flavor*, aparência e propriedades funcionais, importantes para o consumidor. Textura pode ser descrita em dois termos fundamentais: avaliação de textura através da estrutura física do material e a observação visual e de elementos perceptíveis do material (SZCZESNIAK; KLEYN, 1963).

A microestrutura do queijo tipo mussarela exhibe grandes glóbulos de gordura uniformemente distribuídos por uma matriz compacta de proteína com pouca agregação (TARANTO; YANG, 1981).

## 2.5 Análise de perfil de textura

A análise de perfil de textura (APT) é um método de avaliar as propriedades sensoriais dos alimentos, comprimindo-os uniaxialmente duas vezes em um movimento recíproco, simulando a ação da mandíbula. Desta forma a análise realiza uma primeira compressão seguida por um relaxamento e uma segunda compressão, obtendo-se um gráfico da força em relação ao tempo, baseado no qual se calcula os parâmetros de textura (BOURNE, 2002; HERRERO et al., 2007; LAU; TANG; PAULSON, 2000). Esses parâmetros podem ser definidos como: Dureza (Hardness, F2) é a força necessária para atingir dada deformação; Fraturabilidade (Fracturacility, F3) é a força necessária para fraturar o material; Coesividade (Cohesiveness,  $A_{4,6}/A_{1,3}$ ) é a extensão até a qual o material pode ser distendido antes de romper irreversivelmente; Elasticidade (Springness,  $t_{4,5}/t_{1,2}$ ) é a velocidade com que o material deformado volta à sua condição original após ser retirada a força deformante; Adesividade (Adhesiveness,  $A_{3,4}$ ) é a quantidade de força para simular o trabalho necessário para sobrepor as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície em contato com este; Gomosidade (Gumminess, dureza x coesividade); energia requerida para desintegrar um alimento semissólido até o ponto de ser engolido; Mastigabilidade (Chewiness, elasticidade x gomosidade) é a energia requerida para mastigar um alimento sólido até o ponto de ser engolido; Resiliência (Resilience,  $A_{2,3}$ ,  $A_{1,2}$ ) é a medida de quanto a amostra se recupera de sua deformação, tanto em termos de velocidade quanto em relação à velocidade e suas forças derivadas.



A análise de perfil de textura e testes similares de compressão uniaxial a temperaturas entre 10 e 20°C são utilizados para caracterizar a dureza e a firmeza do queijo. Durante essas análises o queijo tipo mussarela apresentou uma significativa tendência ao amolecimento durante o tempo e o nível de proteólise (KINDSTEDT et al., 1995; YUN; BARBANO; KINDSTEDT, 1993). O mesmo foi observado com o aumento do conteúdo de gordura e água (TUNIK et al., 2000) e com o decréscimo de cálcio (GUINEE et al., 2002). Os efeitos do tipo de leite, padronização, relação proteína/gordura, tratamento térmico, homogeneização, pH de coagulação, tipo de coagulante e composição foram observados como sendo influentes na reologia do queijo tipo mussarela (JANA; UPADHYAY, 1992; MASI; ADDEO, 1984; PATEL; VYAS; UPADHYAY, 1986; TUNICK et al., 1991). Queijos produzidos com leite possuindo relação proteína/gordura baixa (0,05) demonstraram menor dureza, coesividade, mastigabilidade e gomosidade do que queijos produzidos com maior relação (0,09) (RAVI SUNDAR; UPADHYAY, 1991).

O queijo tipo mussarela se comporta como um material semissólido viscoelastoplástico à temperatura ambiente enquanto que exibe viscoelasticidade em temperatura de 60°C. Sua tensão de cedência diminui gradualmente com o aumento da temperatura na medição de textura por reômetro capilar (MULIAWAN et al., 2007). O queijo tipo mussarela apresenta baixo derretimento, liberação de gordura, sabor ácido, umidade superficial, pobre coesividade e descoloração após o descongelamento, porém as suas características normais retornam de 1 a 3 semanas após o degelo (GHOSH; SINGH; KANAWJIA, 1990). A redução do conteúdo de gordura (3,5 para 2,0%) do leite para a fabricação do queijo tipo mussarela eleva a coesividade, a gomosidade e a mastigabilidade e reduz a elasticidade (VALLE et al., 2004).

Grande parte da percepção do alimento está relacionada ao mecanismo de fratura. A textura é baseada pela combinação das propriedades mecânicas e de

fratura e as suas modificações e expressões sensoriais durante a mastigação. A dificuldade da análise neste caso possui inúmeros fatores. A grande complexidade mecânica dos alimentos, o processo mecânico e a mastigação combinam muitos aspectos que a ciência necessita separar para quantificar e analisar o alimento presente na boca, pois permanece continuamente mudando suas propriedades, temperatura, conteúdo de umidade e pH. Por este motivo são utilizados dois tipos de abordagens sobre a textura em alimento: aplicação de deformação mecânica para analisar a resposta do alimento e a correlação dos resultados com os de um painel sensorial (KILCAST, 1999).

## **2.6 Viscoelasticidade e modelos reológicos**

A maioria dos alimentos apresenta características tanto de sólido elástico como de líquido viscoso, podendo assim ser explicado por teorias de elasticidade e viscoelasticidade (CUNHA, 2002). As propriedades reológicas de um material viscoelástico (módulo de elasticidade, módulo de rigidez, etc.) são função do tempo de aplicação da tensão ou da deformação. As ligações entre os elementos estruturais do alimento irão ocasionalmente se quebrar ou reorganizar, o que explica a dependência do tempo no comportamento reológico do produto (LUCEY; JOHNSON; HORNE, 2003). Um material viscoelástico pode responder linear ou não linearmente (RAO, 1992). Alguns materiais apresentam comportamento viscoelástico linear apenas até certo limite de deformação (em geral muito pequeno). Isso ocorre porque quando a deformação é pequena ou é aplicada de forma suficientemente lenta, os arranjos moleculares estão muito próximos ao equilíbrio. Neste caso, a resposta mecânica é apenas uma reflexão dos processos dinâmicos ao nível molecular que mudam constantemente e que ocorrem mesmo quando o sistema está em equilíbrio (CUNHA, 2002).

A segunda classe de materiais viscoelásticos, os não lineares, exibem propriedades mecânicas que variam não apenas com o tempo, mas também com a magnitude da tensão aplicada. Esse tipo de material pode não apresentar nenhuma zona elástica e, em geral, é representado por relações não lineares entre a tensão e a deformação (RAO, 1992).

### **2.6.1 Teste de relaxação de tensão**

O comportamento reológico de materiais idealmente elásticos muitas vezes não é suficiente para explicar o comportamento de alimentos sólidos e semissólidos. A grande maioria dos alimentos apresenta características de sólidos elásticos e líquidos viscosos, sendo classificados como viscoelásticos. Teorias de elasticidade podem explicar o comportamento desses materiais e, por este motivo, o conhecimento dos conceitos básicos, como força, deformação, deformação relativa e tensão, são importantes para descrever seu comportamento reológico (RAO, 1992).

Embora a princípio o ensaio de relaxação possa ser feito em qualquer configuração (tração, compressão, cisalhamento, torção, flexão, etc.) o mais comum em estudos de queijo é a compressão. Quando uma deformação instantânea constante é aplicada a um material viscoelástico em condição isotérmica, a tensão necessária para manter essa deformação não é constante, mas diminui com o tempo (GUNASEKARAN; AK, 2003). As curvas de relaxação podem ser utilizadas para calcular o módulo de elasticidade em função do tempo. No caso de alimentos, é importante que a deformação aplicada seja suficientemente pequena para minimizar a ocorrência de alterações estruturais no material (CUNHA, 2002).

### **2.6.2 Modelo de Maxwell**

O modelo de Maxwell possui dois elementos simples que combinados de formas distintas representam diferentes comportamentos. Esses dois elementos são o elemento elástico ideal, que pode ser representado como uma mola e cujo comportamento é definido pela constante elástica  $E$ , e o elemento viscoso ideal que é representado por meio de um amortecedor e cujo comportamento é definido pela sua viscosidade  $\eta$  (CAMPUS et al., 2010). Este modelo é a mais simples analogia mecânica para representar a viscoelasticidade, obtida pela associação de uma mola de módulo  $E$  em série com um amortecedor que contém um fluido de viscosidade  $\eta$ .

O modelo de Maxwell é comumente utilizado para predição do comportamento de relaxação da tensão, pelo fato da associação em série resultar em tensões iguais nos dois elementos (mola e amortecedor), enquanto a deformação, ou alongamento total, é a soma das deformações nos dois elementos.

No modelo de Maxwell com uma deformação constante ( $\varepsilon_0$ ), a tensão ( $\sigma(t)$ ) após um tempo  $t$  (NOBILE et al., 2007) é dado por:

$$\sigma(t) = \varepsilon_0 \left[ E \cdot \exp\left(-\frac{t}{\lambda} + E\varepsilon\right) \right] \quad (01)$$

onde  $E$  é o módulo de elasticidade do material,  $e$  é o módulo de elasticidade de equilíbrio e  $\lambda$  é o tempo de relaxação, dado por  $\eta/E$ .

Alguns alimentos viscoelásticos não seguem o modelo simplificado de Maxwell, necessitando de modelos mais complexos para descrever seu comportamento. Um exemplo desse caso é o modelo de Maxwell generalizado, que consiste em um número infinito de modelos de Maxwell mais uma mola em paralelo.

As curvas de relaxação (tensão *versus* tempo) podem ser ajustadas por meio da equação 02, que fornece parâmetros viscoelásticos do modelo generalizado de Maxwell.

$$\sigma(t) = \varepsilon_0 \left[ E_1 \exp\left(-\frac{t}{\lambda_1}\right) + E_2 \exp\left(-\frac{t}{\lambda_2}\right) + \dots + E_n \right] \quad (02)$$

onde  $E_1, E_2, \dots$  são os módulos de elasticidade do corpo elástico ideal e  $\lambda_1$  e  $\lambda_2, \dots$  são os tempos de relaxação. A viscosidade do elemento  $i$  pode ser calculada conforme a equação 03:

$$\eta_i = E_i \lambda_i \quad (03)$$

As propriedades de elasticidade ( $E_e, E_1, E_2, \dots$ ) quantificam a rigidez do material (RODRÍGUEZ-SANDOVAL, 2009).

Em relação ao tempo de relaxação ( $\lambda$ ), Bhattacharya (2010), Campus et al. (2010) e Nobile et al. (2007) afirmam que maiores valores dessa propriedade indicam materiais mais elásticos e conseqüentemente mais firmes. Quanto maior os valores da viscosidade ( $\eta$ ) maior o comportamento sólido do material (RODRÍGUEZ-SANDOVAL, 2009).

Rensis, Petenate e Viotto (2009) utilizaram o teste de relaxação para caracterizar reologicamente queijos tipo prato com teor reduzido de gordura após 30 e 60 dias de armazenamento refrigerado. O modelo de Maxwell generalizado utilizado neste estudo foi capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento viscoelástico dos queijos, já que as curvas experimentais obtidas apresentaram boa correlação. Em um estudo sobre o comportamento reológico de sementes de trigo e canola, Bargale, Irudayaraj e Marquis (1995) concluíram que o módulo de elasticidade e a máxima tensão de contato foram fortemente influenciados pela umidade das sementes, sendo que esses valores variaram

inversamente com o teor de umidade. O modelo de Maxwell com três termos de decaimento exponencial foi o que melhor descreveu o processo de relaxação de tensão.

### 2.6.3 Modelo de Peleg

Com o objetivo de simplificar a análise dos parâmetros reológicos de alimentos, Peleg (1979) propôs a linearização da curva do modelo de Maxwell generalizado. No modelo de Peleg, os dados da relaxação de tensão podem ser interpretados por dados da tensão normalizada versus tempo

$$\frac{\sigma_t}{\sigma_0 - \sigma(t)} = k_1 + k_2 t \quad (04)$$

onde  $\sigma(t)$  é a tensão no tempo  $t$  durante o teste,  $\sigma_0$  é a tensão inicial, e  $k_1$  e  $k_2$  são constantes. O inverso de  $k_1$  representa a taxa de decaimento inicial enquanto que  $k_2$  é o valor hipotético da força assintótica normalizada que permanece sem relaxar (RODRÍGUEZ-SANDOVAL, 2009).

De acordo com Bhattacharya, Narasimha e Bhattacharya (2006), Rodríguez-Sandoval et al., (2009) e Sozer, Dalgic e Kaya (2007), a utilização do modelo de Peleg para descrever os dados de relaxação é um meio simples de descrever e comparar a relaxação de tensão com dados da literatura sobre reologia, uma vez que utiliza somente dois parâmetros: a taxa de decaimento inicial ( $1/k_1$ ) e a tensão normalizada ( $k_2$ ). O parâmetro  $k_1$  é uma medida da facilidade com que o material se deforma, ou seja, valores mais altos que  $k_1$  sugerem um material mais duro, o qual dissipa menos energia, exigindo, assim,

mais força para ser comprimido (GUO; CASTELL-PEREZ; MOREIRA, 1999;

RODRÍGUEZ-SANDOVAL et al., 2009). Já o parâmetro  $k_2$  representa o grau de relaxamento do material (BELLIDO; HATCHER, 2009; GUO;

CASTELL-PEREZ; MOREIRA, 1999; RODRÍGUEZ-SANDOVAL et al., 2009)

e segundo Peleg (1980)  $1/k_2$  representa as condições de equilíbrio do material, ou seja, a porção do material que permaneceu sem relaxar no estado de equilíbrio. Bellido e Hatcher (2009) utilizaram o modelo de Peleg para apresentar os dados de relaxação de tensão de macarrão asiático e observaram que o procedimento foi eficaz com o entendimento das propriedades viscoelásticas do material.

## **2.7 Teste de compressão uniaxial**

Em ensaios de compressão uniaxial utiliza uma deformação suficientemente elevada para levar à ruptura do material, com isso é possível a caracterização do produto a baixas ou altas deformações, independentemente do tipo de força aplicada (ISHIHARA et al., 2011; KARAMAN et al., 2011; KUMAGAI et al., 2009). No ponto de ruptura pode-se determinar as propriedades que fornecem informações sobre as características do material e correlacioná-las com a textura do produto. A tensão de ruptura ( $\sigma_{rup}$ ) e a

deformação de ruptura (deformação de Hencky –  $\varepsilon_{rup}$ ) definidas, respectivamente, pelas equações 05 e 06, devem ser utilizadas em ensaios de ruptura com altos valores de deformação, porque consideram as modificações que o material passa durante o experimento (BAYARRI et al., 2007; COSTELL; PEYROLÓN; DURÁN, 2000; SATO; SANJINEZ-ARGANDOÑA; CUNHA, 2004):

$$\sigma = F \left( \frac{h_0 - \Delta h}{A_0 \cdot h_0} \right) \quad (05)$$

$$\varepsilon = \ln \left( \frac{h_0}{h_0 - \Delta h} \right) \quad (06)$$

onde F é a força aplicada,  $h_0$  a altura inicial,  $A_0$  a área inicial da amostra e  $\Delta h$  a variação na altura da amostra durante a compressão. A tensão de ruptura ( $\sigma_{rup}$ ) é definida como a tensão necessária para romper a matriz alimentícia (CUNHA, 2002) e, de acordo com Marudova e Jilov (2003), maiores tensões de ruptura pressupõem um comportamento mais rígido. Já a deformação de ruptura (deformação de Hencky –  $\varepsilon_{rup}$ ) indica o quão quebradiça é a textura do alimento, isto é, até que ponto o produto pode ser deformado sem se romper (CUNHA, 2002). Materiais com alta tensão e deformação de ruptura são rígidos e fortes, enquanto materiais com elevada tensão de ruptura, mas com baixo valor de deformação de ruptura são rígidos e quebradiços. O módulo de elasticidade ( $E$ ) e o trabalho na ruptura ( $W_{rup}$ ) são calculados por meio dos gráficos  $\sigma$  (tensão) –  $\varepsilon$  (deformação) (Figura 16) sendo que  $W_{rup}$  é dado pela área sob a curva até o ponto de ruptura e o módulo de elasticidade pelo coeficiente angular da parte linear inicial da curva (THYBO; NIELSEN; MARTENS, 1999).

Géis com elevados valores de módulo de elasticidade ( $E$ ) são mais rígidos (FRAEYE et al., 2010). O trabalho na ruptura é a propriedade que indica



a energia necessária para induzir a ruptura do gel (ROOPA; BHATTACHARYA, 2009). Bayarri, Durán e Costell (2003) utilizaram o teste de compressão uniaxial para avaliar a relação das propriedades físicas de dois tipos de hidrocoloides e dois tipos de edulcorantes em sistemas modelo. Bayarri et al. (2007), para avaliar a influência da textura na percepção da doçura de géis também utilizaram o teste de compressão uniaxial. Por meio desse teste esses autores conseguiram correlacionar as propriedades de textura com a percepção de doçura.

## **2.8 Coloração**

De acordo com Perry (2004), a cor dos queijos está intimamente ligada à gordura do leite e, por isso, sujeita a variações sazonais. A cor é um importante fator de qualidade que o consumidor associa no momento da compra, constituindo o critério básico para sua seleção, a não ser que outros fatores como odor sejam marcadamente deficientes. A percepção da cor é um fenômeno fisiológico e que varia de acordo com a visão do observador e com a qualidade e intensidade da luz, bem como com as propriedades físicas e químicas do alimento. Além disso, a medição da cor requer que variáveis como a área do objeto, a luminosidade suficiente com espectro visível e a visão do homem sejam controladas.

Não existe uma recomendação geral quanto ao procedimento de mensuração da cor, pois os equipamentos usualmente utilizados (colorímetros e espectrofotômetros) podem apresentar características distintas quanto ao diâmetro de abertura, tipo de iluminante e ângulo de observação, produzindo resultados semelhantes mas não iguais. Um sistema de mensuração de cor muito utilizado em diversas áreas é o sistema  $L^* a^* b^*$ , também conhecido como CIELAB. Neste sistema,  $L^*$  indica luminosidade e  $a^*$  e  $b^*$  são coordenadas de cromaticidade, onde o eixo  $a^*$  vai de verde a vermelho e  $b^*$  vai de azul a

amarelo. Em cada uma dessas direções (eixos a e b) quando se caminha para as extremidades tem-se maior saturação da cor (MACDOUGALL, 1994).

Atualmente a medição instrumental de cor faz parte da rotina para o controle de qualidade dos alimentos. As diferentes técnicas de fabricação do queijo afetam a textura, o *flavor* e a coloração dos mesmos (DRAKE et al., 2009).

A coloração do queijo é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados com o leite utilizado para a fabricação e os fatores extrínsecos podem ser exemplificados como utilização de corantes, embalagem e estocagem do produto.

### **2.8.1 Fatores intrínsecos**

#### a) Dispersão da luz

O leite é um fluído complexo, constituído de três fases. Grande parte da massa do leite se comporta como uma solução verdadeira (FOX; MCSWEENEY, 1998). Neste caso inclui-se a lactose, minerais, vitaminas e outras pequenas moléculas em água. Esses componentes não influenciam na coloração do leite. Na fase aquosa estão dispersas proteínas a nível molecular e micelas de caseína na forma de grandes agregados de partículas em estado coloidal variando entre 50 a 600nm. Lipídios estão presentes no estado de emulsão em glóbulos variando entre 0,1 a 20  $\mu\text{m}$ . Micelas de caseína e glóbulos de gordura são os principais contribuintes para a opacidade do leite e suas cores são responsáveis pelo maior índice de refração do leite em relação à água.

A dispersão da luz no leite é causada pelas partículas de tamanho relativamente grande que possuem índice de refração diferente da água. Neste caso a dispersão da luz pelas micelas de caseínas e glóbulos de gordura contribui fortemente para a coloração do leite (WALSTRA, 1990). As proteínas do soro

são menores em tamanho e de baixa concentração, de forma a contribuir substancialmente para a dispersão da luz no leite. O tamanho da micela de caseína resulta em uma dispersão da luz, preferencialmente para a luz azul do que para a luz vermelha, conferindo um tom azulado ao leite desnatado. O soro do leite contém riboflavina que contribui para o tom amarelo-esverdeado do mesmo.

#### b) Composição do produto

A maior variação da coloração do leite e seus derivados é causada pelo conteúdo de gordura e proteína. Gorduras e proteínas, como visto anteriormente, são os principais agentes na dispersão da luz e transmitem a cor branca para o leite. Nota-se que transparência, brilho e brancura são particularmente vitais para discernir o teor de gordura no leite, variando de 0 a 4% (PHILLIPS et al., 1995).

#### c) Carotenóides/ $\beta$ -Caroteno

Em geral Carotenóides são  $C_{40}$  isoprenóides e tetraterpenos que se localizam nos plastídeos dos tecidos vegetais fotossintéticos e não-fotossintéticos (YOUNG, 1991). Entre os ruminantes, somente os bovinos apresentam alta concentração de carotenóides, especialmente os  $\beta$ -carotenos, devido à baixa síntese de vitamina A nos enterócitos (HINCU et al., 2010). Este fato confere ao leite uma cor ligeiramente amarela ao se comparar com o leite de búfala. Os carotenos nos glóbulos de gordura dispersam a luz amarela e são responsáveis por essa coloração no leite. A diversidade de cor dos carotenóides, que varia do amarelo claro ao vermelho escuro, está diretamente relacionada à sua estrutura. Carotenóides amarelos e laranjas são conhecidos como carotenos e os vermelhos são denominados licopenos. Quando as duplas ligações carbono-carbono são conjugadas, os elétrons da molécula podem se mover livremente

através dessas áreas. Este fato confere ao carotenóide a propriedade de absorver radiação na luz visível, formando, assim, a base para a sua identificação e quantificação, causando a absorção de vários comprimentos de onda. Com o aumento das duplas ligações, os elétrons associados a esses sistemas conjugados tornam-se mais móveis e requerem menos energia para alterar o seu estado. Isso causa uma diminuição na faixa de energia da luz absorvida pela molécula. Quanto mais comprimentos de onda de luz são absorvidos do espectro visível, maior a aparência avermelhada dos compostos. Consequentemente, carotenóides são potenciais biomarcadores na caracterização nutricional e sensorial de produtos lácteos, no rastreamento do leite e na determinação do animal de origem (NOZIERE et al., 2006). Carotenóides são sensíveis à luz, calor, oxigênio, ácidos e bases alcalinas e atuam como antioxidantes, sendo alguns precursores da vitamina A (STAN, 2007).

d) Biliverdina/Bilirubina

Biliverdina é um pigmento encontrado em leite de búfala fresco que possui coloração azul esverdeado. Esse pigmento confere ao leite de búfala aparência completamente diferente do leite de vaca (SAHAI, 1996).

e) Espécie

O leite desempenha o papel de alimento para filhotes de mamíferos, nutrindo-os completamente nos primeiros meses e conferindo proteção imunológica (WEBB; JOHNSON; ALFORD, 1974). A composição do leite dos mamíferos já foi amplamente estudada e documentada. Existem cerca de 4.000 mamíferos, dos quais 120 tipos de leite foram estudados e somente 16 espécies são utilizadas para o consumo humano (BYLUND, 1995). Diferentes espécies

de animal possuem diferentes necessidades nutricionais e habilidades digestivas (NELSON et al., 1951). Por isso existem muitas diferenças na composição do leite para as diversas espécies. Como resultado, o produto final preparado com leites de diferentes espécies possui ampla gama de *flavor* e aparência geral.

#### f) Alimentação Animal

Como mencionado, o conteúdo de gordura do leite influencia fortemente a cor do mesmo e de seus derivados. O leite de animais que se alimentam em pasto possui aparência diferente dos que se alimentam com ração. Este fato está associado com a alteração no perfil de ácidos graxos e dos carotenóides, particularmente o conteúdo de  $\beta$ -caroteno (CHILLIARD et al., 2000; NOZIERE et al., 2006) e pode também resultar em diferentes sabores e *flavor*. Dietas à base de pasto levam a um leite com concentrações maiores de  $\beta$ -caroteno do que dietas à base de concentrados e silagem de milho (HAVEMOSE et al., 2004; MARTIN et al., 2004).

### 2.8.2 Fatores extrínsecos

Assim como a variação intrínseca na aparência do queijo, a cor também pode ser afetada por características extrínsecas presentes nos processos de fabricação. Entre os fatores extrínsecos, a adição de cor desempenha o papel mais importante.

- a) Adição de corantes na massa. As cores do queijo são comumente categorizadas em pálido, amarelo, dourado, amarelo escuro, laranja, branco e branco calcário para variedades como o cheddar e a mussarela. A cor natural do queijo é branca com tons de amarelo. A

coloração laranja se deve a adição de extrato de semente de urucum (MARTINEZ et al., 2007).

## **2.9 Microscopia eletrônica de transmissão**

Na microscopia eletrônica de transmissão, a formação da imagem se deve ao espalhamento de elétrons que ocorre quando um feixe destes atravessa a amostra. A microscopia eletrônica de transmissão pode ser dividida em três componentes (WILLIAMS; BANKS, 1997): o sistema de iluminação, as lentes objetivas e o sistema de imagem.

O sistema de iluminação compreende a fonte a), que produz os elétrons e as lentes b) equipadas com um diafragma c), o qual direciona o feixe de elétrons para a amostra d). A lente usa um campo eletromagnético para focalizar o feixe de elétrons. Os elétrons são espalhados após passarem pela amostra. Eles são então transferidos para as lentes objetivas. A primeira imagem da amostra é formada pelas lentes objetivas e). A abertura da objetiva f) controla o espalhamento do feixe de elétrons e dá o contraste da imagem. O sistema de imagem utiliza diferentes lentes (lentes intermediárias g) e lentes projetoras h) para ampliar a imagem e focá-la na tela de visualização onde o operador pode observar a imagem ampliada da amostra (KORNMANN; LINDBERG; BERGLUND, 2001).

O protocolo de preparo das amostras se baseia na fixação química, que transforma o material biológico pela incorporação da substância química, que previne a degradação dos componentes celulares, a amostra fixada é desidratada, permitindo a realização de cortes ultrafinos e, ainda, promove resistência em relação ao ambiente do Microscópio Eletrônico de Transmissão. Por fim, os cortes são embebidos em metais pesados para aumentar a dispersão dos elétrons, que aumenta o contraste (ELTSOV et al., 2006).

Alimentos geralmente apresentam dificuldades para o microscopista por causa de sua composição heterogênea e forma física. No entanto, métodos simples foram desenvolvidos para lidar com amostras problemáticas. Amostras particularmente trabalhosas são as gorduras e alimentos que contêm gorduras, já que sua microestrutura é dependente de temperatura.

A microestrutura é um dos principais fatores que contribui para a textura e propriedades funcionais dos queijos. A maioria das propriedades estão associadas com a reologia dos queijos sólidos e derretidos.

## REFERÊNCIAS

ABREU, L. R. **Tecnologia de leite e derivados**. Lavras: UFLA, 2000. 205 p.

ALI, A. M.; ABDEL-RAZIG, K. A. Cholesterol content of mozzarella cheese during storage as affected by level of milk fat. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 10, 1, p. 65-70, 2011.

BARBANO, D. M. Controlling functionality of Mozzarella cheese through process control. In: MARSCHALL ITALIAN CHEESE SEMINAR, 36., 1999,

Madison. **Proceedings...** Madison: Rhone-Poulenc, 1999. 1 CD ROM.

BARGALE, P. C.; IRUDAYARAJ, J.; MARQUIS, B. Studies on rheological behaviour of canola and wheat. **Journal of Agricultural Engineering Research**, London, v. 61, n. 4, p. 267-274, 1995.

BAYARRI, S.; DURÁN, L.; COSTELL, E. Compression resistance, sweeteners diffusion and sweetness of hydrocolloids gels. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, p. 643-653, 2003.

BAYARRI, S. et al. Influence of texture on the temporal perception of sweetness of gelled systems. **Food Research International**, Barking, v. 40, p. 900-908, 2007.

BELLIDO, G. G.; HATCHER, D. W. Asian noodles: Revisiting Peleg's analysis for presenting stress relaxation data in soft solid foods. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 92, n. 1, p. 29-36, 2009.

BERTOLA, N. C. et al. Effect of freezing conditions on functional properties of low moisture Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79,

p. 185-190, 1996.



BHATTACHARYA, S.; NARASIMHA, H. V.; BHATTACHARYA, S. Rheology of corn dough with gum arabic: stress relaxation and two-cycle compression testing and their relationship with sensory attributes. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 74, n. 1, p. 89-95, 2006.

BHATTACHARYA, S. Stress relaxation behaviour of moth bean flour dough: product characteristics and suitability of model. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 97, p. 539-546, 2010.

BOURNE, M. C. Relationship between rheology and food texture. In: CHANES, J. W.; BARBOSA-CÂNOVAS, G. V.; AGUILERA, J. M. **Engineering and food for the 21st Century**. Boca Raton: CRC, 2002. Chap. 8, p. 291-306.

BRASIL. Portaria nº 364, de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, set. 1997. Seção 1, p. 19694-19695.

BYLUND, G. **Dairy processing handbook**. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB, 1995.

CAMPUS, M. et al. Stress relaxation behaviour and structural changes of muscle tissues from Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) following high pressure treatment. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 96, p. 192-198, 2010.

CALIFANO, A. N.; BEVILACQUA, A. E. Freezing low moisture Mozzarella cheese: changes in organic acid content. **Food Chemistry**, London, v. 64, p. 193-198, 1999.

CANO-RUIZ, M. W.; RICHTER, R. L. Effect of homogenization pressure on the milk fat globule membrane proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 2732-2739, 1997.

CASERIO, G. et al. Hygienic quality of Mozzarella cheese in relation to manufacturing technology. **Latte**, Milano, v. 8, p. 706-721, 1977.

CHALITA, M. A. N. et al. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. In: **47 Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER)**. 2009.

CHALITA, M. A. N. et al. Análise sócio-cultural do consumo de queijos e sua relação com a alimentação: diálogos entre classes sociais, estilos de vida e mercados de qualidade. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 48., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SOBER, 2010. 1 CD ROM.

CHAVES, W.; VIOTTO, H.; GROSSO, C. R. F. Proteolysis and functional properties of Mozzarella cheese as affected by refrigerated storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, p. 202–205, 1999.

CHILLIARD, Y. et al. Ruminant milk plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. **Annales de Zootechnie**. Versailles, v. 49, p. 181–205, 2000.

CORTEZ, M. A. S. **Uma alternativa tecnológica para evitar o escurecimento não-enzimático em queijo Mussarela**. 1998. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1998.

COSTELL, E.; PEYROLÓN, M.; DURÁN, L. Note: influence of texture and type of hydrocolloid on perception of basic tastes in carrageenan and gellan gels. **Food Science and Technology International**, London, v. 6, n. 6, p. 495-499, 2000.

CREAMER, L. K. Casein proteolysis in Mozzarella type cheese. **Journal of Dairy Science and Technology**, Hamilton, v. 11, n. 2, p. 130-131, 1976.

CREAMER, L. K. Water absorption by renneted casein micelles. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 40, p. 589-591, 1985.

CUNHA, C. R. **Efeito do uso de retentados de baixo fator de concentração no rendimento, proteólise e propriedades viscoelásticas de queijo Minas Frescal de reduzido teor de gordura**. 2002. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

DURLU-OZKAYA, F. et al. Technological important properties of acid

bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal**

**Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 861-870, 2001.

DRAKE, S. L. et al. Mapping differences in consumer perception of sharp cheddar cheese in the United States. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, p. 182–191, 2009. Suppl.

ELTSOV, M.; ZUBER, B. Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 156, n. 2, p. 246-254, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Produção, industrialização e comercialização**. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>>. Acesso em: 24 set. 2012.

FAMELART, M. H.; LE GRAET, Y.; RAULOT, K. Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl<sub>2</sub>: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, p. 293-297, 1999.

FEENEY, E. P.; FOX, P. E., GUINEE, T. P. Effect of ripening temperature on the quality of low moisture Mozzarella cheese: composition and proteolysis. **Lait**, Les Ulis, v. 81, p. 463-474, 2001.

FONTECHA, J. et al. Effects of freezing and frozen storage on the microstructure and texture of ewe's milk cheese. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 203, n. 3, p. 245-251, 1996.

FOX, P. F. et al. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Adv. Food Nutrition Research**, Philadelphia, v. 39, p. 163-328, 1996.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 2000.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. New York: Blackie Academic and Professional, 1998.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese: an overview. In: Fox, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 3rd ed. [S. l.]: Elsevier, 2004.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 10, n. 6, p. 522-535, 1988.

FRAEYE, I. et al. Influence of pectin structure on texture of pectin-calcium gels. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 11, p. 401-409, 2010.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. 20. ed. São Paulo: Globo, 1990. 295 p.

FURTADO, M. M. **Manual prático da mussarela (Pizza Cheese)**. Campinas: Master Graf, 1997. 70 p.

GHOSH, B. C.; SINGH, S.; KANAWJIA, S. K. "Rheological properties of Mozzarella cheese-a review." **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 43, n. 1, p. 71-80, 1990.

GOUDA, A. Degradation of casein fractions by milk clotting enzymes and the effect of sodium chloride. **Egyptian Journal of Dairy Science**, Cairo, v. 15, p. 15-23, 1987.

GRAIVER, N. G.; ZARITZKY, N. E.; CALIFANO, A. N. Viscoelastic Behavior

of Refrigerated Frozen Low-moisture Mozzarella Cheese. **Journal of Food**

**Science**, Chicago, v. 69, n. 3, p. 123-128, 2004.

GUILLET, A. On the non hookean elastic behavior of iron whiskers at high strain. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 64, n. 20, p. 2148-2150, 2010.

GUINEE, T. P. et al. Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**,

Champaign, v. 85, p. 1655-1669, 2002.

GUINEE, T. P.; O'CALLAGHAN, D. J. Use of a simple empirical method for objective quantification of the stretchability of cheese on cooked pizza pies.

**Journal of Food Engineering**, Essex, v. 31, p. 147-161, 1997.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. M **Cheese rheology and texture**. Florida: CRC, 2003. 512 p.

GUO, M. R.; GILMORE, J. K. A.; KINDSTEDT, P. S. Effect of sodium chloride on the serum phase of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 3092-3098, 1997.

GUO, Z.; CASTELL-PEREZ, M. E.; MOREIRA, R. G. Characterization of

masa and low moisture corn tortilla using stress relaxation methods. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 30, n. 2, p. 197-215, 1999.

HAVEMOSE, M. S. et al. Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, p. 563-570, 2004.

HEINEN, S. M. et al. Características microbiológicas de queijo mussarela de um laticínio da região oeste do Paraná. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 170-171, p. 374-375, 2009.

HERRERO, A. M. et al. Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. **Meat science**, Barking, v. 77, n. 3, p. 331-338, 2007.

HINCU, F. A. et al. Studies on the identification of carotenoids type biochemical markers. **Science Bulletin Biotechnology**, Bucharest, v. 14, n. 58, p. 64, 2010.

HOBBS, B. C.; ROBERS, D. **Intoxifecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1993. p. 128-141.

ISHIHARA, S. et al. Viscoelastic and fragmentation characters of model bolus from polysaccharide gels after instrumental mastication. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 1210-1218, 2011.

JANA, A. H.; UPADHYAY, K. G. Process standardization for manufacture of mozzarella cheese from homogenized buffalo milk. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 45, p. 256-256, 1992.

JERONIMO, M. **O cotidiano no ensino do processamento de queijos: recursos instrucionais alternativos**. 2005. 118 f. Dissertação (Mestrado em Educação Agrícola) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

KARAMAN, S. et al. Dynamic oscillatory shear properties of O/W model system meat emulsions: linear viscoelastic analysis for effect of temperature and oil concentration on protein network formation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 107, p. 241-252, 2011.

KILCAST, D. Sensory techniques to study food texture. In: ANDREW. J. R. **Food texture measurement**. Maryland: Aspen, 1999.

KINDSTEDT, P. S.; CARIĆ, M.; MILANOVIĆ, S. Pasta-filata cheeses. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, Amsterdam, v. 2, p. 251-277, 2004.

KINDSTEDT, P. S. Effect of manufacturing factors, composition and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese. **Critical Reviews in**

**Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 2, p. 167-187, 1993.

KINDSTEDT, P. S. et al. Mozzarella cheese impact of coagulant concentration on chemical composition, proteolysis and functional properties. **Journal of**

**Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 12, p. 2591-2597, 1995.

KINDSTEDT, P. S.; GUO, M. R. Chemically-acidified pizza cheese production

and functionality. In: CHEESE SYMPOSIUM, 5., 1997, Dublin. **Proceedings...** Dublin: Teagasc, 1997. p. 24-30.

KNIPSCHILDT, M. E. Production of milk powder suitable for cheese-manufacture and other specific purposes. **Danish Dairy Industry**, Odense, v. 1, p. 47-48, 1976.

KORNMANN, X.; LINDBERG, H.; BERGLUND, L. A. Synthesis of epoxy-clay nanocomposites. Influence of the nature of the curing agent on structure. **Polymer**, Oxford, v. 42, n. 10, p. 4493-4499, 2001.

KUMAGAI, G. et al. Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. **PLoS One**, Boston, v. 4, n. 11, p. 7706, 2009.

KUO, M. I.; GUNASEKARAN, S. Effect of freezing and frozen storage on microstructure of Mozzarella and pizza cheeses. **LWT-Food Science and Technology**, Zürich, v. 42, n. 1, p. 9-16, 2009.

KUO, M. I.; GUNASEKARAN, S. Effect of frozen storage on physical properties of pasta filata and nonpasta filata Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 1108-1117, 2003.

LAU, M. H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. **Food Research International**, Barking, v. 33, n. 8, p. 665-671, 2000.

LEE, M. R.; JOHNSON, M. E.; LUCEY, J. A. Impact of modifications in acid development on the insoluble calcium content and rheological properties of

Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 3798–3809, 2005.

LIMA, K. G.; MAGALHÃES, A. R.; ABREU, A. C. Atividade coagulante de leite e proteolítica de coagulante microbiológico e coalho genético: influência do pH, temperatura e CaCl<sub>2</sub>. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 1, p. 11-14, 1996.

LOBATO-CALLEROS, C. et al. Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat. **Food Research International**, Barking, v. 40, p. 529-537, 2007.

LOPEZ-FANDINMO, R. et al. Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis of caseins. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, p. 221-230, 1997.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 2725–2743, 2003.

MACDOUGALL, D. B. Colour of meat. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. (Ed.). **Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products**. London: Blackie Academic & Professional, 1994. v. 9, cap. 3, p. 79-93.

MARTH, E.; STEELE, J. Starter cultures and their use. In: \_\_\_\_\_. **Applied**

**dairy microbiology**. 3rd ed. New York: M. Dekker, 2001. p. 131-173.

MARTIN, B. et al. Effects of grass-based diets on the content of micronutrients and fatty acids in bovine and caprine dairy products. In: LUSCHER, A. et al. (Ed.). **Land use systems in grassland dominated regions**. Zurich: VDR, 2004. p. 876-886.

MARTINEZ, L. **The everything cheese book: from cheddar to chevre, all you need to select**. Boston: Adams Media Publication, 2007.



MARUDOVA, M.; JILOV, N. Influence of sodium citrate and potassium-sodium tartrate on gelation of low-methoxyl amidated pectin. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 59, p. 177-180, 2003.

MASI, P.; ADDEO, F. The effect of composition on the viscoelastic properties of mozzarella cheese. **Advances in Rheology**, Mexico, v. 4, p. 161, 1984.

MCMAHON, D. J.; FIFE, R. L.; OBERG, C. J. Water partitioning in Mozzarella cheese and its relationship to the cheese meltability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 1361–1369, 1999.

MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Influence of fat, moisture and salt on functional properties of Mozzarella cheese. **Australian Journal of Dairy**

**Technology**, Highett, v. 48, p. 99-104, 1998.

MCMAHON, D. J.; PAULSON, B.; OBERG, C. J. Influence of calcium, pH, and moisture on protein matrix structure and functionality in direct-acidified nonfat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 3754–3763, 2005.

MCSWEENEY, P. L. H. **Cheese problems solved**. Cambridge: Woodhead, 2007. p. 18.

METZGER, L. E. et al. Effect of milk pre-acidification on low fat Mozzarella cheese: chemical and functional properties during storage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 1348–1356, 2001.

MULIAWAN, E. B.; HATZIKIRIAKOS, S. G. Rheology of mozzarella cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 9, p. 1063-1072, 2007.

NEELAKANTAN, S.; MOHANTY, A. K.; KAUSSEHIK, J. K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Current Science**, Columbus, v. 77, n. 1, p. 143148, 1999.

NELSON, W. L. et al. Milking techniques and the composition of guinea pig milk. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 44, p. 585-594, 1951.

NIELSEN, S. S. Plasmin system: microbial proteases in milk: characteristics, roles and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 6628-6634, 2002.

NOBILE, M. A. et al. Use of the generalized Maxwell model for describing the stress relaxation behavior of solid-like foods. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 78, p. 978-983, 2007.

NOZIERE, P. B. et al. Carotenoids for ruminants: from forages to dairy products. **Animal Feed Science Technology**, New York, v. 131, p. 418-450, 2006.

OBERG, C. J. et al. Effects of proteolytic activity of thermolactic cultures on physical properties of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 2, p. 389-397, 1991.

OBERG, C. J.; MCMANUS, W. R.; MCMAHON, P. J. Microstructure of Mozzarella cheese during manufacturing. **Food Structure**, Chicago, v. 12,

p. 251-258, 1993.

OLIVEIRA, S. J. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 1986.

PASTORINO, A. J.; HANSEN C. L.; MCMAHON, D. J. Effect of salt on structure-function relationships of cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 60-69, 2003.

PATEL, G. C.; VYAS, S. H.; UPADHYAY, K. G. Evaluation of mozzarella cheese made from buffalo milk using direct acidification technique. **International Journal of Dairy Science**, New York, v. 39, p. 394-403, 1986.

PAULSON, B. M.; MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Influence of sodium chloride on appearance, functionality, and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 2053-2064, 1998.

- PELEG, M. Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, n. 1, p. 277-281, 1979.
- PELEG, S. A new probabilistic relaxation scheme. **Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on**, Los Alamitos, n. 4, p. 362-369, 1980.
- PEREZ-MUNUERA, I. M. E.; LLUNCH, M. A. Note. Study of some typical Spanish cheeses by scanning electron microscopy. Main microstructural modifications caused by freezing. **Food Science Technology International**, Valencia, n. 5, p. 515-521, 1999.
- PERRY, K. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.
- PHILLIPS, L. G. et al. The influence of fat producing cultures on moisture retention in low-fat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 799-805, 1995.
- RAO, V. N. M. Classification, description and measurement of viscoelastic properties of solid foods. In: RAO, M. A.; STEFFE, J. F. (Ed.). **Viscoelastic properties of solid foods**. London: Elsevier Applied Science, 1992. Cap.1, p. 3-47.
- RAVI SUNDAR, M.; UPADHYAY, K. G. Influence of casein/fat ratio of milk on baking, rheological and sensory characteristics of Buffalo milk Mozzarella cheese. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 28, n. 2, p. 98-100, 1991.
- RENSIS, C. M. V. B.; PETENATE, A. J.; VIOTTO, W. H. Caracterização físico-química, reológica e sensorial de queijos tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 488-494, 2009.
- REZENDE, D. C. **Estratégia de coordenação e qualidade na cadeia dos queijos finos**. 2004. 208 p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Agricultura) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.
- RIBERO, G. G.; RUBIOLO, A. C.; ZORRILLA, S. E. Influence of immersion freezing in NaCl solutions and of frozen storage on the viscoelastic behavior of Mozzarella cheese. **Journal of food science**, v. 72, n. 5, p. E301-C307, 2007.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; FERNÁNDEZ-QUINTERO, A.; CUVELIER, G. Stress relaxation of reconstituted cassava dough. **LWT-Food Science and Technology**, Zürich, v. 42, n. 1, p. 202-206, 2009.

ROOPA, B. S.; BHATTACHARYA, S. Alginate gels: rupture characteristics as a function of the conditions of gel formation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 91, p. 448-454, 2009.

ROWNEY, M. et al. Factors affecting the functionality of Mozzarella cheese.

**Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 54, p. 94-102, 1999.

SAHAI, D. **Buffalo milk: chemistry and processing technology**. Karnal: SI, 1996.

SATO, A. C. K.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CUNHA, R. L. Avaliação das propriedades físicas, químicas e sensorial de preferência de goiabas em calda industrializada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 550-555, out./dez. 2004.

SCOTT, R. **Cheese making practice**. 3rd ed. Maryland: Aspen, 1998.

SOUZA, M. J.; ARDO, Y.; McWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, p. 327-345, 2001.

SOZER, N.; DALGIÇ, A. C.; KAYA, A. Thermal, textural and cooking properties of spaghetti enriched with resistant starch. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 81, n. 2, p. 476-484, 2007.

STANLEY, G. Microbiology of fermented milk products. In: EARLY, R. **The technology of dairy products**. 2nd. London: Blackie Academic, 1998. p. 50-80.

STAN, R. **Aditivi alimentari: produse naturali si de sinteza**. Bucuresti: Printech, 2007. Disponível em: <[http://www.usamvcluj.ro/html/doctorat/data/Pentelescu\\_Ovidiu\\_ro.pdf](http://www.usamvcluj.ro/html/doctorat/data/Pentelescu_Ovidiu_ro.pdf)>. Acesso em: 1 fev. 2009 .

SZCZESNIAK, A. S.; KLEYN, D. H. Consumer awareness of texture and other food. **Food Technology**, México, v. 17, p. 74-77, 1963.

TARANTO, M. V.; YANG, C. S. T. Morphological and textural characterisation of soybean Mozzarella cheese analogs. **Scanning Electron Microscopy**, Chicago, v. 3, p. 483-492, 1981.

TEIXEIRA, L. V.; BASTIA NETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 2 p. 96-100, 2005.

TEJADA, L. et al. Effect of freezing and frozen storage on chemical and microbiological characteristics in sheep milk cheese. **Journal of food science**, Chicago, v. 67, n. 1, p. 126-129, 2002.

THYBO, A. K.; NIELSEN, M.; MARTENS, M. Influence of uniaxial compression rate on rheological parameters and sensory texture prediction of cooked potatoes. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 31, n. 1, p. 25-40, 1999.

TUNICK, M. H. Effects of homogenization and proteolysis on free oil in

Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, p. 2487-2493,

1994.

TUNICK, M. H. et al. Effects of composition and storage on the texture of Mozzarella cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 45, p. 117-125, 1991.

TUNICK, M. H. et al. Effect of high pressure microfluidization on microstructure of mozzarella cheese. **Lebensmittel Wissenschaft**

**&Technologie**, London, v. 33, p. 538-544, 2000.

- TUNICK, M. H. et al. Reorganization of casein submicelles in Mozzarella cheese during storage. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, p. 149-155, 1997.
- USTUNOL, Z.; HICKS, C. L. Effect of calcium addition on yield of cheese manufactured with *Endothia parasitica* protease. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 1, p. 17-25, 1990.
- VALLE, J. L. E. et al. Influência do teor de gordura nas propriedades funcionais do queijo tipo mozzarella. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 669-673, 2004.
- VISSER, S. Enzymatic breakdown of milk proteins during cheese ripening. **Bul. International Dairy Federation**, Brussels, n. 332, p. 20-24, 1998.
- VISSER, S.; VAN DEN BERG, G. The role of proteolytic enzymes in cheese ripening. **International Dairy Federation**, Brussels, v. 371, p. 6-9, 2002.
- WALSTRA, P. **Dairy science and technology**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2006.
- WALSTRA, P. et al. **Dairy technology: principles of milk properties and processes**. New York: M. Decker, 1999.
- WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, p. 1965-1979, 1990.
- WEBB, B. H.; JOHNSON, A. H.; ALFORD, J. A. **Fundamentals of dairy chemistry**. 2nd ed. Westport: AVI, 1974.
- WILLIAMS, A. G.; BANKS, J. M. Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 12, p. 763-774, 1997.
- YOUNG, A. J. Inhibition of carotenoid biosynthesis. In: BAKER, N. R.; PERCIVAL, M. P. (Ed.). **Herbicides: topics in photosynthesis**. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 10, p. 130-171.

YOUSIF, B. H.; McMAHON, D. J.; SHAMMET, K. M. **Milk clotting enzymes from *Solanum dohium* plant.** *International Dairy Journal*, Barking, v. 6, n. 6, p. 637-644, 1996.

YUN, J. J.; BARBANO, D. M.; KINDSTEDT, P. S. Mozzarella cheese: impact of coagulant type on chemical composition and proteolysis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 76, p. 3648–3656, 1993.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**



**ARTIGO 1 Sensory and functional properties of mozzarella cheese as affected by freezing of curd**

To submit to Journal of Dairy Science

### ABSTRACT

The study was conducted with the objective of evaluating the influence of freezing of curd upon the functional, physicochemical and sensory properties of mozzarella cheese. Four treatments were utilized: thermophilic starter culture and non-frozen curd (TnF); thermophilic starter culture and frozen curd (TF); mesophilic starter culture and non-frozen curd (MnF); mesophilic starter culture and frozen curd (MnF). Cheeses manufactured with frozen curd did not differ from the cheeses manufactured with non-frozen curd in relation to the sensory properties of: aroma, taste, color, texture and general acceptance. Browning (non-enzymatic reaction) was not affected by the freezing of curd. Cheeses made with frozen curd presented higher values of oiling off compared to the conventional ones, but within values accepted as being adequate for this type of cheese. Values of extent of maturation of all treatments increased during the period of storage. Treatments TnF and MnF (frozen curd) had higher values of parameter L\* compared to other treatments. The other functional characteristics of mozzarella cheese were not affected by the frozen curd and starter cultures. Freezing of curd did not alter the technical yield. It may be concluded that freezing curd is a feasible procedure in mozzarella cheese manufacturing.

Keywords: Starter cultures. Physicochemical characteristics. Proteolysis. Yield

## 1 INTRODUCTION

Mozzarella cheese is a very complex material and its properties are affected by many factors, among which thermo-mechanical treatment during the pasta filata process is just one of several factors (cheese composition, proteolysis, fat content are other factors).

Frozen storage of mozzarella cheese after its manufacture has significant commercial interest to avoid physicochemical changes in cheese during ripening and to extend its shelf life. However some adverse effects on mozzarella cheese texture, rheology, functional properties, and proteolysis may occur due to freezing (DIEFES; RIZVI; BARTSCH, 1993; KUO; GUNASEKARAN; AK, 2003; OBERG et al., 1992).

Mozzarella is used mainly as a pizza topping because of its two functional properties: meltability and stretchability. When baked on pizza, the browning behavior of the cheese is critical, and excessive browning is a defect (WANG et al., 2003).

Meltability and stretchability of mozzarella cheese when heated are desirable physical properties. These properties are related to microbiology, chemistry and composition of cheese, and these three parameters are influenced by processing conditions (GUINEE, 2011).

Property characteristics of mozzarella, including viscoelasticity, flowability, meltability, stretchability and free oil release, are dependent on production processes due to the impact of production on the microstructure and composition (MA, 2011).

Galactose content in mozzarella cheese is related to the browning of cheese upon baking (JOHNSON; JOHNSON, 1985). The browning appearance of cheese has been evaluated by sensory method (RUDAN et al., 1998), colorimeter (AYDEMIR; DERVISOGLU, 2010) and machine vision (MA et al.,

2013). Free oil is involved in browning of mozzarella cheese by modulating the dehydration of cheese (RICHOUX et al., 2008).

The ability to retain free-oil upon heating is a functional property that makes mozzarella cheese suitable for use as a pizza topping ingredient. This property is dictated by the proteolysis, fat content, mineral distribution and protein-protein or protein-water interactions (YUN; BARBANO; KINDSTEDT, 1993). The amount of fat in mozzarella cheese is related to free oil upon heating (RUDAN et al., 1998).

Sensorial properties of cheeses are perceived by the human senses during the consumption, smelling, observing. Almost all human sensory modalities such as vision, touch, olfaction, mouth feel interact with each other to determine sensory characteristics and stimuli are induced by chemical, rheological and structural components of cheeses (DELAHUNTY; DRAKE, 2004).

Having all this in mind the objects of this study were to evaluate the effect of different starter cultures and freezing of the curd upon chemical composition, functional and sensory properties of mozzarella cheeses.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Localization of the experiment

Raw milk was produced in the Dairy Farm and mozzarella cheese was manufacture in the Dairy Plant of Federal Institute of the South of Minas – Machado. The research work was conducted in the Food Science Department, Federal University of Lavras. The research was carried out to evaluate the effect of different starter cultures (mesophilic and thermophilic) and the freezing of curd on different characteristics of mozzarella cheese.

### 2.2 Treatments

There were four treatments:

Treatment 1 TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd);

Treatment 2 TF (thermophilic starter culture and frozen curd);

Treatment 3 MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd);

Treatment 4 MF (mesophilic starter culture and frozen curd).

### 2.3 Cheese manufacturing process

Pasteurized milk with 3.5% fat and temperature adjusted to 34°C was divided into four portions and worked in separate vats. Two vats were inoculated with a starter culture containing *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (TnF and TF) and the other two vats (MnF and MF) with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (Christian Hansen's Laboratory). After a ripening period of 30 minutes, rennet (Ha-La® from Christian Hansen's Laboratory) was added and the milk was set

for approximately 40 min. After this period, the curd was cut and allowed to heal in the whey for 10 minutes. Then with periodic gentle agitation, curd was gradually heated from 34°C to 42°C over a 30 minutes period of. After draining, curds were cheddared until pH reached 5,2. After that, curds obtained were divided in different flows of processing, one part (TF and MF) was frozen for 7 days at -18°C and the other (TnF and MnF) was readily processed. The stretching of curd was done by hand in water at a temperature of 75°C until the uniform and elastic strands were achieved. After molding, the pieces were immersed into brine (8°C -10°C, 20% salt), vacuum packed and stored at 4°C for 7 days for stabilization.

The manufacturing process of cheeses is described in Figure 1

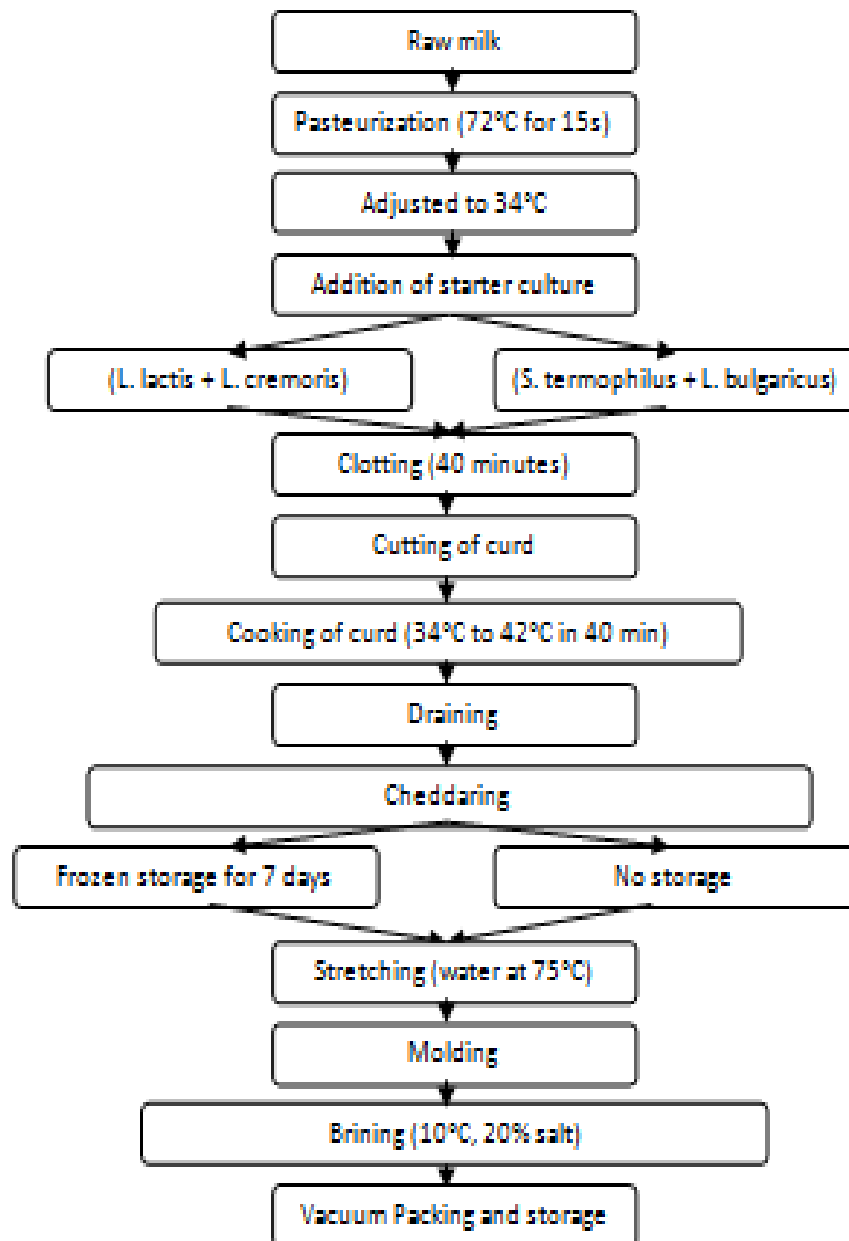


Figure 1 Flow chart of mozzarella cheese manufacturing

## 2.4 Measurements and analysis

Measurement and analysis are conducted at days 0 (first day after stabilization), 14, 28 and 42, in triplicate.

### 2.4.1 Yield of mozzarella cheese

Cheese yield, expressed in liters of milk per kilogram of cheese (L/kg) was obtained by dividing the total volume of milk (L) by the total weight of the cheese (kg) after 24 hours from brine. The yield was adjusted to the moisture content of the cheese, using the formula described by Furtado (2005). Equation 1 was used to calculate yield in grams of total solids per liter of cheese milk.

$$\text{Yield (g)} = P \cdot \text{TS} \cdot 100/V \quad (1)$$

P - weight of cheese

TS - total solids of cheese

V - volume of milk used

### 2.4.2 pH

The pH of both cheese and milk samples were measured with a digital pHmeter (Hanna Instruments, model 8341).



### **2.4.3 Acidity**

Acidity of milk (10 mL) and cheese samples (5g) was determined by titration by using Dornic solution and 2-3 drops of indicator phenolphthalein (BRASIL, 2006).

### **2.4.4 Total solid content**

Total solids were determined by using oven drying method. The difference in weight before and after drying for 4 hours at 105°C gives the result of solid content.

### **2.4.5 Protein**

The total Nitrogen content of cheese was determined by using the Kjeldahl method. Samples were digested by using digestion tablets (model TE 008/50) and distilled by utilizing distiller (model TE-036). A factor of 6.38 was used to estimate total protein content.

### **2.4.6 Soluble Nitrogen in pH 4.6**

Soluble Nitrogen (SN) was determined after isoelectric precipitation of casein with hydrochloric acid solution 1.41 mol.L<sup>-1</sup> at pH 4.6, in a sample of cheese previously solubilized in 0.5 mol.L<sup>-1</sup> sodium citrate. This mixture was filtered through Whatman filter paper number 42, collecting a clear solution containing the hydrolyzed protein fraction of the cheese soluble at pH 4.6. The quantification of these soluble substances was by the Kjeldahl method, starting from 5 mL.

#### **2.4.7 TCA soluble Nitrogen**

Non-protein Nitrogen was analyzed with the Kjeldahl method after precipitation with 12% Trichloroacetic acid solution and multiplying by a factor of 6.38.

#### **2.4.8 Extent of maturation**

The extent of maturation was calculated indirectly through the ratio between the percentage of soluble Nitrogen at pH 4.6 and total Nitrogen, multiplying the result by 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). This index is important to assess the behavior of rennet in cheese ripening.

#### **2.4.9 Depth of maturation**

The depth of maturation was quantified indirectly by the ratio between the percentage of soluble Nitrogen in 12% TCA and total Nitrogen, multiplying the result by 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

#### **2.4.10 Fat**

The butyrometric method of Gerber was utilized to determine fat content in milk and cheese (BRASIL, 2006).

### **2.5 Color**

The color of the cheese samples was measured in 5 replicates of each sample at 20°C and making use of a Minolta CR-300 colorimeter (Minolta

Corp., Osaka, Japan). The CIELAB (CIE, 1976) standard measurement system, which measures color utilizing 3 coordinates,  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  was utilized. The instrument was calibrated with a blank titre (standard tristimulus values:  $Y = 92.4$ ;  $x = 0.3161$ ;  $y = 0.3325$ ) supplied by Minolta, prior to measurement and at regular intervals.

## 2.6 Browning

Shredded mozzarella (100g) was spread evenly on a 5cm diameter Teflon plate and was baked in a convection oven at 104°C for 1 hour. The color of the baked cheese samples was measured in 5 replicates of each sample at 20°C in a Minolta CR-300 colorimeter (Minolta Corp., Osaka, Japan).

## 2.7 Meltability

A test, modified from the Schreiber test, described by Kindstedt, Duthie and Rippe (1988) was employed. A cheese cylinder of 30mm of diameter and 7mm in thickness was placed at the very center of a Petri dish marked with four lines disposed at 45° to one another, all passing and encountering one another at the center of the dish, where the cheese is. The dish containing the cheese section was heated in an oven at 107°C for 7 minutes. The four diameters were measured and the mean was calculated.

The percentage of melting cheese slices was calculated from the average diameters, according to the equation:

$$\% \text{ Melting} = (A_f - A_i) / A_i \cdot 100$$

where:

Af: area after the melting of the slice (calculated from the average diameter).

Ai: area of the slice before the melting (calculated from the average diameter).

## **2.8 Free oil release**

Free oil content of mozzarella cheese samples was determined according to the method of Kindstedt e Rippe (1990). Three grams of ground cheese sample were weighed into a babcock bottle and then immersed in boiling water for 4 minutes to melt the cheese. Acidified water (10mL, pH 2,2 at 60°C) and distilled water and methanol in a 1:1 ratio (10mL) were immediately added and the bottle was centrifuged (4minutes, 1,200 rpm). The content was transferred to a Gerber bottle, heated in boiling water for 1 minute, centrifuged and the free oil content was measured.

## **2.9 Stretchability**

The analyzes were performed according to the method of Apostolopoulos (1994), which consists of an empirical instrument test conditions that resembles the behavior of the cheese on the pizza. The method consists of using a circular steel plate (165 mm in diameter), provided with a central mobile plate (9 mm in diameter). Twenty grams of grated cheese were spread on the steel plate, covering the two plates (four replications), placed both plates in an oven at a temperature of 240°C for two minutes. After removing the sample from the oven, the smaller plate (covered with melted cheese) was attached to the machine-controlled engine, with the central plate being lifted out vertically, stretching the melted cheese at a constant speed of 1,500mm per

minute, being the stretchability of cheese considered as the distance that the central circumference reaches when all the strings of cheese break completely.

### **2.10 Sensory analysis**

One hundred non trained panelists were used for analysis. Approximately 25g cheese samples, with 25 days of storage, were placed into plastic cups labeled with randomly selected 3 digit numbers, covered individually with a lid and initially stored at refrigerated temperature. The samples were allowed to equilibrate at room temperature prior to serving to the panelists. The order of presentation was randomized across the subjects to ensure the order of the runs did not interfere in the results. The panelists were asked to score the cheese samples by using a 9 point hedonic scale where 1 represents extremely disliked and 9 represents extremely liked, for odor, color, taste, texture and global acceptance.

### **2.11 Experimental design and Statistical analysis**

The experimental design utilized was a factorial 2 x 2 x 4, completely randomized, that is, 2 technological procedures (conventional and frozen curd), 2 starter cultures (thermophilic and mesophilic), during the storage period (0, 14, 28, 42 days), with 4 repetitions.

One way ANOVA was performed to investigate the significant difference among cheese samples, using SISVAR 4.0 (FERREIRA et al., 2000). The Tukey test was employed to compare the means among treatments.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Milk composition

The results of physicochemical composition of the milk used in the mozzarella cheese manufacturing are shown in Table 1. In general, the results meet the standards of identity and quality of fluid milk for industrial use. Values of somatic cell count (SCC) exceeded the maximum stipulated by the Brazilian legislation. Elevated SCC indicates mastitis, which can lead to a reduction of synthesized components, especially casein, the main compound in cheese manufacturing. However, the values of the referred component are similar to those found in other studies (QUINTANA; CARNEIRO, 2007; FACCIA et al., 2012; VALLE et al., 2004) using milk with low SCC. Protein and fat are the primary factors influencing the cheese composition and characteristics (GUINEE; AUTY; FENELON, 2000). Lactose is also known as having its concentration decreased in high SCC, which occurred in this study, since a normal concentration of lactose is around 4.85. The psychrotrophic count in milk used in this study was not higher than 3.18 log CFU.g<sup>-1</sup>. Under these conditions, production of proteolytic and lipolytic enzymes does not occur (PARK et al., 2001).

Table 1 Results of analysis of milk to process mozzarella cheese

<b>Item</b>	<b>Raw milk</b>
<b>Fat (%)</b>	3.5
<b>Protein (%)</b>	3.2
<b>Lactose (%)</b>	4.4
<b>pH</b>	6.5
<b>Titration Acidity (%)</b>	0,17
<b>Total solids (%)</b>	12.1
<b>SCC (10<sup>3</sup> cells.ml<sup>-1</sup>)</b>	852
<b>TBC (10<sup>5</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>)</b>	2.21
<b>Psychrotrophic (10<sup>3</sup>CFU.ml<sup>-1</sup>)</b>	1.23

Milk composition is an important factor in cheese yield, and the percentage of dry matter of milk concentrates mainly proteins and fats. Variations in breed, stage of lactation and health status of the animal influence the milk composition, reflecting the composition of the cheese, which is extremely dependent on and influenced by the physicochemical characteristics of the cheese, endangering both the protein and fat, which are essential for yield.

### 3.2 Cheese composition

The results for yield, composition, pH and acidity of the cheeses are shown in Table 2.

Table 2 Commercial and technical yields, composition, pH and acidity of mozzarella cheeses made with frozen curd and different starter cultures

Item	TnF	TF	MnF	MF
<b>Yield(Kg/100Kg)</b>	10.37 <sup>b</sup>	10.19 <sup>b</sup>	9.87 <sup>ab</sup>	9.70 <sup>a</sup>
<b>Yield (g TS/L)</b>	56.95 <sup>b</sup>	56.60 <sup>b</sup>	52.50 <sup>a</sup>	53.50 <sup>a</sup>
<b>Total Solids (%)</b>	54.92 <sup>a</sup>	55.55 <sup>a</sup>	53.20 <sup>a</sup>	55.18 <sup>a</sup>
<b>Moisture (%)</b>	45.08 <sup>a</sup>	44.45 <sup>a</sup>	46.80 <sup>b</sup>	44.82 <sup>a</sup>
<b>Protein (%)</b>	23.34 <sup>a</sup>	22.86 <sup>a</sup>	22.15 <sup>a</sup>	23.58 <sup>a</sup>
<b>Fat (%)</b>	28.66 <sup>ab</sup>	29.66 <sup>b</sup>	27.66 <sup>a</sup>	28.00 <sup>ab</sup>
<b>FDM (%)</b>	52.18 <sup>a</sup>	53.39 <sup>a</sup>	52.00 <sup>a</sup>	50.74 <sup>b</sup>
<b>Ash (%)</b>	3.25 <sup>a</sup>	3.19 <sup>a</sup>	3.32 <sup>a</sup>	3.19 <sup>a</sup>
<b>pH</b>	5.36 <sup>a</sup>	5.28 <sup>a</sup>	5.36 <sup>a</sup>	5.28 <sup>a</sup>

Means followed by same letter do not differ statistically from one another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

Considering both commercial and technical yields, it may be observed that freezing of curd did not affect these measurements for both types of starter cultures, indicating that such a technology is feasible as far as yield is concerned. Related to cultures, the thermophiles had higher yields compared to the mesophiles, mainly when the freezing technology is take into consideration.

As cheeses were packed in impermeable film, the moisture content did not change along the storage period (data not shown).

The samples of the treatment MnF had the highest moisture content ( $p < 0.05$ ), supposedly due to the decreased amount of acid produced by mesophilic bacteria and as the mass was not frozen; there was no loss of water, that may occur during thawing.

With regard to the other components of the cheese, frozen samples showed no significant differences among treatments ( $P > 0.05$ ), except fat content, that showed inconsistent results, although all cheeses meet the standard patterns of identity and quality for mozzarella cheese. Similar results were reported by Hekken, Tunick e Park (2005), Verdini, Zorrilla e Rubiolo (2002) and Verdini, Zorrilla e Rubiolo (2005); these authors working with freezing of cheeses prior to ripening instead of freezing of curd.

Regarding the acidity of mozzarella cheese, the samples showed a significant difference among treatments ( $p < 0.05$ ), as shown in Table 02.

### **3.3 Proteolysis**

The indices of proteolysis, extension (soluble Nitrogen / total Nitrogen - NS/TS) and depth of maturation (non-proteic Nitrogen / total Nitrogen - NPN/NT) are used as indicators for the level of ripening of cheeses. These indexes are of great importance in the final composition, mainly the protein partition, and sensory characteristics of the product. The referred indexes give appropriate understanding regarding the proteolytic activities of rennet residues and starter bacteria during cheese ripening.



### 3.3.1 Indexes of extension and depth of ripening

The results of the indices of Extension and Depth of ripening of the cheeses are shown in Tables 3 and 4.

In general, both indices presented, after 42 days of ripening, higher values, compared to day 0 ( $p < 0.05$ ), with the exception of the treatment TF for the extension index. The treatment MnF presented, after 42 days of ripening, the highest values, indicating that the storage temperature ( $7^{\circ}\text{C}$ ) affected less negatively the activity of those mesophilic bacteria. It also may be observed that, after 42 days of ripening, the treatments with frozen curd had lower indexes, which supposedly occurred due to some injuries caused by the processes of freezing and thawing of the curd, upon the bacterial cells. It must be taken into consideration that the temperature, reached by the working mass in the stretching process, was not high enough to destroy the totality of the bacteria. Despite differences in the results, all treatments presented values within those considered by some research works (GRAIVER; ZARITZKY; CALIFANO, 2004; OSAILI, 2010; SHEENEN; GUINEE, 2004), as being regarded as adequate for mozzarella cheeses.

Table 3 Extension of ripening of Mozzarella cheese made with frozen curd and different starter cultures along 42 days of storage period at  $7^{\circ}\text{C}$

Treatment	Storage period (days)			
	0	14	28	42
<b>TnF</b>	3.75 aA	4.20 aB	9.45 bC	10.95 bD
<b>TF</b>	7.65 cA	7.80 bA	7.95 aA	8.10 aA
<b>MnF</b>	6.15 bcA	7.35 bA	11.25 bB	12.15 cB
<b>MF</b>	7.80 cA	9.30 cB	9.60 bB	10.35 bB

Means followed by the same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically from one another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

Table 4 Depth of maturation of Mozzarella cheese during ripening

Treatment	Storage period (days)			
	0	14	28	42
<b>TnF</b>	3,20 aA	4.64 aA	9.57 bB	9.80 bB
<b>TF</b>	4,80 bA	6.62 bAB	7.33 aB	7.72 aB
<b>MnF</b>	4,27 bA	5,08 aA	8.98 bB	9.89 bB
<b>MF</b>	5,90 cA	8.08cB	8.62 bB	9.47 bB

Means followed by same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically from one another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

Rennet, yeast proteases and peptidases of lactic and/or secondary microflora and natural enzymes of milk contribute to this process. Alvarenga (2008) studied the freezing of sheep cheese, and in relation to chemical properties, except for indicators of proteolysis, no significant alterations were recorded. Proteolysis is the most complex event occurred during curing, and possibly the most important event in the development of texture (SOUSA; ARDÖ; MCSWEENEY, 2001).

Increasing the depth of proteolysis with freezing indicates that this process could not prevent the mechanisms of proteolysis. These continue to occur slowly; similar to what was reported in the majority of the studies that determine the impact of freezing proteolysis in cheese (GRAIVER; ZARITZKY; CALIFANO, 2004; HEKKEN; TUNICK; PARK, 2005; TEJADA et al., 2002; VERDINI; ZORRILLA; RUBIOLO, 2002; VERDINI et al., 2007). This increase in the values of the fractions containing Nitrogen can be explained from the damage caused by the increase in the size of ice crystals during freezing, first at the protein network on the other hand in bacteria by promoting the release of enzymes into the medium (GRAIVER; ZARITZKY; CALIFANO, 2004), with these being more available for enzymatic activity. The results suggest that bacterial peptidases and bacterial aminopeptidases remained active, albeit with a

lower activity during the storage time in the frozen state, causing a gradual increase oligopeptides, amino acids, amines and ammonia (TEJADA et al., 2002). This increase is also related to the fact that, during freezing, no microbial growth occurred and thus these substances are not used as metabolites (VERDINI et al., 2007). As for the remaining fractions containing Nitrogen (NPN% and in%) that represent the degree of depth of proteolysis, that is, to what extent, proteins and peptides are to be degraded into smaller peptides, it was observed that freezing was not able to prevent proteolysis of the mechanisms leading to their formation. They continue to take place slowly; similar to what was reported in the majority of the studies that determine the impact of freezing in proteolytic processes.

### 3.4 Color of the cheeses

In Table 5 are shown the results of the values of color (L\*, a\*, b\*) of samples during storage period.

Table 5 Hunter color (L\*, a\* and b\*) values of mozzarella cheese during ripening

Treatment		Storage period (days)			
		0	14	28	42
<b>TnF</b>	L*	81.17 <sup>bA</sup>	79.46 <sup>cA</sup>	79.88 <sup>bA</sup>	80.78 <sup>bA</sup>
	a*	-3.65 <sup>aAB</sup>	-3.56 <sup>aAB</sup>	-3.37 <sup>bB</sup>	-3.71 <sup>aA</sup>
	b*	17.05 <sup>aA</sup>	20.06 <sup>aB</sup>	19.27 <sup>aB</sup>	19.10 <sup>aB</sup>
<b>TF</b>	L*	74.80 <sup>aA</sup>	74.76 <sup>aA</sup>	76.08 <sup>aA</sup>	76.39 <sup>aA</sup>
	a*	-3.69 <sup>aA</sup>	-3.43 <sup>aA</sup>	-3.65 <sup>aA</sup>	-3.50 <sup>aA</sup>
	b*	20.04 <sup>bA</sup>	19.96 <sup>aA</sup>	20.28 <sup>bA</sup>	19.93 <sup>aA</sup>
<b>MnF</b>	L*	83.50 <sup>cB</sup>	80.51 <sup>cA</sup>	81.60 <sup>bAB</sup>	81.69 <sup>bAB</sup>
	a*	-3.38 <sup>bA</sup>	-3.36 <sup>aA</sup>	-3.15 <sup>bA</sup>	-3.04 <sup>bA</sup>
	b*	18.69 <sup>bA</sup>	19.76 <sup>aA</sup>	18.70 <sup>aA</sup>	18.63 <sup>aA</sup>

“continues”

Table 5 “conclusion”

Treatment		Storage period (days)			
		0	14	28	42
MF	L*	76.02 <sup>aA</sup>	76.19 <sup>bA</sup>	77.50 <sup>aA</sup>	77.07 <sup>aA</sup>
	a*	-3.61 <sup>abA</sup>	-3.67 <sup>aA</sup>	-3.68 <sup>aA</sup>	-3.61 <sup>aA</sup>
	b*	19.78 <sup>bA</sup>	19.83 <sup>aA</sup>	20.36 <sup>bA</sup>	20.45 <sup>aA</sup>

Means followed by same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically from one another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

Treatments TnF and MnF had higher values of the parameter L\* compared to the others treatments ( $p < 0.05$ ), indicating that freezing may lead to a slightly darkened color on cheeses.

The a\* values represent the intensity of the red color. The storage period did not significantly affect ( $p > 0.05$ ) the a\* values of the cheeses. These results indicate that making mozzarella cheese with frozen curd is a feasible procedure as far as the red color is concerned, staying all treatments within values technically acceptable. Treatments TF, MnF and MF presented no difference ( $p > 0.05$ ) of b\* values during the storage period. There was no significant difference among treatments on days 14 and 42 ( $p > 0.05$ ).

In general, all the results of the parameters of color (L\*, a\*, b\*) indicate that, freezing of curd does not negatively affect the coloration of mozzarella cheeses. Curd freezing technology seems to be more adequate, compared to freezing of cheese, once studies conducted by Alvarenga (2008) on frozen cheese showed that damages caused by freezing on the physical properties interfered in the color of the cheese.

The L\* values of the samples of mozzarella cheese did not significantly differ over the storage period ( $p < 0.05$ ), except for the MnF treatment.

### 3.4.2 Browning of the cheeses

The results of color of baked cheeses are shown in table 6.

L\* value is well recognized as being the best index to define the dark color on baked mozzarella cheese (FOX, 2000). The L\* values presented no significant differences ( $P>0.05$ ) among treatments in every ripening period. The results for L\* values confirm that baked Mozzarella cheese has a relatively darker color (data no shown) compared to the standard white color of non baked cheeses ( $p<0.05$ ). Considering the L\* values, the findings demonstrate that freezing of curd does not affect the intensity of browning (Maillard reaction) of mozzarella cheese.

Table 6 Hunter color (L\*, a\* and b\*) values of mozzarella cheese, over storage period and baked at 104°C for 1 hour

Treatment		Storage period (days)			
		0	14	28	42
<b>TnF</b>	L*	66.76 <sup>aAB</sup>	63.71 <sup>aA</sup>	67.40 <sup>aAB</sup>	70.73 <sup>aB</sup>
	a*	-4.85 <sup>aA</sup>	-3.64 <sup>aB</sup>	-5.34 <sup>aA</sup>	-4.56 <sup>aAB</sup>
	b*	24.73 <sup>bA</sup>	28.73 <sup>bA</sup>	24.09 <sup>bA</sup>	25.61 <sup>bA</sup>
<b>TF</b>	L*	63.78 <sup>aA</sup>	64.22 <sup>aAB</sup>	67.43 <sup>aB</sup>	68.12 <sup>aC</sup>
	a*	-3.55 <sup>aA</sup>	-3.51 <sup>aA</sup>	-3.99 <sup>bA</sup>	-4.94 <sup>aA</sup>
	b*	36.23 <sup>cB</sup>	26.54 <sup>bA</sup>	25.25 <sup>bA</sup>	26.96 <sup>bA</sup>
<b>MnF</b>	L*	65.08 <sup>aA</sup>	69.50 <sup>aAB</sup>	69.48 <sup>aAB</sup>	71.33 <sup>aB</sup>
	a*	-5.06 <sup>aA</sup>	-5.37 <sup>aA</sup>	-5.52 <sup>aA</sup>	-4.84 <sup>aA</sup>
	b*	17.06 <sup>aA</sup>	18.81 <sup>aA</sup>	19.62 <sup>aA</sup>	19.99 <sup>aA</sup>
<b>MF</b>	L*	67.71 <sup>aA</sup>	69.63 <sup>aA</sup>	70.45 <sup>aA</sup>	70.42 <sup>aA</sup>
	a*	-4.45 <sup>aA</sup>	-5.27 <sup>aA</sup>	-5.22 <sup>aA</sup>	-5.05 <sup>aA</sup>
	b*	20.34 <sup>aA</sup>	18.98 <sup>aA</sup>	20.74 <sup>aA</sup>	21.25 <sup>aB</sup>

Means followed by same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically from one another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

Similarly, a\* values (red to green) of baked mozzarella cheeses do not present significant difference among the treatments during storage time

( $p > 0.05$ ), and had lower values compared to non baked cheeses ( $p < 0.05$ ), indicating a more intense red color on baked cheeses. The results clearly show that the process of freezing of the curd does not affect the  $a^*$  values of baked mozzarella cheese.

During storage period at  $7^\circ\text{C}$ , the  $b^*$  values of the treatments TnF and TF (thermophilic cultures) were significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared to the treatments MnF and MF (mesophilic cultures), indicating that thermophilic cultures produced cheeses with more intense yellow color. That behavior has been demonstrated by Ma (2013), as being due to the more intense Maillard reaction in these cheeses, in which occurs higher concentrations of residual galactose occurs compared to those made with mesophilic bacteria. As a consequence, the yellow color starts to build up, gradually intensifying, and eventually in a advanced stage, the yellow color turns into a brown color tone, this being better evaluated by the  $L^*$  value.

The results also indicate that the cheeses, with either thermophilic or mesophilic cultures, made with frozen curd presented no significant differences ( $p < 0.05$ ) of  $b^*$  values. Hence, the freezing of curd is a procedure that does not affect the yellow color tone of baked mozzarella cheese.

When browning defect of mozzarella cheese is taken into consideration it may positively be stated that freezing of curd is a feasible procedure, bringing no negative impact to the color of pizza cheese.

### **3.5 Sensory evaluation**

The results of the sensory evaluation, considering aroma, color, taste, texture and overall aspect are shown in Table 7.

There were no significant differences among the treatments ( $p > 0.05$ ), indicating that the methodology of frozen curd for later processing is a practical

and adequate technology as far as sensory evaluation is concerned. Such a process may be utilized, to overcome problems caused by seasonal milk production without negatively affecting the sensory quality of the product, and maintaining its commercial potentiality.

Table 7 Sensory evaluation of mozzarella cheese during storage period

Characteristic	TnF	TF	MnF	MF
<b>Aroma</b>	7,19 <sup>a</sup>	7,29 <sup>a</sup>	7,23 <sup>a</sup>	7,50 <sup>a</sup>
<b>Color</b>	7,56 <sup>a</sup>	7,71 <sup>a</sup>	7,52 <sup>a</sup>	7,58 <sup>a</sup>
<b>Taste</b>	6,97 <sup>a</sup>	7,05 <sup>a</sup>	7,16 <sup>a</sup>	7,32 <sup>a</sup>
<b>Texture</b>	7,22 <sup>a</sup>	7,23 <sup>a</sup>	7,25 <sup>a</sup>	7,00 <sup>a</sup>
<b>Overall aspect</b>	7,22 <sup>a</sup>	7,46 <sup>a</sup>	7,38 <sup>a</sup>	7,35 <sup>a</sup>

Means followed by same letter, do not differ statistically by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

### 3.6 Meltability

The results for the meltability of mozzarella cheeses are presented in Table 8.

Table 8 Values of meltability (cm of diameter) of mozzarella cheese during storage time

Treatment	Storage period (days)			
	0	14	28	42
<b>TnF</b>	4,69 <sup>aA</sup>	6,24 <sup>aB</sup>	6,03 <sup>aB</sup>	6,43 <sup>bB</sup>
<b>TF</b>	6,59 <sup>bB</sup>	6,44 <sup>aAB</sup>	6,10 <sup>aAB</sup>	5,86 <sup>cA</sup>
<b>MnF</b>	6,33 <sup>bA</sup>	6,56 <sup>aA</sup>	7,35 <sup>bA</sup>	6,87 <sup>cA</sup>
<b>MF</b>	7,81 <sup>cA</sup>	6,58 <sup>aA</sup>	7,11 <sup>bA</sup>	6,51 <sup>bcA</sup>

Means followed by same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically from one another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

Despite the inconsistency during storage period, the results are in agreement with previous studies (CAIS-SOKOLIŃSKA; PIKUL, 2009; CHAVES; VIOTTO; GROSSO, 1999; DAVE et al., 2003; REID; YAN, 2004) of mozzarella cheese manufactured by conventional methods. Cheeses submitted to treatment MnF do not present more meltability during all storage period compared to the other treatments, despite they had more moisture (Table 2). This may occur because of their lower content of fat compared to other treatments (Table 2).

Cheeses produced using treatment TF had higher content of fat in their composition, but this aspect did not influence the results of meltability. Koca and Metin (2004) showed that the meltability of cheeses decreased significantly with a decrease in their fat contents.

The increase of values of meltability capacity of cheeses produced with treatment TnF during storage period may occur due to the highest levels of proteolysis compared with other treatments (Table 4).

After stabilization, all treatments present no significant differences during storage period ( $p < 0.05$ ). These findings suggest that during the stabilization, water was transferred from the fat-serum channels into the protein matrix as the proteins become more hydrated, and some interactions between proteins are replaced with interactions of proteins with the bulk phase water molecules. This increased hydration of proteins has been attributed to salting-in of proteins in the cheese (PAULSON; MCMAHON; OBERG, 1998). As regards to the functionality of the cheese, a more hydrated protein structure would allow the proteins to slip past one another more easily and, when combined with the lubricating properties of the fat (TUNICK, 1995).

Therefore, it is reasonable to state that the good meltability of mozzarella cheeses increased by the rate of proteolytic hydrolysis does not



slowed down at reduced temperatures, in combination, ice formation did not limit water migration for protein hydration.

Treatments MnF and MF (mesophilic starter) had no significant differences after 14 days of storage time ( $p>0.05$ ). The MF treatment presented on the first day of ripening higher meltability values compared to MnF treatment ( $p<0.05$ ), demonstrating that for mesophilic starters the possibility of freezing of curd does not deteriorate the meltability of mozzarella cheese.

### 3.7 Stretchability

The results for stretchability of the cheeses are presented in Table 9.

Table 9 Stretchability (cm) of mozzarella cheese during storage period

Treatment	Storage period (days)			
	0	14	28	42
<b>TnF</b>	38.70 <sup>aA</sup>	33.50 <sup>aA</sup>	47.00 <sup>aB</sup>	57.00 <sup>bC</sup>
<b>TF</b>	54.66 <sup>bB</sup>	57.00 <sup>aB</sup>	44.66 <sup>aA</sup>	46.33 <sup>aA</sup>
<b>MnF</b>	37.16 <sup>aA</sup>	54.93 <sup>aB</sup>	52.00 <sup>aAB</sup>	56.33 <sup>bB</sup>
<b>MF</b>	50.13 <sup>bB</sup>	50.33 <sup>aB</sup>	41.66 <sup>aA</sup>	37.33 <sup>aA</sup>

Means followed by same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically from one another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means to four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

It may be observed that, during storage time, cheeses processed with frozen curd had decreasing stretchability values during storage period at 7°C ( $p<0.05$ ), whereas the conventional mozzarella cheeses presented increasing values of the same parameter at the same period ( $p<0.05$ ). The different trends of stretch with age may be attributed to differences in the rate of degradation of the paracasein networks of cheese, as reflected by the differences in the rate of formation of soluble proteins.

On day 42 treatments TnF and MnF had significantly higher values of stretchability than other treatments ( $p < 0.05$ ). Some studies (GUINEE; AUTY; FENELON, 2000; KINDSTEDT, 1995) have shown that the increase in proteolysis in mozzarella during the first 2 weeks of ripening is paralleled by a marked improvement in functionality, i.e. reduction in apparent viscosity and increases in flowability and decreased stretchability

The elastic response in cheese is due mainly to the protein-protein bonds. The viscous dissipation in the cheese may be due to the flow of the material itself constituting the matrix, i.e. the protein, but also to the liquid flow through the matrix, or due to the movement of other structural components between them, causing friction (PARK; OH, 2007).

Despite the differences, all treatments presented stretchability far higher than the minimum empirically recognized as being technically ideal for mozzarella cheese, which is longer than 15cm.

### 3.8 Oiling Off

The results of “oiling off” from samples of mozzarella cheese are presented in Table 10.

Table 10 Oiling off (%) of mozzarella cheese during storage period

Treatment	Storage period (days)			
	0	14	28	42
<b>TnF</b>	2.90 <sup>bA</sup>	3.13 <sup>aAB</sup>	3.90 <sup>bB</sup>	3.03 <sup>aA</sup>
<b>TF</b>	3.76 <sup>cA</sup>	4.25 <sup>bA</sup>	4.73 <sup>cB</sup>	4.83 <sup>cB</sup>
<b>MnF</b>	2.43 <sup>aA</sup>	3.25 <sup>aBC</sup>	2.96 <sup>aB</sup>	3.36 <sup>abC</sup>
<b>MF</b>	3.73 <sup>cA</sup>	4.15 <sup>bB</sup>	4.33 <sup>cB</sup>	4.10 <sup>bB</sup>

Means followed by same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically one to another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

During 42 days of storage at 7°C, cheeses processed with treatment TF and MF present higher values of free oil content comparing with others treatment ( $p < 0.05$ ). That compartment may occur because freezing affect the separation of free oil, probably due to some protein denaturation or the growth of ice crystals. Also the rupture of the lipoprotein membrane of the fat globules, which could favor the coalescence of fat and the formation of larger fat drops, could lead to a greater separation of free oil.

In melting, mozzarella cheese usually forms oiling off to a variable extent, but in excessive amounts it is considered undesirable. This phenomenon occurs mainly when casein matrix suffers denaturation during heating or damage in fat globules, allowing fat to escape from the matrix and concentrate on the surface (FOX, 2000).

All treatments presented increasing values of oiling off during storage period at 7°C ( $p < 0.05$ ). These results are similar to those encountered by Rowney et al. (2004) and Cortez et al. (2008).

Despite the significant differences among treatments on oiling off, it is possible to state that the results present values that are not detrimental to the quality. Moreover, the results indicate that the curd freezing procedure does not cause loss of quality of mozzarella cheese in respect to functional property of oiling off.

#### **4 CONCLUSION**

The results obtained allow us to conclude that cheese manufacture with frozen curd, as compared to conventional manufacturing process, did not differ in sensory characteristics, technical yield and browning. Cheese made with frozen curd, presented higher oiling off property and less bright color.

## REFERENCES

- ALVARENGA, N. B. M. G. **Introdução da tecnologia de congelação na produção de queijo de ovelha**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Agro-Industrial) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.
- APOSTOLOPOULOS, C. Simple empirical and fundamental methods to determine objectively the stretchability of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 61, p. 405-405, 1994.
- AYDEMIR, O.; DERVISOGLU, M. The effect of heat treatment and starter culture on colour intensity and sensory properties of Kulek cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 63, n. 4, p. 569-574, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 68**, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Brasília, 2006.
- CAIS-SOKOLIŃSKA, D.; PIKUL, J. Cheese meltability as assessed by the tube test and schreiber test depending on fat contents and storage time, based on curd-ripened fried cheese. **Czech Journal of Food Sciences**, Slezská, v. 27, n. 5, p. 301-308, 2009.
- CHAVES, W.; VIOTTO, H.; GROSSO, C. R. F. Proteolysis and functional properties of Mozzarella cheese as affected by refrigerated storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, p. 202–205, 1999.
- CORTEZ, M. A. S. et al. Effect of pH on characteristics of low-moisture Mozzarella Cheese during refrigerated storage. **Journal of Food science**, Chicago, v. 73, n. 9, p. 443-448, 2008. Suppl.
- DAVE, R. I. et al. Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of Mozzarella cheeses made using direct acidification. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 114–126, 2003.
- DELAHUNTY, C. M.; DRAKE, M. A. Sensory character of cheese and its evaluation. In: FOX, P. F. et al. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology general aspects**. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. p. 455–487.
-

DIEFES, H. A.; RIZVI, S. S. H.; BARTSCH, J. A. **Rheological behavior of frozen and thawed low-moisture, part-skim Mozzarella cheese.** *Journal of Food Science*, Chicago, v. 58, p. 764–769, 1993.

FACCIA, M. et al. Influence of the different sodium chloride concentrations on microbiological and physico-chemical characteristics of mozzarella cheese. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 79, n. 4, p. 390, 2012.

FERREIRA, D. F. **Sistema SISVAR para análises estatísticas:** manual de orientação. Lavras: UFLA, 2000.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science.** Gaithersburg: Aspen, 2000.

GRAIVER, N. G.; ZARITZKY, N. E.; CALIFANO, A. N. Viscoelastic behavior of refrigerated frozen low-moisture Mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 69, n. 3, 123-128, 2004.

GUINEE, T. P.; AUTY, M. A.; FENELON, M. A. The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, Barking, v. 10, n. 4, p. 277-288, 2000.

GUINEE, T. P. **Effects of natural cheese characteristics and processing conditions on rheology and texture:** the functionality of cheese components in the manufacture of processed cheese. *processed cheese and analogues.* Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. p. 81–109.

HEKKEN, D. L.; TUNICK, M. H.; PARK, Y. W. Effect of frozen storage on the proteolytic and rheological properties of soft caprine milk cheese. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 88, n. 6, p. 1966-1972, 2005.

JOHNSON, M. E.; OLSON, N. F. Nonenzymatic browning of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 68, n. 12, p. 3143-3147, 1985.

KINDSTEDT, P. S.; DUTHIE, C. M.; RIPPE, J. K. Rheological and proteolytic changes in Mozzarella cheese during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 71, p. 70, 1988.

KINDSTEDT, P. S. et al. Mozzarella cheese: impact of coagulant concentration on chemical composition, proteolysis, and functional properties. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 78, n. 12, p. 2591-2597, 1995.

KINDSTEDT, P. S.; RIPPE, J. K. Rapid quantitative test for free oil (oiling off) in melted Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 4, p. 867-873, 1990.

KOCA, N.; METIN, M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, n. 4, p. 365-373, 2004.

KUO, M. I.; GUNASEKARAN, S. Effect of frozen storage on physical properties of pasta filata and non-pasta filata Mozzarella cheeses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 1108–1117, 2003.

MA, X. et al. Correlating mozzarella cheese properties to production processes by rheological, mechanical and microstructure study: meltability study and activation energy. **Procedia Food Science**, Philadelphia, v.1, p. 536-544, 2011.

MA, X. et al. Quantifying blistering and browning properties of Mozzarella cheese: cheese made with different starter cultures. **Food Research International**, Barking, v. --, p. -- --, 2013. Available online 12 June 2013, ISSN 0963-9969, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.007>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913003347>)

OBERG, C. J. et al. Effects of freezing, thawing, and shredding on low moisture, part-skim Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, p. 1161–1166. 1992.

OSAILI, Tareq M. et al. Effect of Curd Washing Level on Proteolysis and

Functionality of Low-Moisture Mozzarella Cheese Made with

Galactose-Fermenting Culture. **Journal of food science**, v. 75, n. 5, p. C406-

C412, 2010.

PARK, K. B.; OH, S. H. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium,

*Lactobacillus brevis* OPK-3. **Bioresource Technology**, Trivandrum, v. 98, n. 2, p. 312-319, 2007.

PARK, Y. W. Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 84-92, 2001.

PAULSON, B. M.; MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Influence of sodium chloride on appearance, functionality, and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 8, p. 2053-2064, 1998.

QUINTANA, Q. R.; CARNEIRO, L. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do queijo minas frescal e mussarela produzido na cidade de Morrinhos GO. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, p. 205-211, v. 8, n. 3, 2007.

REID, D. S.; YAN, H. Rheological, melting and microstructural properties of cheddar and mozzarella cheeses affected by different freezing methods. **Journal of Food Quality**, Wastport, v. 27, n. 6, p. 436-458, 2004.

RICHOUX, R. et al. Combined temperature–time parameters during the pressing of curd as a tool to modulate the oiling-off of Swiss cheese. **Food Research International**, Barking, v. 41, n. 10, p. 1058-1064, 2008.

ROWNEY, M. K. et al. Salt-induced structural changes in 1-day old Mozzarella cheese and the impact upon free oil formation. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, n. 9, p. 809-816, 2004.

RUDAN, M. A. et al. Effect of the modification of fat particle size by homogenization on composition, proteolysis, functionality, and appearance of reduced fat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 8, p. 2065-2076, 1998.

SOUSA, M. J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4, p. 327-345, 2001.



TEJADA, L. et al. Effect of freezing and frozen storage on chemical and microbiological characteristics in sheep milk cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 1, p. 126-129, 2002.

TUNICK, M. H. et al. Effects of skim milk homogenization on proteolysis and rheology of Mozzarella cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 5, n. 5, p. 483-491, 1995.

VALLE, J. L. E. et al. Influência do teor de gordura nas propriedades funcionais do queijo tipo mozzarella. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 669-673, 2004.

VERDINI, R. A. et al. Multivariate statistical methods for Port Salut Argentino cheese analysis based on ripening time, storage conditions, and sampling sites. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 60-67, 2007.

VERDINI, R. A.; ZORRILLA, S. E.; RUBIOLO, A. C. Effects of the freezing process on proteolysis during the ripening of Port Salut Argentino cheeses. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 4, p. 363-370, 2005.

VERDINI, R. A.; ZORRILLA, S. E.; RUBIOLO, A. C. Free amino acid profiles during ripening of Port Salut Argentino cheese after frozen storage. **Journal of food science**, Chicago, v. 67, n. 9, p. 3264-3270, 2002.

WANG, H. H.; SUN, D. W. Assessment of cheese browning affected by baking conditions using computer vision. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 56, n. 4, p. 339-345, 2003.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Boletim do Leite e seus Derivados**, v. 56, n. 661, p. 1-8, 1983.

YUN, J. J.; BARBANO, D. M.; KINDSTEDT, P. S. Mozzarella cheese: impact of milling pH on functional properties. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 12, p. 3629-3638, 1993.

**ARTIGO 2 The effect of freezing of curd on texture and rheological properties of mozzarella cheese**

To submit to Journal of Dairy Science

### ABSTRACT

The study was conducted with the objective of evaluating the influence of freezing on curd upon the rheological behavior of mozzarella cheese along the storage period. There were four treatments: TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Three types of texture analyses were applied: texture profile, relaxation stress and uniaxial compression. The analyses were conducted with Stable Micro Systems model TA-XT2i. The rheological behavior of mozzarella cheeses was evaluated on days 0, 14, 28, 42 of storage period refrigerated at 7°C. All the rheological proprieties studied differed with time during the storage period. Regarding the hardness parameter, all cheeses increased softening texture during the storage time. The cheeses obtained by frozen curd process presented a higher hardness throughout the ripening period. With the exception of hardness, it follows that freezing of curd does not affect the overall texture of mozzarella type cheese.

Keywords: Relaxation test. Uniaxial compression. Hardness. Starter culture. Elasticity.

## 1 INTRODUCTION

Any material under an external force has a response between the two ends of ideal behavior: an elastic solid and viscous liquid. The first is described by Hooke's law, while an ideal viscous liquid obeys Newton's law (GUILLET et al., 2010; GUNASEKARAN; AK, 2000). However, most food behaves as a viscoelastic material, depending on the tension applied and the time scale, they may present solid properties of the liquid phase and a liquid material can show properties of a solid body.

Like most of the solids and semisolid foods, cheese displays characteristics both elastic solid and Newtonian fluid, these being called viscoelastic. Rheological properties include intrinsic characteristics (elasticity, viscosity and viscoelasticity) related to the composition, structure and strength of the interactions between the elements of cheese. The microstructure of the cheese is the main determinant of the rheological and textural properties (FOX; MCSWEENEY; LYNCH, 1998).

The viscoelastic behavior of food has been widely studied in rheometers that shear the sample, while the rheological parameters in tension or compression are being increasingly used to characterize the texture of food products. Furthermore, it is possible to characterize the product low or high deformations regardless of the type of force applied (ISHIHARA et al., 2011; KARAMAN et al., 2011).

Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of the freezing of curd on the texture and rheological properties of mozzarella cheese.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Localization of the experiment**

Raw milk was produced on the Dairy Farm and mozzarella cheese was manufactured in the Dairy Plant of Federal Institute of South of Minas – Machado. The research work was conducted in the Food Science Department, Federal University of Lavras. The research was carried out to evaluate the effect different starter cultures (mesophilic and thermophilic) and the freezing of curd on different characteristics of mozzarella cheese.

### **2.2 Treatments**

There were four treatments:

Treatment 1 TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd);

Treatment 2 TF (thermophilic starter culture and frozen curd);

Treatment 3 MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd);

Treatment 4 MF (mesophilic starter culture and frozen curd).

### **2.3 Cheese manufacturing process**

Pasteurized milk with 3.5% fat and temperature adjusted to 34°C was divided into four portions and worked in separate vats. Two vats were inoculated with a starter culture containing *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (TnF and TF) and the others two vats (MnF and MF) with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Christian Hansen's Laboratory). After a ripening period of 30 minutes, rennet (Ha-La® from Christian Hansen's Laboratory) was added and the milk was set

for approximately 40 min. After this period, the curd was cut and allowed to heal in the whey for 10 minutes. Then with periodic gentle agitation, curd was gradually heated from 34°C to 42°C over a period of 30 minutes. After draining, curds were cheddared until pH reached 5.2. After that, the curds obtained were divided in different flow of processing, one part (TF and MF) was frozen for 7 days at -18°C and the other (TnF and MnF) was readily processed. The stretching of curd was done by hand in water at a temperature of 75°C until the uniform and elastic strands were achieved. After molding, the pieces were immersed into brine (8°C -10°C, 20% salt), vacuum packed and stored at 4°C and for 7 days for stabilization.

The manufacturing process of cheeses is described in Figure 1

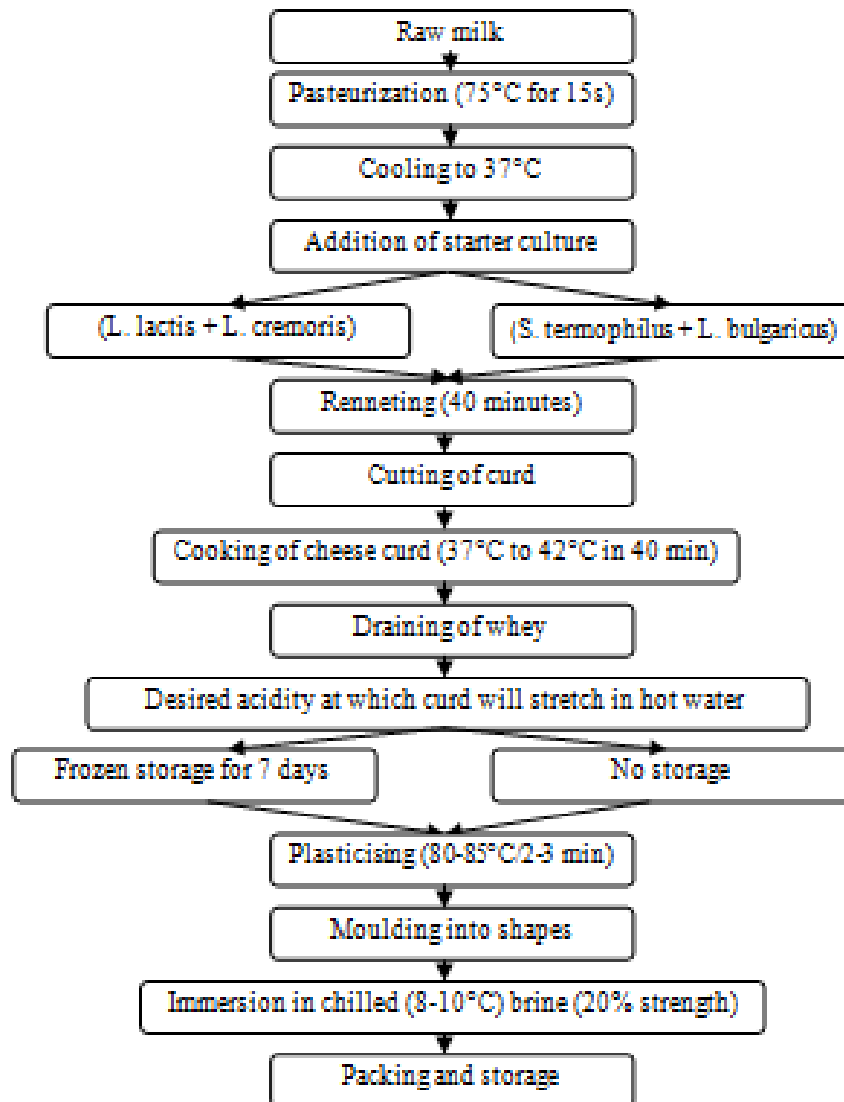


Figure 1 Flow chart for preparation of mozzarella cheese

## **2.4 Rheological properties**

Texture profile analysis, stress relaxation test and measurement of uniaxial compression were utilized to analyze texture and rheological properties.

### **2.4.1 Texture profile analysis**

The texture profile analyses (TPA) were performed in texturometer (Stable Micro Systems Model TA-XT2i; Goldaming, England) under the following conditions: pre-test speed of 1.0 mm/s, test speed of 1.0 mm/s, post-test speed of 1.0 mm/s, distance of 20.0 mm and compression with a cylindrical aluminum probe of 6.0 mm (SZCZESNIAK; KLEYN, 1963a; SZCZESNIAK; KLEYN, 1963b). The following parameters were surveyed: hardness, adhesiveness, springiness, cohesiveness and gumminess. The analyses were conducted in cylindrical samples 20 mm high and 20 mm in diameter. The test was performed in triplicate

### **2.4.2 Stress relaxation test**

Several works studied mathematical methods to explain the behavior of viscoelastic food products, but the Maxwell and Peleg models are used most frequently to describe gels and alimentary systems (ANDRÉS; ZARITZKY; CALIFANO, 2008; BELLIDO; HATCHER, 2009; KHAZAEI; MOHAMMADI, 2009). The Maxwell model involves two simple elements combined in a series to represent different behaviors. These two elements are the ideal elastic element, which can be represented as a spring and has a behavior defined by an elastic constant ( $E$ ), and the ideal viscous element, which is represented by a dashpot and has a behavior defined by its viscosity ( $\eta$ ) (CAMPUS et al., 2010).



In the Maxwell model with a constant strain ( $\varepsilon_0$ ),  $\sigma$  describes the tension applied from  $\sigma_0$  for  $\sigma(t)$  after a time  $t$  (NOBILE et al., 2007) as follows:

$$\sigma(t) = \varepsilon_0 \left[ E \cdot \exp\left(-\frac{t}{\lambda} + E_e\right) \right] \quad (01)$$

where  $E$  is the elastic modulus of the material;  $E_e$  is the equilibrium elastic modulus; and  $\lambda$  is the relaxation time given by  $\eta/E$ . Some foods do not follow the Maxwell simplified viscoelastic model. Therefore, the description of their behavior requires more complex models. An example of this case is the generalized Maxwell model, which consists of an infinite number of Maxwell models in parallel over a spring. The stress relaxation curves (stress versus time) can be adjusted by equation 2, which provides the viscoelastic parameters of the generalized Maxwell model as follows:

$$\sigma(t) = \varepsilon_0 \left[ E_1 \exp\left(-\frac{t}{\lambda_1}\right) + E_2 \exp\left(-\frac{t}{\lambda_2}\right) + \dots + E_e \right] \quad (02)$$

where  $E_1, E_2 \dots$  are the elastic moduli of the ideal elastic body;  $E_e$  is the equilibrium elastic modulus; and  $\lambda_1, \lambda_2 \dots$  are the relaxation times. The viscosity of element “ $i$ ” can be calculated according to equation 3 as follows:

$$\eta_i = E_i \lambda_i \quad (03)$$

In the Peleg model, stress relaxation data can be interpreted in accordance with the stress normalized according to equation 4 (PELEG; NORMAND, 1983) as follows:

$$\frac{\sigma_0 t}{\sigma_0 - \sigma(t)} = k_1 + k_2 t \quad (04)$$

where  $\sigma(t)$  is the stress at any time during the test;  $\sigma_0$  is initial relaxation stress; and  $k_1$  and  $k_2$  are constants. The reciprocal  $k_1$  represents the initial decay rate, and reciprocal  $k_2$  is the hypothetical value of the asymptotic normalized force that remains without relaxing (RODRÍGUEZ-SANDOVAL et al., 2009; TANG; TUNG; ZENG, 1998).

The stress relaxation test was performed in a texturometer (Stable Micro Systems Model TA-XT2i). The samples were cut into cylindrical shapes (2.0 cm in height and 2.0 cm in diameter) and compressed to 5.0% of their original height with a speed of 1.0 mm/s. The deformation was kept constant for 10.0 minutes, which allowed the stress to reach equilibrium. During that time, the relaxation of tension was measured at a rate of 1.0 measure per second. A cylindrical probe with a diameter of 7.0 cm, which had been lubricated to eliminate the influence of friction between the sample and probe, was used.

Three measurements were performed for each treatment. The nonlinear regression program SAS for Windows was used to determine the constants of the Maxwell model. Determination of the Peleg model constants was also performed using the nonlinear regression program SAS for Windows.

### **2.5.3 Measurement of the uniaxial compression**

Compression tests were performed in a texturometer (Stable Micro Systems Model TA-XT2i) using a 7.0 cm diameter probe cylinder. The samples were cut into cylindrical shapes of 2.0 cm in height and 2.0 cm in diameter and compressed to 80.0% original height with a speed of 1.0 mm/s. From the force versus time/deformation curve, the following properties were calculated: true

rupture stress ( $\sigma$ ) and true rupture strain ( $\varepsilon$ ) according to equations 5 and 6 (BAYARRI; DURÁN; COSTELL, 2003; BAYARRI et al., 2007; HAMANN, 1983):

$$\sigma = F \left( \frac{h_0 - \Delta h}{A_0 \cdot h_0} \right) \quad (05)$$

$$\varepsilon = \ln \left( \frac{h_0}{h_0 - \Delta h} \right) \quad (06)$$

where  $F$  is the rupture force,  $h_0$  and  $A_0$  are the initial height and cross-section area of the sample, respectively, and  $\Delta h$  is the change in height during compression. From the stress versus strain curves, the true rupture stress ( $\sigma_{rup}$ ), the true rupture strain (deformation Hencky -  $\varepsilon_{rup}$ ) and work of rupture ( $W_{rup}$ ) were obtained. The true rupture stress is the point at which gel fracture occurs (y axis) (maximum stress in the graphic tension versus deformation), and true rupture strain is the strain at the break of the sample (x axis). The modulus of elasticity (Young's modulus -  $E$ ) was obtained from the slope of the linear part of the initial stress-strain curve using 2.0% deformation and the work of fracture ( $W_{rup}$ ) was given by the area under the curve strength versus the distance from the rupture point.

## 2.6 Experimental design Statistical analysis

The experimental design utilized was a factorial 2 x 2 x 4, completely randomized, being: 2 starter culture (thermophilic and mesophilic), 2 technological procedures (conventional and frozen curd), during storage period (0, 14, 28, 42 days), with 4 repetitions.

One way ANOVA was performed to investigate the significant difference among cheese samples, using SISVAR 4.0 (FERREIRA et al., 2000). The Tukey test was employed to compare the treatments means.

### **3 RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1 Texture Profile Analysis**

Table 01 presents the texture profile results of the mozzarella cheeses.

The functional properties and texture of mozzarella are particularly related to the composition including protein, salt, moisture, fat and pH, the percentage of soluble and insoluble Calcium, total Calcium and the storage time (GUNASEKARAN; AK, 2003; HARDY, 2004; MIETTON; GAUCHERON; SALÜN-MICHEL, 2004).

Table 1 Texture profile of mozzarella cheese produced with different starters cultures and frozen curd

Properties	Treatments	Storage period (Days)			
		0	14	28	42
Hardness (N)	TnF	22.79 bC	18.96 bB	17.48 bB	11.07 aA
	TF	31.07 cB	27.84 cB	27.40 cB	16.60 bA
	MnF	17.80 aB	11.77 aA	10.54 aA	10.98 aA
	MF	28.13cC	24.21 cC	19.40 bB	12.38 aA
Adhesiveness (g.s)	TnF	-53.81 bB	-72.85 bB	-211.71 aA	-81.18 bB
	TF	-135.42 aB	-199.18 aB	-200.59 aB	-304.68 aA
	MnF	-153.75 aA	-143.25 abA	-118.35 aAB	-65.64 bB
	MF	-53.65 bA	-108.85 abA	-136.70 aA	-110.11 bA
Springiness	TnF	0.68 bAB	0.66 aAB	0.72 aB	0.64 aA
	TF	0.72 cB	0.66 aA	0.63 aA	0.65 aA
	MnF	0.61 aA	0.63 aA	0.70 aB	0.62 aA
	MF	0.66 bA	0.65 aA	0.64 aA	0.64 aA
Cohesiveness	TnF	0.60 bB	0.54 aA	0.57 bcAB	0.55 aA
	TF	0.59 bB	0.53 aA	0.53 abA	0.52 aA
	MnF	0.52 aA	0.54 aB	0.59 cC	0.53 aAB
	MF	0.58 bB	0.54 aAB	0.51 aA	0.54 aAB
Gumminess (N)	TnF	13.26 bC	10.43 bBC	9.28 bAB	7.32 aA
	TF	16.32 cB	15.42 cB	17.85 cB	9.69 aA
	MnF	9.44 aB	6.65 aA	6.18 aA	8.24 aAB
	MF	14.66 bcB	7.81 aA	7.66 abA	7.16 aA

Means followed by same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically one another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

Softening of the cheeses in all treatments during the storage period ( $p < 0.05$ ) could be observed. These results due to the proteolytic activities in the cheese mass, cause a consequent loss of firmness of the cheese. Increased proteolysis, as reported by Kindstedt (2004) and Lucey, Johnson e Horne (2003), results in a reduction of the hardness of cheeses. The reason for this decrease is

owing to the cleavage mainly of  $\alpha 1$ -casein at Phe23-Phe24 bound by residual

chymosin activity which is associated with decrease in firmness during ripening.

Cheeses made with thermophilic culture presented higher values of hardness when processed with frozen curd ( $p < 0.05$ ) throughout the ripening period, whereas cheeses made with mesophilic cultures, presented higher values in the first period (0 to 28 days), achieving no significant differences on day 42 ( $p > 0.05$ ). These may have occurred because the ripening temperature ( $7^{\circ}\text{C}$ ) supposedly had less negative effect upon the mesophilic bacteria activity than upon the thermophilic ones, affecting the proteolysis of cheese, as found in Article 1, Table 4.

Cheese made with frozen curd presented higher values of hardness, supposedly by the fact that freezing decreases the hydration capacity of proteins. Hydration of casein (assessed by the holding capacity of the aqueous phase), as reported by Kindstedt et al. (1995), increases significantly during the first weeks after production, as free water is usually absorbed quickly by the protein matrix. The ability of a cheese to retain its free aqueous phase also depends on the rigidity of the protein matrix.

Cheese texture development is accomplished in 2 stages during ripening. In the first two weeks of storage, the cheese changes from a rubbery to a

smoother texture and a less curdy and more homogenous product. During this time, the casein network weakens as proteolysis occurs by residual coagulant in the cheese. Then, a further gradual change in cheese texture occurs as proteolysis continues under the combined influence of the coagulant and starter and nonstarter bacterial enzymes (ATTAIE, 2005; MARTINEZ-CUESTA et al., 2001).

Sheehan (2004) studied the hardness of low fat mozzarella cheese and the firmness of all cheeses decreased significantly between 1 and 70 days, and the decrease in hardness was especially marked on the edges of the cheese. Migration of salts from the edge towards the center of the cheese in combination with an increase in moisture in the board would have affected the strength of the lower edges.

MnF treatment had higher values of moisture, what explains because there were low values of hardening. Bhaskaracharya and Shah (1999) observed that the hardness in mozzarella cheese has been reported to decrease with increase in moisture content.

Despite the high fat content, TF presented higher values of hardening. According to Rudan et al. (1999), as the fat content of cheese decreased the firmness increased and the low fat cheese has rubbery texture and minimal breakdown during chewing.

Despite significant differences encountered among frozen curd cheeses and conventional cheeses, it is positive to state that the difference observed is not high enough to represent a defect in the cheeses, so it is possible to consider the freezing technology applied to curd a feasible option in mozzarella manufacturing.

Regarding adhesiveness, TF treatment presented lower values on day 42 of storage ( $p < 0.05$ ). In general, there was an increase in adhesiveness over the period.



Springiness is the speed which the deformed material returns to its original condition after the deforming force is removed. No significant differences ( $p>0.05$ ) were observed for the referred parameter in the cheeses after days 28 and 42. Similar observations on springiness in Mozzarella cheese was reported by Yun et al. (1993). Dong et al. (2009) showed that the elastic nature of mozzarella did not change significantly during storage for 60 days.

Cohesion is a measure of the strength of internal links in the body of a product (GUNASEKARAN; AK, 2003). The cohesiveness of the cheeses produced using treatments TnF, TF and MF was decreased during the storage period. There was no significant difference among all treatments on days 14 and 42 in the storage period ( $p <.05$ ). Kindstedt (2004) and Lucey, Johnson e Horne (2003) in their studies with mozzarella cheeses observed that an increase in proteolysis decreases cohesion in cheeses, nevertheless that statement was not confirmed by the results found.

Gumminess is the energy required to disintegrate a semisolid food to be swallowed. Regarding to gumminess, no significant difference among all treatments was observed in the initial day of storage ( $p>0.05$ ). Generally, the values for gumminess decrease during storage time.

### **3.2. Stress relaxation test**

Maxwell and Peleg models were utilized to define rheological parameters in mozzarella cheese.

#### **3.2.1 Maxwell model**

Table 2 presents the results of stress relaxation test using the Maxwell model of mozzarella cheeses.

Table 2 Stress relaxation test using Maxwell model of mozzarella cheese produced with different starters cultures and frozen curd

Parameter	Treatment	Storage period			
		0	14	28	42
Ee (N/m <sup>2</sup> )	TnF	50.14 aB	43.98 bB	18.00 aA	26.39 bA
	TF	51.01 aB	36.10 abB	32.34 bB	7.84 aA
	MnF	48.65 aC	24.20 aB	8.58 aA	15.74 aAB
	MF	49.56 aB	49.87 bB	14.97 aA	12.28 aA
E <sub>1</sub> (N/m <sup>2</sup> )	TnF	100.01 aB	98.37 bB	74.14 aAB	57.99 aA
	TF	157.40 cB	138.71 cB	127.54 bB	62.88 bA
	MnF	134.87 bB	58.29 aA	57.46 aA	46.35 aA
	MF	161.55 cB	96.56 bA	75.88 aA	77.81 bA
$\lambda$ (s)	TnF	106.67 aA	109.15 aA	106.54 aA	99.20 aA
	TF	98.39 aA	96.31 aA	96.82 aA	88.07 aA
	MnF	106.33 aA	100.17 aA	99.81 aA	110.72 bA
	MF	103.13 aA	105.22 aA	108.57 aA	108.52 bA
$\eta$ (Pa.s)	TnF	10754.28 aB	10784.27 bB	7916.13 aAB	5473.58 aA
	TF	12627.60 bB	13342.15 cB	14879.74 bB	8422.61 bA
	MnF	10027.28 aB	5956.63 aA	5705.36 aA	5144.53 aA
	MF	14353.11 cA	17249.89 dB	15200.41 bA	8480.12 bA

Means followed by same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically one to another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

The possibility of using the generalized Maxwell model to describe the stress relaxation behavior of food matrices was addressed in the work of Nobile (2007), and can be considered representative of a wide range of food matrices.

Values were obtained by the simplified Maxwell model, as there was no considerable improvement in relation to the  $R^2$  (stress versus time curves) when the Maxwell model of two elements and a spring was tested. Maxwell's model was able to satisfactorily describe the viscoelastic behavior of the cheese, once the experimental curves obtained in this experiment showed a good correlation ( $R^2 > 0.99$ ).

Regarding the values of  $E_0$  and  $E_1$ , the mean values of all treatments decreased during the storage period ( $p < 0.05$ ), indicating a softer structure of cheeses during time.

In the first day of storage, cheeses produced with frozen curd had the highest values of  $E_1$ , compared with conventional mozzarella cheeses. Those results of treatments TF and MF show a higher stiffness of these cheeses compared to treatments TnF and MnF ( $p < 0.05$ ).

A high value for the modulus of elasticity ( $E$ ) suggests that the casein matrix is continuous elastic with strong intermolecular attractions (FOX; MCSWEENEY; LYNCH, 1998). The elastic moduli are parameters for quantifying the stiffness of a material (PELEG, 1987); the samples with the highest elastic modulus values are the stiffest materials.

The values of relaxation time ( $\lambda$ ) during the storage period at  $7^\circ\text{C}$  present no significant difference ( $p > 0.05$ ) among all treatments. There were also no significant differences among treatments until day 28 of storage ( $p > 0.05$ ). On day 42 of storage period, MnF and MF had higher values of relaxation time compared to with TnF and TF treatments ( $p < 0.05$ ).

In general, the mean values of viscosity ( $\eta$ ) decreased during the storage period, with no significant difference among treatments at day 0 of the analysis ( $p < 0.05$ ).

Cheeses produced with frozen curd present higher values of viscosity compared to conventional mozzarella cheeses during the whole period of storage ( $p < 0.05$ ). Until day 28, MF treatments had the highest values of viscosity compared to the other treatments ( $p < 0.05$ ).

The coefficient of viscosity is a measure of the body resistance to flow when it is subjected to tension and in this case reflects the smoothness of the cheese. The higher deformation resistance ( $\eta$ ) corresponds to the lower smoothness of the cheese (FOX; MCSWEENEY; LYNCH, 1998).

In this case the reduction in the modulus indicates a decrease in the tendency of the material to recover its original form when an applied stress is removed. The decrease in the coefficient of viscosity indicates a lower resistance to deformation when the cheeses are subjected to tension. Therefore with the decrease of the elastic modulus (E) and viscosity coefficient ( $\eta$ ), the cheeses were softer and less elastic during storage (FOX; MCSWEENEY; LYNCH, 1998).

Similar results of modulus and viscosity were obtained by Rensis, Petenate e Viotto (2009) studying the rheological properties of the Prato cheese with reduced fat content.

Verdini e Rubiolo (2002) studied Port Salut cheese and observed that as ripening time increased, elastic module and viscosities obtained from the Maxwellian model diminished, their being lower in the external zone during the whole ripening period. Lower values of both elastic moduli and viscosities characterized cheese softening in both zones.

### 3.2.2 Peleg Model

The results of the stress relaxation test, using the Peleg model are shown in Table 03.

The Peleg model presents a satisfactory correlation with experimental curves (stress versus time) obtained for mozzarella cheeses, demonstrated by high values of determination coefficients ( $R^2 > 0.99$ ). Application of Peleg model to describe the data of relaxation is a simplified way to describe and compare the relaxation test, because it uses only two properties: the initial decay rate ( $1/k_1$ ) and asymptotic normalized force ( $1/k_2$ ) (BHATTACHARYA, 2010; SOZER; KAYA; DALGIC, 2008).

Table 3 Measurement of the stress relaxation test of mozzarella cheese produced with different starters cultures and frozen curd

Parameter	Treatment	Storage period			
		0	14	28	42
$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	TnF	24.52 aA	24.15 aA	24.93 aA	24.08 aA
	TF	29.15 bB	29.74 bB	27.99 bAB	23.88 bA
	MnF	26.81 aA	26.78 aA	25.02 aA	24.04 aA
	MF	28.15 bA	28.77 bA	27.82 bA	28.33 bA
$k_2$	TnF	1.16 bC	1.14 cBC	1.05 bA	1.13 bB
	TF	1.11 aC	1.06 aB	1.04 bAB	1.02 aA
	MnF	1.10 aB	1.12 bcB	1.01 aA	1.07 abB
	MF	1.16 bC	1.08 abB	1.03 abA	1.02 aA

Means followed by same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically one another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

The mozzarella cheeses present significant difference ( $p < 0.05$ ) to parameter  $k_1$  (Table 3). Cheeses processed with frozen curd had higher values to this parameter, comparing to conventional cheeses and, therefore, had lower initial decay rate ( $1/k_1$ ). Then, mozzarella cheeses processed with frozen curd were firmer (hardness) than the others, matching the hardness results encountered in texture profile analysis (Table 1).

The physical sense of the parameter  $k_1$  is expressed by its opposite, and represents the rate of decay of the tension ( $1/k_1$ ). In the case of viscoelastic solid, the smaller the value of  $1/k_1$ , the slower is relaxation of tension. A lower value of  $1/k_1$  suggests a more rigid material, which dissipates less energy, and thus requires more force for its deformation (RODRÍGUEZ-SANDOVAL et al., 2009). The reciprocal of  $k_1$  represents the initial decay rate of the initial modulus and is a measure of how easily the material deforms. Higher values of  $k_1$  suggest a harder, more solid material that dissipates less energy, thereby requiring more force to be compressed (GUO; CASTELL-PEREZ; MOREIRA,

1999).

In relation to property  $k_2$ , it is possible to observe an inconsistency of results. The same inconsistency occurred in results of springiness in texture profile analysis. In cheeses, higher values of parameter  $k_2$  represent less viscous component and higher elasticity.

The reverse of  $k_2$  represents the asymptotic level to which the normalized force decays when the time of relaxation tends to infinity. In this case the value of  $1/k_2$  varies from 0 for purely elastic solid (0% relaxation) and one for purely viscous liquid (100% relaxation). The property  $1/k_2$  is the degree

of relaxation of the material (BELLIDO; HATCHER, 2009; RODRIGUEZ-SANDOVAL, 2009). This property represents the equilibrium conditions of the material, related to the portion of the material which remains without relaxation at equilibrium (PELEG, 1980).

Verdini e Rubiolo (2002) showed that in soft cheeses, the parameters derived from Peleg's model ( $k_1$  and  $k_2$ ) diminished during ripening and were lower in the external zone showing that cheese was less solid in the external zone and became less solid in both zones during maturation.

### **3.3 Measurement of the uniaxial compression**

Table 4 shows the results of the resistance to compression parameters: true rupture stress, true rupture tension, modulus of elasticity and work of rupture of mozzarella cheese.



Table 4 Measurement of the uniaxial compression of mozzarella cheese produced with different starters cultures and frozen curd

Parameter	Treatment	Storage period			
		0	14	28	42
$\sigma_{rup}$ (N/m <sup>2</sup> )	TnF	66879.19 aC	57848.54 bBC	44024.58 aB	27621.89 aA
	TF	105518.07 cC	67318.11 cB	86913.66 cBC	29627.89 bA
	MnF	58398.32 aC	46765.88 aB	36462.66 aAB	26759.94 aA
	MF	81553.11 bB	65157.17 cB	57296.61 bA	29426.47 bA
$\epsilon_{rup}$	TnF	1.28 aA	1.43 aAB	1.26 aA	1.54 cB
	TF	1.35 aA	1.45 aA	1.42 aA	1.28 aA
	MnF	1.40 aA	1.53 aA	1.48 aA	1.46 bcA
	MF	1.37 aA	1.39 aA	1.40 aA	1.31 abA
E (N/m <sup>2</sup> )	TnF	115562.75 bD	81828.50aC	43734.50 bB	33750.75 aA
	TF	137328.50 cC	108964.75 bB	81642.25 dB	45010.75 bA
	MnF	103741.00 aC	79814.75 aB	31134.50 aA	34525.25 aA
	MF	134918.75 cD	105147.00 bC	68811.25 cB	47864.5 bA
$W_{rup}$ (kJ/m <sup>2</sup> )	TnF	75056.47 aB	63347.42 bAB	54406.04 bcA	49320.60 cA
	TF	66814.48 aB	66194.12 bB	77004.20 cB	28005.60 abA
	MnF	55700.41 aB	40850.76 aA	33592.17 abA	33659.96 bA
	MF	64509.84 aB	63632.46 bB	27046.69 aA	18719.46 aA

Means followed by same letter, capital letters in columns and lowercase letters in rows, do not differ statistically one another by the Tukey test at 5% probability. TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd); TF (thermophilic starter culture and frozen curd); MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd); MF (mesophilic starter culture and frozen curd). Means of four repetitions. Day 0 corresponds to cheese after 7 days of stabilization period.

Cheeses processed with frozen curd had higher values of rupture stress ( $p < 0.05$ ) as compared to conventional mozzarella cheeses, which indicated that the former cheeses had more rigid behavior. All treatments present decrease of rupture stress along storage period at 7°C ( $p < 0.05$ ), having a softer behavior during time.

True rupture stress ( $\sigma_{rup}$ ) is defined as the stress required to break the food matrix (CUNHA, 2002). According to Marudova and Jilov (2003), higher true rupture stress presupposes a more rigid behavior. The true rupture stress is defined as the stress required to break the protein matrix and this property is related to the hardness of mozzarella cheese (FOX; MCSWEENEY; LYNCH, 1998).

There was no significant difference in true rupture strain between treatments on 0, 14 and 28 days of storage ( $p > 0.05$ ), indicating that cheeses produced with frozen curd were rigid and strong, and conventional mozzarella cheeses were less hard and brittle. On day 42 a significant difference among treatments ( $p < 0.05$ ) is observed.

True rupture strain ( $\epsilon_{rup}$ ) indicates the brittleness of the food texture, i.e., the extent to which the product can be deformed without tearing (CUNHA, 2002). Materials with high true rupture stress and true rupture strain are rigid and strong, whereas materials with high true rupture stress but with low values of true rupture strain are hard and brittle.

Cheeses processed with frozen curd present higher values ( $p < 0.05$ ) of elastic modulus comparing to conventional mozzarella cheeses, which indicated that the first had more rigid behavior. All treatments of mozzarella cheeses increase softness along period of storage ( $p < 0.05$ ). Foods with high values of elastic modulus ( $E$ ) are more rigid (FRAEYE et al., 2010).

There was no significant difference between mozzarella cheeses on the first day of storage ( $p > 0.05$ ). Regarding the work of rupture of all treatments of

mozzarella cheeses, the values decrease during the time of storage ( $p < 0.05$ ), indicating that on that day the energy required to induce rupture of gel was similar.

Barros et al. (2006) observed the rheological behavior similar to the properties of uniaxial compression test, by studying the taste and texture of cheese Prato.

#### **4 CONCLUSION**

Mozzarella cheeses produced with frozen curd possess a more elevated hardness compared to conventional cheeses. Cheeses made with frozen curd were more rigid and elastic rigid as compared to conventional processing cheeses.

## REFERENCES

- ANDRÉS, S. C.; ZARITZKY, N. E.; CALIFANO, A. N. Stress relaxation characteristics of low-fat chicken sausages made in Argentina. **Meat Science**, Barking, v. 79, p. 589-594, 2008.
- ATTAIE, R. Effects of aging on rheological and proteolytic properties of goat milk Jack Cheese produced according to cow milk procedures. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 57, p. 19–29, 2005.
- BARROS, C. M. V. et al. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo prato light. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 11-18, 2006.
- BAYARRI, S.; DURÁN, L.; COSTELL, E. Compression resistance, sweetener's diffusion and sweetness of hydrocolloids gels. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, p. 643-653, 2003.
- BAYARRI, S. et al. Influence of texture on the temporal perception of sweetness of gelled systems. **Food Research International**, Barking, v. 40, p. 900-908, 2007.
- BELLIDO, G. G.; HATCHER, D. W. Stress relaxation behaviour of yellow alkaline noodles: effect of deformation history. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 93, p. 460-467, 2009.
- BHASKARACHARYA, R. K.; SHAH, N. P. Texture evaluation of commercial mozzarella cheeses. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 54, p. 36–40, 1999
- BHATTACHARYA, S. Stress relaxation behaviour of moth bean flour dough: product characteristics and suitability of model. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 97, p. 539-546, 2010.
- CAMPUS, M. et al. Stress relaxation behaviour and structural changes of muscle tissues from Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) following high pressure treatment. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 96, p. 192-198, 2010.

CUNHA, C. R. D. et al. Efeito do fator de concentração do retentado o rendimento de queijo minas frescal de baixo teor de gordura fabricado por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 76-81, jan./abr. 2002.

DONG, J. Y. et al. Influence of medium-concentration factor microfiltration treatment on the characteristics of low-moisture Mozzarella cheese. **Dairy Science & Technology**, Les Ulis, v. 89, p. 139-154, 2009.

FERREIRA, D. F. **Sistema SISVAR para análises estatísticas**: manual de orientação. Lavras: UFLA, 2000.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; LYNCH, C. M. Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 53, n. 2, p. 83-89, 1998.

FRAEYE, I. et al. Influence of pectin structure on texture of pectin-calcium gels. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 11, p. 401-409, 2010.

GUILLET, A. On the non hookean elastic behavior of iron whiskers at high strain. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 64, p. 2148-2150, 2010.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. M. Dynamic oscillatory shear testing of food-selected applications. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, p. 115-127, 2000.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. M. **Cheese rheology and texture**. Florida: CRC, 2003. 512 p.

GUO, Z.; CASTELL-PEREZ, M. E.; MOREIRA, R. G. Characterization of masa and low-moisture corn tortilla using stress relaxation methods. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 30, p. 197-215, 1999.

HAMANN, D. D. Structural failure in solid foods. In: PELEG, M.; BAGLEY, E. B. (Ed.). **Physical properties of foods**. Westport: AVI, 1983. p. 351-383.

HAMANN, D. D. Structural failure in solid foods. In: PELEG, M.; BAGLEY, E. B. (Ed.). **Physical properties of foods**. Westport: AVI, 1983. p. 351-383.

HARDY, J. **Le chlorure de sodium dans le lait et les produits fromagers, minéraux et produits laitiers**. Paris: TEC DOC, 2004.

ISHIHARA, S. et al. Viscoelastic and fragmentation characters of model bolus from polysaccharide gels after instrumental mastication. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 1210-1218, 2011.

KARAMAN, S. et al. Dynamic oscillatory shear properties of O/W model system meat emulsions: linear viscoelastic analysis for effect of temperature and oil concentration on protein network formation. *Journal of Food Engineering*, Essex, v. 107, p. 241-252, 2011.

KHAZAEI, J.; MOHAMMADI, N. Effect of temperature on hydration kinetics of sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 91, p. 542-552, 2009.

KINDSTEDT, P. S. et al. Mozzarella cheese: impact of coagulant concentration on chemical composition, proteolysis, and functional properties. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, p. 2591-2597, 1995.

KINDSTEDT, P. S. **Pasta filata cheese, cheese: chemistry, physics and microbiology**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. v. 2, p. 251-277.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Invited review: perspective on the basis of the rheology and texture properties of cheesem. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 2725-2743, 2003.

MARTINEZ-CUESTA, M. C. et al. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* ssp. *casei* IFPL 731 for flavour development in cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, p. 577-585, 2001.

MARUDOVA, M.; JILOV, N. Influence of sodium citrate and potassium-sodium tartrate on gelation of low-methoxyl amidated pectin. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 59, n. 2, p. 177-180, 2003.

MIETTON, B.; GAUCHERON, F.; SALÛN-MICHEL, F. **Minéraux et transformations fromagères, Minéraux et Produits laitiers**. Paris: TEC DOC, 2004. Chap. 16, p. 471-563.

NOBILE, M. A. et al. Use of the generalized Maxwell model for describing the stress relaxation behavior of solid-like foods. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 78, p. 978-983, 2007.

PELEG, M. Linearization of relaxation and creep curves of solid biological materials. **Journal of Rheology**, New York, v. 24, p. 451, 1980.

PELEG, M.; NORMAND, M. D. Comparison of two methods for stress relaxation data presentation of solid foods. **Rheological Acta**, Darmstadt, v. 22, p. 108-113, 1983.

PELEG, M. The basics of solid foods rheology. In: MOSKOWITZ, H. R. (Ed.). **Food texture: instrumental and sensory measurements**. New York: CRC, 1987. p. 1-33.

RENSIS, C. M. V. B.; PETENATE, A. J.; VIOTTO, W. H. Caracterização físico-química, reológica e sensorial de queijos tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, 488-494, 2009.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; FERNÁNDEZ-QUINTERO, A.; CUVELIER, G. Stress relaxation of reconstituted cassava dough. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 42, p. 202-206, 2009.

RUDAN, M. A. et al. Effect of fat reduction on chemical composition, proteolysis, functionality, and yield of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 4, p. 661-672, 1999.

SHEEHAN, J. J.; GUINEE, T. P. Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional properties of reduced-fat Mozzarella cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, n. 2, p. 161-172, 2004.

SOZER, N.; KAYA, A.; DALGIC, A. C. The effect of resistant starch addition on viscoelastic properties of cooked spaghetti. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 39, n. 1, p. 1-16, 2008.

SZCZESNIAK, A. S. Classification of textural characteristics. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 28, p. 385-389, 1963b.

SZCZESNIAK, A. S. Objective measurement of food texture. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 28, p. 410-420, 1963a.

TANG, J.; TUNG, M. A.; ZENG, Y. Characterization of gellan gels using stress relaxation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 38, p. 279-295, 1998.

VERDINI, R. A.; RUBIOLO, A. C. Texture changes during the ripening of Port Salut Argentino cheese in 2 sampling zones. **Journal of food science**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1808-1813, 2002.



YUN, J. J. et al. Mozzarella cheese: impact of coagulant type on functional properties. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 3657–3663, 1993.

**ARTIGO 3 Microstructure of mozzarella cheese produced with frozen curd**

To submit to Journal of Dairy Science

### ABSTRACT

The effect of frozen curd on the microstructure of mozzarella cheese during storage period was evaluated. Cheeses were evaluated for the microstructure on day 0 and 42 of storage period at 7°C, by transmission electron microscopy (TEM model Zeiss EM 109). The electron micrographs showed that the treatments evaluated had effect upon the characteristics of microstructures. Protein network presented different behaviors among treatments and throughout the storage period. Protein matrix became denser in cheeses from all treatments, from day 0 to day 42. The distribution and volumes of fat globules were compared, as well as the aspect of globules. The fat globules suffered more partial churning in cheeses from frozen curd, compared to the conventional one, regardless being, in both cheeses, evenly distributed in the protein matrix. The presence of crystals (crystalline inclusions) was noticed and lactic acid bacterial cells were visualized. The interaction of constituents of mozzarella cheese was observed and the interrelationship of components was compared among treatments and between 0 and 42 days of storage.

Keywords: Starter cultures. Transmission electron microscopy. Fat globules. Protein matrix. Coalescence.

## 1 INTRODUCTION

Composition and structural characteristics affect the functional properties of mozzarella cheese during ripening. The proteolysis that takes place during this period is the principal driving force behind age-dependent functional changes in cheese mass.

Cheese texture, determined by chemical composition and physical properties, is largely a function of cheese microstructure. The microstructure of Mozzarella cheese has been studied by transmission electron microscopy, confocal laser scanning microscopy, and scanning electron microscopy to determine the changes occurring during cheese making. Cheese is stated by Hort and Le Grys (2001) to have a microstructure consisting mostly of the casein matrix in which the fat globules are entrapped; water or serum is both bound to casein and fill interstices of the matrix that forms a network. Thus, knowledge and understanding of the way in which milk components and functional ingredients affect cheese microstructure make it possible to direct the industrial processes towards the production of high-quality cheeses. Electron microscopy is one of the methodologies which may contribute to this purpose.

Freezing is effective in extending shelf life of cheese, but it may affect the final quality of the product. Some studies (KURO; GUNASEKARAN, 2009; REID; YAN, 2004) have shown that the modification of physical properties of Mozzarella cheese due to the freezing process varies greatly depending on the methodology and operating conditions of freezing, frozen storage, and thawing.

Microstructure is one of the major controlling factors of texture and functional properties of cheese. Clearly, a majority of the functional properties are associated, according to Gunasekaran e Ak (2003) with the rheology of the solid and melted cheese. Particularly, Lucey, Johnson e Horne (2003), Montesinos-Herrero et al. (2006), Ustunol, Kawachi e Steffe (1994) e Zhou and

Mulvaney (1998), related some viscoelastic parameters to functional properties of cheese.

Given the deleterious changes freezing of cheese promotes in texture and functional properties in general, new technologies must be sought in order to overcome the problem. The freezing of curd prior stretching in replacement of freezing of the cheese appears to be a potential alternative. On the basis of this knowledge, the objective of this study was to investigate the effect of freezing of curd and starter culture on the microstructure of pasta filata mozzarella cheeses during storage period.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Localization of the experiment

Raw milk was produced on the Dairy Farm and mozzarella cheese was manufactured in Dairy Plant of Federal Institute of South of Minas – Machado. The research work was conducted in the Plant Pathology and Food Science Department, Federal University of Lavras. The research was carried out to evaluate the effect of different starter cultures (mesophilic and thermophilic) and the freezing of curd on different characteristics of mozzarella cheese.

### 2.2 Treatments

There were four treatments:

Treatment 1 TnF (thermophilic starter culture and non-frozen curd);

Treatment 2 TF (thermophilic starter culture and frozen curd);

Treatment 3 MnF (mesophilic starter culture and non-frozen curd);

Treatment 4 MF (mesophilic starter culture and frozen curd).

### 2.3 Cheeses manufacturing process

Pasteurized milk with 3.5% fat and temperature adjusted to 34°C was divided into four portions and worked in separate vats. Two vats were inoculated with a starter culture containing *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (TnF and TF) and the other two vats (MnF and MF) with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Christian Hansen's Laboratory). After a ripening period of 30 minutes, rennet (Ha-La® from Christian Hansen's Laboratory) was added and the milk was set

for approximately 40 min. After this period, the curd was cut and allowed to heal in the whey for 10 minutes. Then with periodic gentle agitation, curd was gradually heated from 34°C to 42°C over a period of 30 minutes. After draining, curds were cheddared until pH reached 5.2. After that, the curds obtained were divided in different flows of processing, one part (TF and MF) was frozen for 7 days at -18°C and the others (TnF and MnF) were readily processed. The stretching of curd was done by hand in water at a temperature of 75°C until the uniform and elastic strands were achieved. After molding, the pieces were immersed into brine (8°C -10°C, 20% salt), vacuum packed and stored at 4°C and 7 days for stabilization.

The manufacturing process of cheeses is described in Figure 1

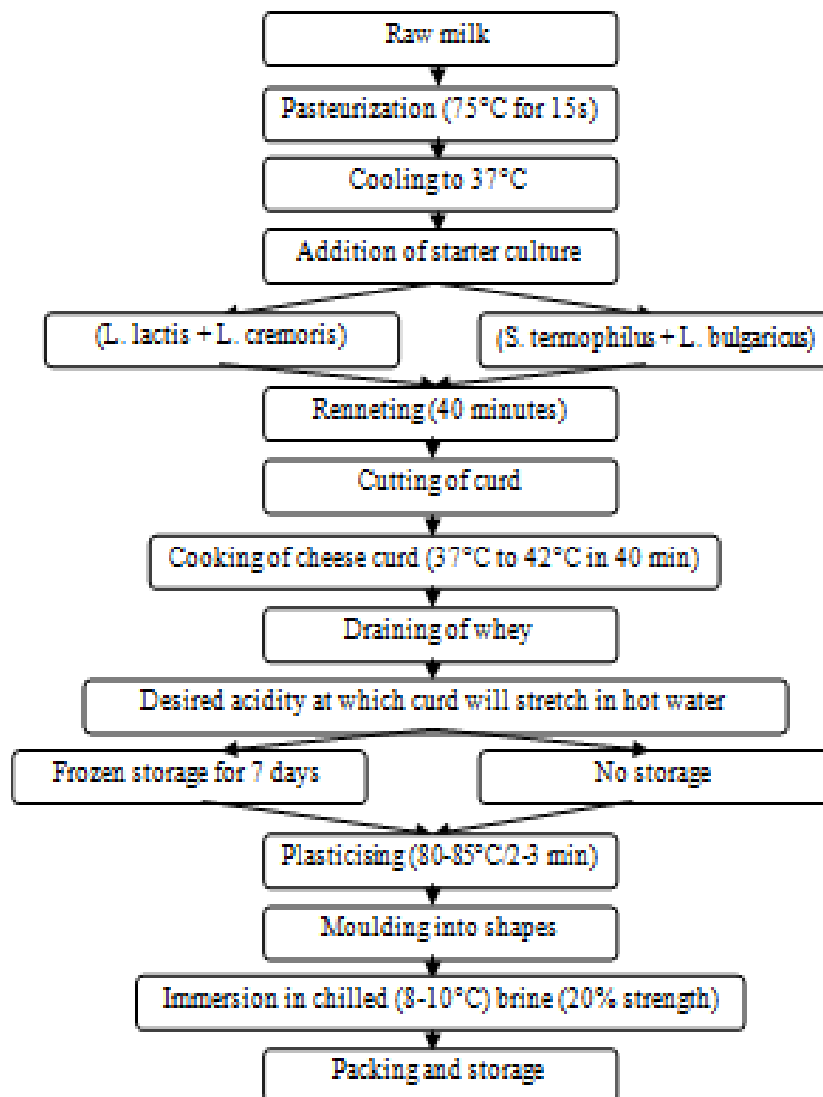


Figure 1 Flow chart for preparation of mozzarella cheese



## 2.4 Sampling of cheese

The prepared cheese samples were fixed in modified Karnovsky and stored in refrigerated camera (4°C) for a minimum of 24 hours. The preparation and observation of cheese samples prepared were carried out in the Laboratory of Electron Microscopy and Ultra structural Analysis (LME), Department of Plant Pathology, Federal University of Lavras, MG. The protocol of the LME for further analysis in Transmission Electron Microscope was used.

The monitoring of the ripening for analysis to characterize the microstructure of cheese samples was conducted on days 0, 14, 28, 42 of storage under refrigeration after production.

## 2.5 Transmission electron microscopy

The pre-fixed samples were cut into 1mm<sup>2</sup> pieces, which were washed with phosphate buffer three times for 10 minutes, post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 hours, washed three times in distilled water and transferred to 0.5% solution of uranyl acetate for 12 hours at 4 ° C.

After this period, they were again washed with distilled water three times and dehydrated in acetone gradient 25%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 30 minutes each and 100% three times for 30 minutes each.

Then the material was embedded in increasing gradient of Spurr resin: acetone at the following concentrations: 1:3 for 12 hours, 1:2 for 24 hours, 1:1 for 24 hours, 2:1 for 24 hours and twice using pure resin (100%) for 24 hours each, and then the samples assembled into silicone molds and placed in oven to polymerize at 70 ° C for 8 hours.

After the polymerization period, the resin blocks containing the sample went through a trimming process to remove excess resin and then were cut in an

ultramicrotome MT-Leica Ultracut model. The histological sections were collected on copper grids, contrasted with 2% uranyl acetate and 0.2% lead citrate for 3 minutes each. After drying, the specimens were observed under transmission electron microscope (TEM model Zeiss EM 109).

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Analysis of the structure of cheeses by transmission electron microscopy

Microscopic characterization of cheeses by transmission electron microscopy can be observed in Figure 1 and Figure 2. The qualitative study of electronmicrographs shows the distribution of proteins (darker structures) and fats (whiter structures), then the incidence of lactic bacteria culture and crystalline inclusions in the mass of cheese.

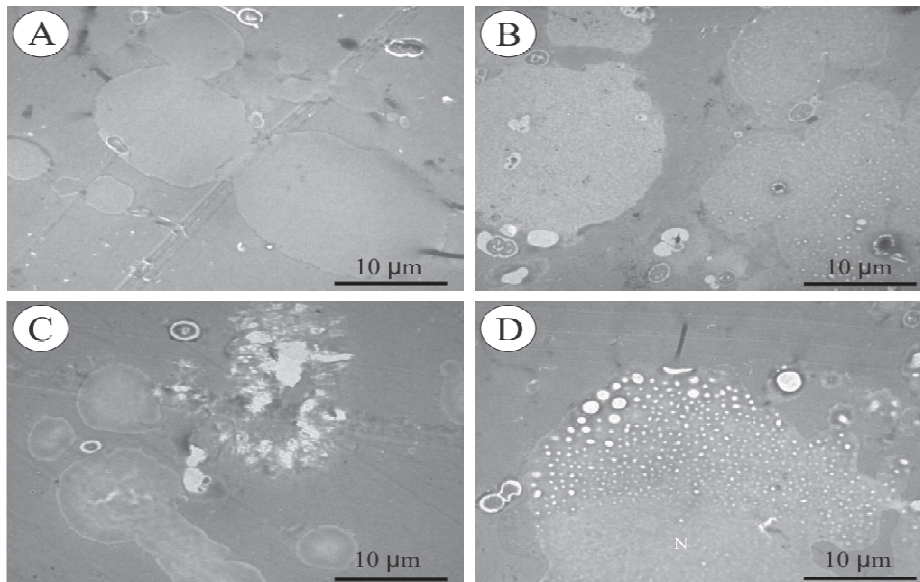


Figure 1 Transmission electron microscopy electronmicrographs (3000x) of samples of mozzarella cheese on the first day of ripening. A = TnF, B = TF, C = MnF and D = MF

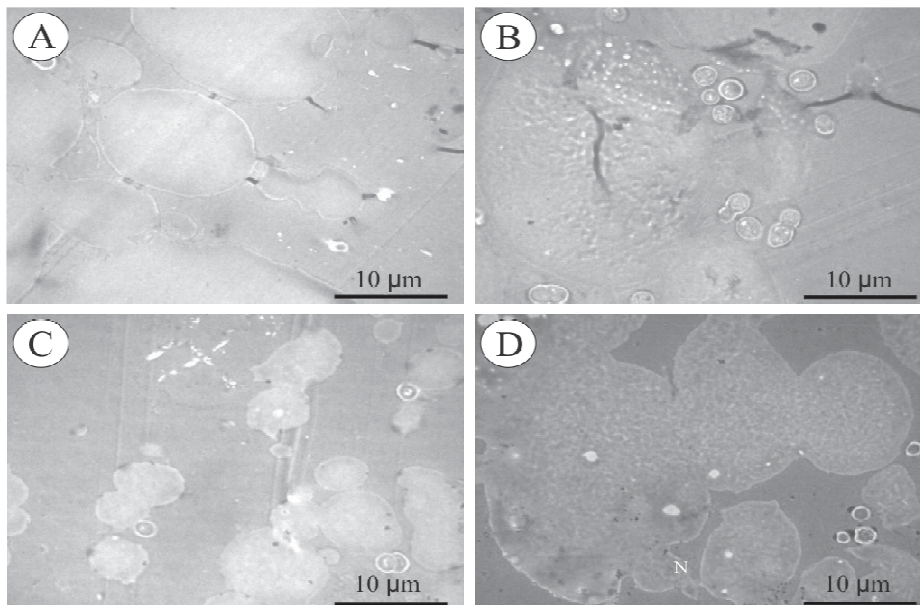


Figure 2 Transmission electron microscopy electronmicrographs (3000x) of samples of mozzarella cheese on day 42 of maturation. A = TnF, B = TF, C = MnF and D = MF

Protein matrix, fat globules individually and in different sizes and shapes, lactic culture and formation of calcium salts crystals may be observed (3000x) in the electronmicrographs.

The detailed analysis of the microstructure of the cheese can provide information about the quality of the final product, especially regarding the distribution of proteins and fats, as well as the interactions among the constituents during maturation.

### 3.2 Fat globules

Regarding to fat globules, electromicrographs of cheeses utilizing frozen curd (TF and MF) had greater volume as compared to cheeses made with non frozen curd (TnF and MnF). That may be due to the damage of ice crystals on

fat globules membrane during freezing and thawing, which leads to partial coalescence and then forming a drop-like structure of larger volume.

The rupture of the fat globules observed on the electronmicrographs explains the significantly higher values of oiling off in frozen curd cheeses (Article 1, Table 10), once the fat is devoid of its membrane and exposed to high temperature of baking, it melts, dissociates from the protein matrix, migrates to the surface of cheese, and when in excess, brings about the defect known as “oiling off”.

Fat plays an important role during the process of microstructure development in pasta filata cheeses, according to McMahon, Fife e Oberg (1999) by interrupting fusion in the protein matrix and providing space for fat and whey to be retained. Although that higher volume of drop-like fat structure of cheese made with frozen curd did not interfere in the meltability and stretchability of cheeses (Article 1, Table 8 and Table 9).

Despite that difference in volume, the fat globules of frozen curd and conventional cheeses were uniformly distributed in the protein matrix. The appropriate distribution of fat structures possibly minimizes the negative effects of great volume drops in treatments TF and MF, prevent them from further coalescence.

### **3.3 Protein matrix**

The electromicrographs show that the protein matrix becomes denser, in all treatments, as the storage period advances, and the development of a less fibrous appearance occurs, promoting a more compact and homogeneous structure. This behavior was also observed by some authors (KHEADR et al., 2002; MERRIL et al., 1996; SILVA, 2006). Kuo et al. (2001) explained that water migrates (adsorbed) into and becomes an integral part of the protein

matrix. Moreover, Paulson, McMahon e Oberg (1998) reported that the volume of the protein matrix increases, resulting in the protein matrix filling the spaces previously occupied by the serum pockets and voids.

On the first day of storage, these serum pockets formed crack-like in the microstructure of protein matrix (Figure 1). Diefes et al. (1993) suggested that local dehydration of proteins and ice crystal formation in cheese during freezing and frozen storage might cause breaks in the protein structures that allow small fat globules to contact each other and form granules. Those damages in the protein matrix also explain the greater volume of fat globules in frozen curd cheeses (TF and MF).

Kuo, Anderson e Gunasekaran (2003) proposed that freezing of cheeses might result in a more extensive breakdown of the cheese structure due to recrystallization of melted ice crystals. After thawing, the proteins are unable to fully rebind water; therefore water is less confined to the protein matrix, leading to a more porous protein matrix in frozen-stored samples. A large portion of the reticular structure of the unfrozen pasta filata Mozzarella cheese was damaged by crystals, and the protein matrix became more porous in the frozen-stored pasta filata Mozzarella cheese sample. The denser aspect of the protein matrix was observed in other studies conducted by some authors (KHEADR et al.; 2002; MERRIL et al., 1996; SILVA et al., 2006). Fontecha et al. (1996) suggested that ruptures in the junctions of the curd granule of cheese samples may be attributed either to ice crystal formation, or as a result of stresses in the matrix due to immobilization of the aqueous phase by freezing while ice expands which results in cracks.

### **3.4 Crystalline inclusions**

Crystalline inclusions were observed in the images of mozzarella cheese in all treatments during the storage period (Figure 1 and Figure 2). These inclusions were compared and identified as being a variety of calcium salts. The location of the salts in the spaces between the fat and protein matrix suggests that they were developed from whey pockets in the complex.

Agarwal et al. (2006) stated that in cheddar cheese, the soluble form of calcium in cheese can readily combine with lactate (from lactose fermentation) to form calcium lactate, and as the concentration of calcium lactate exceeds saturation, microcrystals of calcium lactate (or more specifically, calcium lactate pentahydrate) are formed.

### **3.5 Lactic acid bacteria**

The electromicrographs of all mozzarella cheeses detected lysed cultures of lactic acid bacteria, and the formation of debris, characterized by the formation of folds in the dead cell, not absorbed into the cheese matrix was visible. This fact was also observed by Palaga et al. (2002). It was also possible to detect samples (TF and MF) containing noticeable clumps of bacteria, about 0.8  $\mu\text{m}$  in diameter, which were not observed in the TnF e MnF samples, resulting in the formation of cracks in the protein matrix. The lysed bacteria possibly contribute to higher values of depth of ripening, due to the activity of proteolysis released in the protein matrix (Article 1, table 4).

It was postulated that the distribution of bacteria in nonpasta filata Mozzarella cheese samples was uneven (KHEADR et al., 2002). Upon frozen storage, the local in the cheese matrix where those bacteria were embedded might be more susceptible to damage (SILVA et al., 2006).

#### **4 CONCLUSION**

The results obtained allow us to conclude that mozzarella cheese manufactured with frozen curd, as compared to conventional manufacturing process, presents more intense damages in the globule membrane, consequently more coalescence and higher volume of clusters, presenting a more uneven shape of the clusters. The protein matrix of all cheeses had denser aspect on day 42, compared to day 0, all treatments displaying the same behavior.



## REFERENCES

- AGARWAL, S. et al. Cheese pH, protein concentration and formation of calcium lactate crystals. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 4144–4155, 2006.
- DIEFES, H.; RIZVI, S. S. H.; BARTSCH, J. A. Rheological behavior of frozen and Thawed Low-Moisture, part-skim Mozzarella cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 4, p. 764-769, 1993.
- FONTECHA, J. et al. Effects of freezing and frozen storage on the microstructure and texture of ewe's milk cheese. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 203, n. 3, p. 245-251, 1996.
- GUNASEKARAN, S.; AK, M. M. **Cheese texture**. Cheese rheology and texture. Boca Raton: CRC, 2003. p. 299-329.
- HORT, J.; LE GRYS, G. Developments in the textural and rheological properties of UK Cheddar cheese during ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4, p. 475-481, 2001.
- KHEADR, E. E. et al. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 5, p. 435-446, 2002.
- KUO, M. I.; ANDERSON, M. E.; GUNASEKARAN, S. Determining effects of freezing on pasta filata and non-pasta filata Mozzarella cheeses by nuclear magnetic resonance imaging. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 8, p. 2525-2536, 2003.
- KUO, M. I. et al. Effect of heat treatments on the meltability of cheeses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 9, p. 1937-1943, 2001.
- KUO, M. I.; GUNASEKARAN, S. Effect of freezing and frozen storage on microstructure of Mozzarella and pizza cheeses. **LWT-Food Science and Technology**, Zürich, v. 42, n. 1, p. 9-16, 2009.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. < i> Invited Review</i>: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 9, p. 2725-2743, 2003.

MCMAHON, D.; FIFE, R. L.; OBERG, C. J. Water partitioning in Mozzarella cheese and its relationship to cheese meltability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 7, p. 1361-1369, 1999.

MERRILL, R. K. et al. Microstructure and physical properties of a reduced fat Mozzarella cheese made using *Lactobacillus casei ssp. casei* adjunct culture. **LWT-Food Science and Technology**, Zürich, v. 29, n. 8, p. 721-728, 1996.

MONTESINOS-HERRERO, C. et al. Partial replacement of fat by functional fibre in imitation cheese: effects on rheology and microstructure. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 8, p. 910-919, 2006.

PAGALA, V. R. et al. Cellular localization of D-lactate dehydrogenase and NADH oxidase from *Archaeoglobus fulgidus*. **Archae**, New York, v. 1, n. 2, p. 95-104, 2002.

PAULSON, B. M.; MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Influence of sodium chloride on appearance, functionality, and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 8, p. 2053-2064, 1998.

REID, D. S.; YAN, H. Rheological, melting and microstructural properties of cheddar and mozzarella cheeses affected by different freezing methods. **Journal of Food Quality**, Wastport, v. 27, n. 6, p. 436-458, 2004.

SILVA, C. R. B. et al. Efeito da adição de *Streptococcus thermophilus* como cultura adjunta na maturação e caracterização físico-química e sensorial de queijo prato; effect of the addition of *Streptococcus thermophilus* as adjunct culture on ripening and physicochemical and sensory characterization of prato cheese. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n. 3, p. 199-203, 2006.

USTUNOL, Z.; KAWACHI, K.; STEFFE, J. Arnott test correlates with dynamic rheological properties for determining Cheddar cheese meltability. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 5, p. 970-971, 1994.

ZHOU, N.; MULVANEY, S. J. The effect of milk fat, the ratio of casein to water, and temperature on the viscoelastic properties of rennet casein gels. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2561-2571, 1998.