



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**CONTROLE DE BACTÉRIAS PROPIÔNICAS  
EM QUEIJO PARMESÃO: UTILIZAÇÃO DE  
NITRATO DE SÓDIO E SAL (NaCl) NA  
MASSA**

**CELSO JOSÉ DE MOURA**

**2001**

51884

WFU-36573

**CELSO JOSÉ DE MOURA**

**CONTROLE DE BACTÉRIAS PROPIONICAS EM QUEIJO  
PARMESÃO: UTILIZAÇÃO DE NITRATO DE SÓDIO E SAL  
(NaCl)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Química, Físico-Química e Bioquímica de Alimentos, para obtenção do título de "Doutor"

Orientador

Prof. Doutor Luiz Ronaldo de Abreu

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Moura, Celso José de

Controle de bactérias propiônicas em queijo parmesão: utilização de nitrato de sódio e sal (NaCl) na massa / Celso José de Moura. -- Lavras : UFLA, 2001.  
57 p. : il.

Orientador: Luiz Ronaldo de abreu.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Queijo. 2. Queijo parmesão. 3. Salga. 4. Nitrato. 5. Bactéria propiônica. 6. Estufamento. 7. Olhadura em queijo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-637.3  
-664.07

**CELSO JOSÉ DE MOURA**

**CONTROLE DE BACTÉRIAS PROPIÔNICAS EM  
QUEIJO PARMESÃO: UTILIZAÇÃO DE NITRATO DE  
SÓDIO E SAL (NaCl) NA MASSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Química Físico-Química e Bioquímica de Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

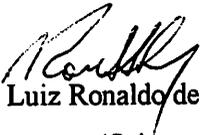
APROVADA em 2 de maio de 2001

Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado UFJF

Profª. Dra. Celeste Maria Patto de Abreu UFLA

Profª. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho UFLA

Profª. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle UFLA

  
Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Às

Minhas Filhas, Laís e Júlia,

Que sabiamente, na sua infância, souberam entender as dificuldades;

**OFEREÇO**

À minha esposa, amiga e companheira, Luzia, pelo apoio incondicional;;

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras e todos seus professores e funcionários pela oportunidade e ajuda.

Ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás pela liberação para a conclusão do Curso.

Aos orientadores Luiz Ronaldo de Abreu, Múcio Mansur Furtado, Antônio Fernandes e Eliana Pinheiro de Carvalho pela orientação, amizade e o apoio.

Aos Colegas de trabalho, Profa. Henriqueta, Prof. Alonso, Profa. Rosângela e Prof. Edward, pela acolhida e o constante incentivo à finalização desse trabalho.

Ao Chefe do Departamento Prof. Paulo Clemente e à Secretária Gicelda, pelas informações e orientações indispensáveis à realização do curso.

À professora Vânia Déa de Carvalho pelas palavras confortantes em momentos difíceis e a constante disponibilidade para ouvir.

Às laboratoristas Sandra e Tina pela grande ajuda para realização desse trabalho.

A amiga Cleusa e seu marido Paulo pelo grande apoio e pela presença indispensável sempre que necessário.

Aos sempre e grandes amigos Wilson Magela e Luciane, Clécio Silva e Rosa e Clécio Júnior pelo incentivo apoio.

Ao Pedro Henrique pela grande amizade, apoio, incentivo à realização e orientação no tratamento estatístico dos dados.

Ao Rodrigo Lobo Leite pelo grande auxílio e convivência nos momentos difíceis

Aos companheiros de "Leite", Leonardo e Gleibson, pela amizade, compreensão e prontidão sempre que solicitados.

Aos amigos Daise, Fernando Magalhães, Rogério Amaro, Sandra Maria, Luiz Miccoli, pela valiosa contribuição para realização desse trabalho.

Aos amigos Gilson Matioli, Vinícius, Débora, Joelma e a todos os colegas da pós-graduação que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

As acadêmicas, do Curso de Zootecnia, Cristiane e Juliana Mayumi pela colaboração e apoio.

Ao Dr. José Carlos, Dra. Márcia e os filhos Daniel e Gustavo, pelo apoio e confiança.

Ao Dr. Francisco Ronaldo e família, pela confiança e apoio ao longo de nosso estado na cidade.

Aos funcionários do Laticínios Serrabella, em especial ao Amarildo, pelo grande auxílio na fabricação dos queijos.

A Cooperativa Alto Rio Grande pela concessão do espaço e equipamentos para a fabricação dos queijos.

Ao Ricardo (Alemão), Laticínios Nova Suiça, pela amizade e confiança e pela concessão de equipamentos indispensáveis à realização desse trabalho.

Ao grande amigo Cristóvão Diamante pela ajuda inestimável na realização desse trabalho.

A todos os Tecnólogos em Laticínios em especial aos pioneiros que tanto fizeram pela nossa profissão.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a elaboração deste trabalho.

**Muito obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

Quinto filho de João José de Moura e Geralda Dias de Moura, nasceu em “Mata do Brejo”, Município de Patos de Minas, em 12 de Janeiro de 1961.

Mudou-se para Patos de Minas em 1971, onde cursou o “Ginásio”, na Escola Polivalente.

Em 1977 ingressou no curso “Técnico em Agropecuária” no Colégio Agrícola de Brasília-Planaltina DF, concluindo-o em 1979.

Em 1982 ingressou no curso de “Tecnólogo em Laticínios” na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em julho de 1984.

Durante a vida acadêmica, presidiu o centro acadêmico do curso, no qual promoveu debates e discussões sobre o próprio curso, em busca da melhor formação profissional, além de semanas acadêmicas.

Começou sua vida profissional de “Tecnólogo em Laticínios” em 1984. Daí, até 1995, trabalhou em várias Cooperativas e empresas de laticínios pelo país.

Em 1996 iniciou o “Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos” na Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em agosto de 1997.

Iniciou o “Curso de Doutorado em Ciência dos Alimentos” na Universidade Federal de Lavras, em agosto de 1997.

Em julho de 1998 prestou concurso público para Professor Assistente na área de “Tecnologia de Produtos de Origem Animal”, na Universidade Federal de Goiás, onde trabalha no Setor de Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia.

Em 02 de maio de 2001 faz sua defesa de tese no Curso de Doutorado em Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras.

# SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Queijo Parmesão.....	4
2.2 Estufamento em queijos.....	6
2.3 Bactérias Propiônicas .....	7
2.4.Fatores físico-químicos que interferem no crescimento de bactérias propiônicas .....	9
2.4.1 Temperatura .....	9
2.4.2 pH de crescimento das bactérias Propiônica.....	10
2.4.3 Cloreto de Sódio.....	11
2.4.3.1 Difusão de sal no queijo.....	13
2.4.4. Nitrato de Sódio.....	14
2.5. Fermentação Propiônica.....	14
2.6. Proteólise em queijos.....	16
2.6.1 Métodos para avaliação de proteólise em queijos.....	16
2.6.2 Índice de extensão e profundidade da proteólise.....	18
2.6.3 Índice de tirosina e triptofano.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Inoculação do leite com bactérias Propiônicas.....	25

<b>3.2 Análises realizadas no leite antes da inoculação com bactérias Propiônicas.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Análises realizadas no leite com bactérias Propiônicas.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4 Análises realizadas nos queijos.....</b>	<b>26</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Matéria prima .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Bactérias Propiônicas nos queijos Parmesão.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 Variação no pH dos queijos Parmesão</b>	<b>35</b>
<b>4.4 Indicadores de maturação dos queijos.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.1 Índice de extensão de maturação.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.2 Índice de profundidade de maturação.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.3 Aminoácidos tirosina e triptofano.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 Cloreto de sódio nos queijos.....</b>	<b>44</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>

## RESUMO

**MOURA, Celso José de Moura. Controle de Bactérias Propiônicas em Queijo Parmesão: Utilização de Nitrato de Sódio e Sal (Na Cl) na Massa. LAVRAS: UFLA, 2001. 56p. (Tese – Doutorado em Ciência dos Alimentos)\***

Para verificar o efeito dos sais nitrato e cloreto de sódio sobre bactérias Propiônicas, queijos Parmesão foram elaborados. Foram 3 fabricações em dias alternados. Utilizou-se leite pasteurizado pelo sistema HTST, com teor de gordura de 2,6%. Após a pasteurização, o leite foi inoculado com  $10^4$  ufc/g de bactérias propiônicas comerciais e dividido em dois tanques de fabricação: em um dos tanques foram adicionados 20 g de nitrato de sódio, e no outro não. A seguir foram fabricados os queijos Parmesão. Verificado o ponto, a massa obtidas de cada tanque foi dividida em 3 partes iguais: uma foi pré-prensada e depois enformada; outra foi adicionada de 2% de sal (NaCl) e a outra adicionada de 5% de desse sal, a seguir as massas de todos os tratamentos foram pré-prensados e depois enformadas e em formas de 5 kg e prensados por 24 horas. Após a prensagem, os queijos foram colocados em salmoura a 20% Bé. por 96, 48 e 24 horas para os tratamentos 0, 2 e 5%, respectivamente. Após a saída da salmoura e secagem, os queijos permaneceram por 21 dias em câmara fria com temperatura de  $10 \pm 2$  °C, seguindo a câmara fria com temperatura de  $22 \pm 2$  °C e umidade relativa de 85%. No leite foram determinadas contagens de bactérias propiônicas antes e depois da inoculação. Ao longo da cura, os queijos foram analisados nos dias 7, 30, 60 e 90, sendo determinados os seguintes parâmetros: pH; Índice de profundidade e extensão de maturação; cloreto de sódio; aminoácidos tirosina e triptofano e contagem de bactérias propiônicas, segundo Carvalho (1994). Foi também determinado o gradiente de sal no queijo; para isso, foi extraído com uma sonda um filete de queijo do exterior até o centro. Nesse filete, foi determinado o teor de sal (NaCl). Além das análises laboratoriais, foi feita uma documentação fotográfica dos queijos partidos ao meio para verificação visual da presença de olhaduras. A contagem de bactérias propiônicas nos queijos não tratados com sal apresentaram crescimento até os 60 dias tendo uma ligeira queda aos 90 dias, já para os queijos tratados com 2% de sal. O crescimento de bactérias propiônicas aconteceu até os 30, caindo a partir de 60 dias de cura dos queijos. O mesmo comportamento foi observado para os

---

\*Comitê Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA (Orientador), Múcio Mansur Furtado, CHR Hansen, Dr. Antônio Fernandes de Carvalho.

queijos tratados com 5% de sal; porém, aos 60 dias, a contagem de bactérias propiônicas já foi Zero; portanto, o tratamento da massa com sal (NaCl) direto inibiu o crescimento de bactérias propiônicas. O tratamento com nitrato de sódio não apresentou resultado significativo isoladamente, não interferindo no crescimento de bactérias propiônicas, mas quando associado ao sal (NaCl), indica ser mais eficiente. Quanto aos parâmetros de maturação, índice de profundidade, extensão de maturação, tirosina e triptofano, os tratamentos não apresentaram efeitos significativos. Mesmo que para os tratamentos com 5% de sal (NaCl) tenha reduzido esses índices não afetaram o processo de maturação normal dos queijos. A avaliação do gradiente de sal (NaCl) nos queijos mostrou que nos tratamentos com cloreto de sódio na massa, a velocidade de absorção e o gradiente de difusão são menores do que naqueles sem sal. Nos queijos tratados com sal (NaCl), na massa a região central do queijo apresenta um maior teor de sal desde os 7 dias comparados com os queijos sem o tratamento na massa. O levantamento fotográfico confirma os dados da contagem de bactérias propiônicas, que foram altas nos queijos sem sal (NaCl) na massa (onde se observa olhaduras características) e mais baixas para os queijos tratados com sal (NaCl), massa compacta. Desse trabalho, pode-se concluir que a adição de cloreto de sódio à massa do queijo evitou a formação de olhaduras propiônicas; que o nitrato de sódio por si só não foi efetivo no controle de bactérias propiônicas, sendo quando associado ao cloreto de sódio; a adição de cloreto de sódio direto na massa não afetou os parâmetros de maturação dos queijos.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** queijo; queijo Parmesão; salga; nitrato; bactérias propiônicas; estufamento; olhaduras em queijos.

## ABSTRACT

**MOURA, Celso José. Control of propioni bacteria in Parmesan cheese: utilization of sodium nitrate and salt (NaCl) in the mass. LAVRAS: UFLA, 2001. 60p. (Thesis - Doctorate in Food Science)\***

To verify the effect of both salts nitrate and sodium chloride on propioni bacteria, parmesan cheeses were manufactured. Three manufacturings in every other day were accomplished. Milk pasteurized by HTST system with fat content of 2.65 was utilized. After pasteurization milk was inoculated with  $10^4$  cfu/g of commercial propioni bacteria and divided into two manufacturing tanks, in one of the tanks was added 20 g of sodium nitrate and in the other, it was not. Next, the Parmesan cheeses were manufactured. At draining, the masses obtained from each tank was divided into three equal parts :one was pre-pressed and then molded, to the other was added 2% of salt (NaCl) and to the other was added 5% of that salt, following the masses of all the treatments were pre-pressed and then molded in 5-kg and pressed for 24 hours. After pressing, cheeses were put into a 20% Bé brine solution for 96, 48 and 24 hours for treatments 0, 2 and 5%, respectively. After removing from of brine and drying, cheeses remained for 21 days in cold chamber at temperature of  $10 \pm ^\circ\text{C}$ , following the cold chamber at  $22 \pm 2 ^\circ\text{C}$  and relative humidity of 85%. In milk were determined counts of propioni bacteria before and after inoculation. Along curing cheeses were analyzed on days 7, 30, 60 and 90, the following parameters being determined: pH. Index of depth and extent of maturation, sodium chloride, aminoacids tyrosine and tryptofan indexes and count of propioni bacteria, according to de Carvalho (1994). Also, salt gradient in the cheese was determined. for that a thread of cheese was extracted from the exterior to the center. In that thread was determined salt content (NaCl) .Besides the analyses, a photographic documentation of the cheeses spit on the half for visual verification of the presence of eyes was done. The count of propioni bacteria in the cheese not treated with salt presented growth up to the 60 days, presenting a slight fall at 90 days but for cheeses treated with 25 of salt, the growth of propioni bacteria happened up to the 30 days falling from 60 days, the same behavior was noticed for cheeses treated with 5% of salt, but at 60 days the counts of propioni bacteria was zero, therefore, the treatment of the mass with salt (NaCl) straight inhibited the growth of propioni bacteria. The treatment with

---

\*Guidance Committee: Luiz Ronaldo de Abreu UFLA (Major Professor), Dr. Múcio Mansur Furtado, CHR Hansen; Dr. Antônio Fernandes de Carvalho.

sodium nitrate did not present any significant result singly, not interfering with the growth of propioni bacteria but when associated with salt (NaCl), it proved to be more efficient. As for the parameters of maturation, depth index, maturation extent, tyrosine and tryptophan, the treatments presented no significant effects even that for treatments with 5% of salt (NaCl), it had reduced those indices but without affecting the normal maturation process of the cheeses. The evaluation of salt gradient (NaCl) in cheeses showed that in treatments with sodium chloride in the mass, the absorption velocity and diffusion gradient are lower than in those without salt. In the cheeses treated with salt (NaCl) in the mass, the central region in the cheese presents an increased salt content since the seven days as compared with the cheeses with no treatment in the mass. The photographic survey confirms the data of the count of propioni bacteria which were high in the cheeses without salt (NaCl) in the mass (where characteristic eyes are found) and lower for the cheeses treated with salt (NaCl) in the compact mass. From this work, it follows that the addition of sodium chloride to the cheese mass prevented the formation of propioni eyes; that sodium nitrate by itself was not effective in the control of propioni bacteria, but it being so, when associated with sodium chloride, the addition of sodium chloride straight in the mass did not affect the parameters of maturation of cheeses.

**INDEX TERMS:** cheeses, parmesan cheeses, salting, nitrate, propioni bacteria, eyes in cheeses, blowing

# 1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (SIPA/ABIQ, 2001), a produção brasileira de queijos comuns foi de 308.413 toneladas no ano de 2000, em estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). O queijo Mussarela ocupa o primeiro lugar, seguido dos queijos Prato, Minas Frescal e Parmesão. Contudo a produção informal, sem fiscalização, é considerável, sendo portanto, difícil determinar com precisão o total produzido.

Dentre os vários tipos de queijos produzidos no Brasil, o Parmesão se destaca como um dos mais importantes, o quarto mais fabricado, por ser um produto muito apreciado, especialmente como ingrediente para usos diversos, mas principalmente por ser um queijo de longo período de maturação e validade. Isso possibilita que grandes volumes de leite possam ser consumido em sua produção na época de grande oferta de leite, e a expedição do produto na época da entressafra.

Entretanto, as características físico-químicas desse queijo permitem, muitas vezes, o aparecimento de certos tipos de defeitos, que, embora não exclusivos do Parmesão, trazem grandes prejuízos às indústrias que o fabricam. Dentre esses defeitos, pode-se destacar o estufamento tardio, que causa perdas totais ou parciais com depreciação da qualidade do produto. Classicamente, o estufamento tardio é causado por bactérias esporuladas, do gênero *Clostridium*, sendo o *Clostridium tyrobutyricum* o mais importante. Os esporos deste microrganismo anaeróbico são largamente distribuídos em silagem, feno, ração, etc, e esses não são destruídos pela pasteurização. Quando presentes na massa do queijo, podem, em condições favoráveis, passar da forma esporulada para a fermentativa, produzindo grande quantidade de gás. Como a massa desse queijo não possui elasticidade com a expansão desses gases, principalmente o

hidrogênio, a tendência é formar trincas na massa do queijo. Como esse defeito aparece algum tempo depois da fabricação, é denominado estufamento tardio. O estufamento tardio é favorecido pelo grande tamanho do queijo e pelo tipo de salga empregado. Quando a salga é feita em salmoura, o interior do queijo fica desprotegido de sal por muito tempo, o que favorece a germinação dos esporos.

Porém, nem todo o estufamento do queijo parmesão pode ser atribuído ao *Clostridium*. Muitas vezes, esse defeito aparece em função do desenvolvimento de bactérias propiônicas, que produzem grande quantidade de CO<sub>2</sub> durante seu processo de fermentação. A presença dessas bactérias em alguns tipos de queijos é necessária, como no Gruyère e Emmental, e muitas vezes desejável, como no Gouda. Nesses tipos de queijo, cuja massa possui boa elasticidade, o acúmulo de CO<sub>2</sub> leva à formação de olhaduras, redondas e brilhantes, tomando o produto mais atrativo ao consumidor. Produzem também certos compostos como o ácido acético e principalmente o propiônico, que juntamente com outras substâncias, produzidas em menores concentrações, conferem aroma e sabor característicos a esses tipos de queijos. Todavia, o desenvolvimento de bactérias propiônicas no queijo Parmesão é indesejável, descaracterizando-o e diminuindo seu valor de mercado.

O defeito mais evidente causado por essas bactérias é o aparecimento de trincas e olhaduras no queijo. Sendo o Parmesão um queijo de massa dura, sem elasticidade, como os citados anteriormente, o acúmulo de grande quantidade de CO<sub>2</sub>, formará grandes olhaduras irregulares, trincadas, muito semelhantes às causadas pelo *Clostridium*. Como é um queijo de baixo teor de umidade, esse defeito se agrava, pois o CO<sub>2</sub> é solúvel em água e quando a umidade do queijo se satura com esse gás, o defeito aparece em maior intensidade. Além do estufamento, o queijo tem seu sabor e aroma descaracterizados pelos diversos compostos formados pelas bactérias propiônicas, fica com sabor e aromas mais

adocicados, mascarando o sabor picante e o aroma lipolítico, característicos do queijo Parmesão.

As bactéria propiônicas ocorrem naturalmente nas pastagem e solos e já foram isoladas em certas regiões do Estado de Minas Gerais, como o Sul de Minas e Campo das Vertentes, onde a produção do queijo Parmesão é muito importante. Essas bactérias podem resistir ao processo de pasteurização e caso encontrem condições favoráveis durante a maturação do queijo, se desenvolvem e causam o aparecimento do defeito. Em virtude dos problemas causados pelo desenvolvimento de bactérias propiônicas em queijo Parmesão, este trabalho teve como objetivos:

- Verificar a eficiência da utilização de cloreto de sódio direto na massa, na prevenção da formação de gás por bactérias propiônicas;
- Verificar a eficácia da associação de cloreto de sódio e Nitrato de Sódio na prevenção do estufamento tardio causado por bactérias propiônicas;
- Verificar a influência do cloreto de sódio e nitrato de sódio nos indicadores de maturação de queijos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A elaboração de queijos é a forma mais antiga de processamento de leite. Os diferentes procedimentos de fabricação de queijo levam a uma série de transformações bioquímicas e fazem com que a caseína insípida adquira sabor e se torne agradável e característico de cada tipo de queijo.

O queijo normalmente é fabricado com leite de vários mamíferos, mas principalmente com o de vaca, ovelha e búfala sendo uma excelente fonte de minerais e proteínas. Existem, pelo mundo milhares de variedades de queijos, oferecendo, assim, uma gama de alternativas aos consumidores mais exigentes.

A FAO define queijo como sendo o “Produto fresco ou maturado obtido da drenagem do soro após a coagulação do leite integral, desnatado ou parcialmente desnatado.” Já o Ministério da Agricultura do Brasil, por meio do Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal, Brasil (1997b), define queijo como o “produto obtido do leite integral, padronizado, magro ou desnatado, coagulado natural ou artificialmente, adicionado ou não de substâncias permitidas no Regulamento e submetido a manipulações necessárias para a formação das características próprias”.

Dentre as diversas variedades de queijos produzidos no Brasil encontra-se o queijo Parmesão, ocupando uma posição de destaque na produção nacional.

### 2.1 Queijo Parmesão

O queijo Parmesão é derivado do queijo italiano Grana; apresentando como principais características o baixo teor de umidade, textura granular, sabor picante e longo período de maturação. O baixo teor de umidade lhe confere uma alta capacidade de suportar estocagem mais prolongada sem os problemas advindos do alto teor de umidade presente em outras variedades.

O artigo 625 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) e a portaria 353 de Setembro de 1997 estabelecem as seguintes características para o queijo Parmesão:

- Consistência: dura
- Textura: Compacta, quebradiça e granulosa
- Cor: branco-amarelada a ligeiramente amarelada
- Sabor: Salgado, levemente picante
- Odor: Característico
- Crosta: lisa, consistente, bem formada, recoberta com revestimentos apropriados, aderidos ou não.
- Olhos: não possui, eventualmente poderá apresentar alguns pequenos e algumas olhaduras mecânicas.
- Peso: 4,0 a 8,0 Kg
- Maturação: pelo menos 6 meses

Furtado e Lourenço Neto (1994) apresentam a seguinte composição para o queijo Parmesão:

- Umidade: 32 - 37%
- Gordura: 22 – 24%
- Sal: 2,0 – 2,5%
- pH: 5,3 – 5,4

Uma das razões para uma maior produção do queijo Parmesão é a sua característica de baixa umidade. Na época de maior produção de leite, geralmente entre os meses de outubro e março, grandes volumes de leite são destinados à fabricação do queijo Parmesão devido à sua resistência a longos períodos de estocagem e o maior consumo de leite para produzir um quilo de queijo.

Embora não haja números oficiais confiáveis que mostrem o volume de leite destinado à fabricação de queijos, sabe-se que, realmente, boa parte é

destinada à fabricação de queijo tipo Parmesão, devido às características já citadas. Segundo informações da SIPA/ABIQ (2001) a produção de queijo Parmesão no ano de 2000 foi de 21.20 toneladas, o equivalente a 6,85% da produção total de queijos comuns em estabelecimentos sob Inspeção Federal. Isso significa que o queijo Parmesão é o quarto queijo mais produzido no Brasil, ficando atrás do queijo Mussarela, Prato e Minas Frescal.

O leite destinado à fabricação do queijo Parmesão deve ser de boa qualidade, pasteurizado e com teor de gordura padronizado em torno de 2,5 %. Porém, o queijo Parmesão é considerado por muitos como um queijo rústico; com isso, muitas fábricas utilizam leite cru e até mesmo leite de baixa qualidade para a sua fabricação. Vários fabricantes e consumidores defendem o conceito de que o queijo Parmesão fabricado com leite cru apresenta melhor qualidade do que aquele fabricado com leite pasteurizado (Furtado, 1991).

Às vezes o fabricante de queijo Parmesão negligencia princípios básicos de seleção de leite, podendo, assim, ter como resultado o aparecimento de problemas com a qualidade dos queijos. Dentre os vários defeitos que podem aparecer no queijo Parmesão, pode-se citar o estufamento tardio. Como é um queijo de longa maturação, o problema poderá ser observado já no momento da comercialização, o que vem aumentar ainda mais o prejuízo.

## **2.2 Estufamento em queijos**

O estufamento de queijos é caracterizado pela formação de gás de gás na massa por bactérias, provocando o aparecimento de olhaduras e interferindo no sabor e aroma dos queijos acometidos de tal problema causado basicamente pelo desenvolvimento de microrganismos que produzem grandes quantidades desses gases.

Esse defeito no queijo Parmesão tem grande impacto comercial, pois uma importante característica desse queijo é sua textura fechada e granular. Nos queijos estufados, a massa pode apresentar desde pequenas olhaduras regulares

até grandes trincas, que comprometem significativamente o valor comercial do queijo. Queijos estufados são comercializados com baixos preços ou são destinados a outras finalidades, como a ralação, que é uma alternativa, de menor valor agregado.

O estufamento de queijos é dividido em dois tipos distintos o estufamento precoce, que é provocado normalmente pelo desenvolvimento de bactérias do grupo coliformes; o segundo caso é o estufamento tardio, que acontece ao longo da cura, principalmente nos queijos de maturação mais longa, como é o caso do Parmesão. Classicamente, o estufamento tardio é causado por bactérias esporuladas, do gênero *Clostridium*, sendo o *Clostridium tyrobutyricum* o mais importante.

Entretanto, nem todo o estufamento do queijo parmesão pode ser atribuído ao *Clostridium*, como geralmente acontece. Muitas vezes, esse defeito aparece em função do desenvolvimento de bactérias propiônicas, que produzem grande quantidade de CO<sub>2</sub>, durante seu processo de fermentação. A presença de olhaduras provocadas por bactérias propiônicas é considerada defeito em alguns queijos como o Parmesão (Britz e Jordam, 1976), o Parmigiano Reggiano e Grana Padano (Carcano et al., 1995). A contaminação do leite com bactérias Propiônicas é comum em propriedades com baixo nível de higiene, pois essas podem ser encontradas em vários ambientes, como o solo, as pastagens, as rações silagens e etc. (Cummins e Johnson, 1991) .

### **2.3 Bactérias Propiônicas**

As bactérias Propiônicas são quimiotróficas, anaeróbias e até aerotolereantes, Gram positivas, e sob condições normais não esporulam. São imóveis, catalase positiva e produzem ácido propiônico como principal produto do metabolismo de carboidratos (Cummins e Johnson, 1991). De acordo com a classificação da 9ª edição do Bergey's of Systematic Bacteriology (Holt et al., 1994), as bactérias propiônicas se dividem em dois grupos segundo os nichos

ecológicos: a) bactérias propiônicas ligadas à pele e envolvidas na patologia da acne; b) bactérias propiônicas clássicas, estas de interesse industrial, em especial na indústria de laticínios, onde são as principais responsáveis pelas características dos queijos suíços. A textura típica dos queijos suíços, olhaduras abundantes e lisas, são produzidas pela ação dessas bactérias durante a maturação dos queijos. Para queijos como o Parmigiano, o Grana Padano e o Parmesão, essas olhaduras se constituem em graves defeitos (Carcano et al., 1995).

De acordo com “Approved Lists of Bacterial Names” (Sherman et al., 1989), as bactérias propiônica do leite atualmente comportam quatro espécies entre onze descritas na 7ª edição do Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, sendo: *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* e subsp. *shermanii*, *P. jensenii*, *P. Thoenii* e *P. acidopropionici*. Elas se distinguem por seus perfis de fermentação e por suas características morfológicas e fisiológicas. A taxonomia do gênero *Propionibacterium* se encontra em plena evolução (Carvalho, 1994).

As bactérias propiônicas produzem metabólitos que contribuem para o flavor e textura de queijos. Esses metabólitos são os ácidos acético e propiônico, o aminoácido prolina e o gás carbônico (CO<sub>2</sub>). O gás carbônico (CO<sub>2</sub>) liberado durante o metabolismo dessas bactérias é o principal responsável pela formação de olhaduras em queijos, principalmente os suíços que apresentam essa característica como desejável; e em outros como o Parmesão, o Grana e o Parmiggiano, nos quais as olhaduras são características indesejáveis (Britz e Jordam, 1976).

As bactérias propiônicas, além de fazerem parte de produtos lácteos, são encontradas em vários outros habitats, como o solo, as pastagens e silagens (Cummins e Johnson, 1991). Essas bactérias podem ser encontradas naturalmente em algumas regiões brasileira em especial na região sul do estado

de Minas Gerais. Foram isoladas na região do Campo das Vertentes 11 cepas de bactérias provenientes de queijos Prato esféricos com defeito de estufamento. As olhaduras desses queijos eram típicas de bactérias propiônicas, no entanto, nesses queijos não havia sido utilizado cultura dessas bactérias, assim essas bactérias seriam provenientes de uma contaminação do leite. Após o isolamento e purificação, estas cepas foram utilizadas na produção de queijos de massa cozida, e nestes ocorreu a formação olhaduras características de bactérias propiônicas, o que levou a autora a concluir que essas bactérias eram propiônicas (Souza Netto, 1997).

## **2.4 Fatores físico-químicos que interferem no crescimento das bactérias propiônicas.**

### **2.4.1 Temperatura**

As bactérias propiônicas encontradas no leite podem crescer a temperaturas entre 15 e 40°C; porém, a temperatura ótima de crescimento situa-se em torno de 30°C, segundo Hettinga e Reinbold (1972b) e Carcano et al. (1995); e 32°C, segundo Malik, Reinbold e Vedamuthu (1968). Carcano et al. (1995), trabalhando com bactérias propiônicas isoladas de leite destinado à fabricação de queijo Parmigiano, encontrou a seguinte média de crescimento: 2 a 3 dias a 30°C; 5 a 7 dias a 22°C e 10 a 14 dias a 15°C.

Certas estirpes de bactérias propiônicas podem crescer no meio Extrato de Levedura lactato de sódio a temperaturas entre 2,8 a 7,2°C, por um tempo de incubação de 4 meses. A espécie *P. freudenreichii* caracteriza-se por um melhor crescimento a baixas temperaturas, considerando que 80% das estirpes se multiplicaram em meio contendo lactato de sódio, enquanto apenas 40% das estirpes *P. thoenii* e 25% de *P. acidopropionici* cresceram nesse meio e temperatura (Park et al., 1967).

Hetinga, Reinbold e Vedamuthu (1974) testaram a capacidade de crescimento de algumas espécies de *P.freudenreichii* na massa de queijo a uma temperatura de 3,8 a 6,8. Foram detectados defeitos de textura em 75% dos queijos fabricados com estirpes de *P.freudenreichii* com capacidade crescer a baixas temperaturas, sendo os defeitos a presença de olhaduras devido à produção excessiva de CO<sub>2</sub> durante a fermentação propiônica nas câmaras frias (Hetinga, Reinbold e Vedamuthu, 1975; Vassal e Auclair, 1978).

A espécie *P.freudenreichii* apresenta uma boa resistência a tratamentos térmicos, podendo resistir a temperaturas de 62,8°C por 30 minutos, não sendo destruída pelo aquecimento da massa durante o processo de fabricação de queijos de massa prensada e cozida (Malik, Reinbold e Vedamuthu, 1968).

#### 2.4.2 pH de crescimento das bactérias propiônicas

As bactérias propiônicas clássicas têm como pH ótimo de crescimento uma faixa de 6,5 a 7,0, suportando de 5,1 a 8,5. Carcano et al. (1995) demonstraram a alta capacidade de adaptação das bactérias propiônicas testando várias combinações de pH e temperatura.

O pH do queijo após 24 horas de fabricação não é favorável ao crescimento das bactérias propiônicas; as operações durante a fabricação do queijo que levam a alterações nos valores de pH e à formação de ácido láctico têm influência indireta na fermentação propiônica. O aumento do número de células de *P.freudenreichii* é muito maior em queijos com pH 5,37 do que em queijos que apresenta pH de 5,21, em um mesmo período de tempo (Fryer e Peberdy, 1977).

Carcano et al. (1995) isolaram cepas de bactéria propiônica de leite destinado à fabricação de queijo testaram várias formas de reduzir o crescimento dessas bactérias e verificaram que o menor crescimento aconteceu em pH inferior a 5,5, a uma temperatura inferior a 22°C e uma concentração de sal

maior que 2%. Verificaram também que em pH 6,0 e temperatura de 22°C, o crescimento foi baixa ou quase não houve inibição do crescimento.

### 2.4.3 Cloreto de sódio

O sal no queijo, além de interferir no sabor, participa do controle de umidade e pode inibir o crescimento de alguns microrganismos. O sal no queijo tem uma ação sobre a água disponível pela alteração da pressão osmótica, o que pode resultar em um crescimento seletivo de microrganismos. O teor de sal na umidade do queijo, além de participar da formação do sabor, é de grande importância na vida microbiológica, em razão do seu efeito seletivo sobre o crescimento de microrganismos e atividade enzimática (Visser, 1993).

A difusão do sal no queijo depende de fatores como a umidade, o formato do queijo e o processo de salga empregado. O queijo com maior umidade tende a absorver mais sal. Os processos de salga de queijo podem ser em salmoura, a seco ou direto na massa. A salga na massa oferece a vantagem de promover a distribuição mais rápida e uniforme do sal no queijo (Spreer, 1991).

Farkye et al. (1981) observaram que a concentração de sal na superfície do queijo é 2,28 vezes superior à concentração do centro do queijo, quando salgados em salmoura; e que a concentração se torna linear após 14 dias de armazenamento. As bactérias propiônicas são pouco resistentes à presença de sal. A resistência ao sal é inversamente proporcional ao pH, podendo se desenvolver em presença de 6,0% a pH 7,0 e 3% a pH 5,2 (Carvalho, 1994). O crescimento das bactérias propiônicas é menor na periferia dos queijos em que a concentração de sal pode chegar a 3,5% em média.

Sandri et al. (1995), estudando queijos Parmigiano-Reggiano com defeito de estufamento, em fábricas da região de Parma, na Itália, afirmam que nos queijos com maior conteúdo de umidade e menor concentração de cloreto de sódio, a fermentação propiônica ou butírica se deu de forma mais acentuada.

Carcano et al. (1995) após isolarem cepas de bactérias propiônicas de leites destinados à fabricação de queijo Grana Padano, verificaram que estas bactérias foram inibidas a 30°C e 3% de sal e a 22°C e 1,5% de sal e a maioria das cepas foram inibidas com 0,5% de sal e uma temperatura de 15°C. Para esses autores, a combinação de pH inferior a 5,5 e uma concentração de sal superior a 2% é um bom método de inibição de bactérias propiônicas em queijos. Richoux, Faivre e Kerjan (1998) testaram 21 cepas de bactérias propiônicas quanto a resistência ao sal e afirmaram que a partir de 1% na umidade ocorre uma redução drástica da fermentação propiônica em queijo Emmental, embora a taxa de inibição dependa de cada cepa.

Grande parte das bactérias propiônicas clássicas não suportam uma concentração de sal superior a 3,0%. Reinbold (1985) verificou uma tolerância máxima de 4,5% em meio YEL. Teores de sal inferiores a 0,58% podem favorecer o desenvolvimento excessivo de bactérias propiônicas, podendo causar defeitos de textura em queijos (Maurer e Stock, 1978). A diferença de desenvolvimento de bactérias propiônicas entre o centro e a periferia dos queijos pode ser em consequência do gradiente, de sal de 0,8 a 0,4 % da periferia para o centro, independente do potencial de oxido-redução (Mocquot, 1979).

O sal afeta a taxa de maturação dos queijos retardando e promovendo transformações bioquímicas. A redução da velocidade de maturação pelo sal pode possibilitar um melhor controle desta (Alais, 1991). Mudanças na textura podem ser determinadas pela taxa de proteólise nesse queijo, e esta é afetada pela concentração de sal na umidade e também pela temperatura de cura ou armazenamento à qual o queijo é submetido (Lawrence, Creamer e Gilles, 1987).

A relação entre proteína e água no queijo é influenciada pela presença de sal durante as primeiras semanas após a fabricação. Isso resulta num aumento da capacidade de retenção de água e a conversão de parte da caseína que forma a

estrutura da massa em um estágio solúvel (Christensen, 1996; Ghosh, Singh e Kwala, 1990; Kindstedt, Kiely e Gilmore, 1998).

#### **2.4.3.1 Difusão de sal no queijo**

Quando o queijo é salgado em salmoura, ocorre um movimento de líquidos de moléculas de NaCl da salmoura para o interior do queijo, em consequência da diferença de pressão osmótica entre a umidade do interior do queijo e da salmoura. Esse movimento ocorre na busca do equilíbrio osmótico entre as duas soluções, umidade do queijo e salmoura. Esse processo de difusão do sal no queijo é dificultado pelas estruturas e composição do próprio queijo, que constituem fatores de impedimento para entrada de NaCl e saída de água.

O teor de umidade do queijo é importante na taxa de difusão de sal. Quanto maior a umidade, maior será a taxa de difusão de sal no queijo. Durante a salga, inicialmente a troca acontece de forma mais rápida, se tornando mais lenta à medida que a solução na umidade do queijo vai se concentrando. Essa redução da velocidade pode ser explicada pelo aumento da viscosidade aparente da solução no queijo, que vai aumentando à medida que se aproxima da saturação (Guinee e Fox, 1987).

O tamanho e formato são fatores que devem ser considerados no processo de salga de queijos. O sal absorvido é diretamente proporcional à superfície de contato do queijo com a salmoura. Portanto, queijos maiores, como o Emmental, o Parmesão, o Grana Padano, têm a salga dificultada em função de seu tamanho (Furtado, 1991).

A salga direta na massa promove uma melhor e mais rápida distribuição do sal no queijo. Quando o sal é distribuído sobre os grãos da massa, uma parte se dissolve na umidade da superfície dos grãos, migrando para o seu interior a uma pequena distância. Essa entrada de sal promove uma saída de soro e compostos solúveis e cria uma região de salmoura concentrada em volta de cada partícula. O contato da superfície protéica com a solução concentrada de

salmoura formada na região periférica do grão de massa pode provocar uma contração superficial dessa estrutura (Guinee e Fox, 1987).

#### 2.4.4 Nitrato de Sódio

A utilização do nitrato de sódio em queijos tem por finalidade evitar o estufamento tardio. No Brasil, o uso do Nitrato é permitido em até 50 g para cada 100 litros de leite destinado à fabricação de queijo, (Brasil 1997b).

A habilidade dos microrganismos em reduzir o nitrato a nitrito é influenciada por vários fatores do ambiente, incluindo composição do meio, pH, oxigênio dissolvido e período de incubação concentração de nitrato (Swart et al., 1998).

Existem muitas controvérsias sobre a redução do nitrato a nitrito pelas bactérias propiônicas. Esta é uma característica fenotípica extremamente importante nas diferenciações entre as espécies de bactérias lácticas (Cummins e Jhonson, 1991). Kaspar (1982), relatou que todas as espécies de bactérias propiônicas são capazes de reduzir o nitrato a nitrito. Por outro lado, Van Gent-Ruijters, Vries e Stouthamer (1975) relatam estudos com 23 cepas de *P. pentosaceum* das quais apenas 3 cepas foram capazes de reduzir o nitrato a nitrito. Para Cummins e Johnson (1986), outras espécies não foram capazes de reduzir o nitrato, a exceção da *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*.

#### 2.5 Fermentação propiônica

A fermentação do lactato e carboidratos residuais pelas bactérias propiônicas ocorre depois da fermentação láctica, constituindo um estágio vital no processo de maturação dos queijos, principalmente o Suíço (Chapaman e Sharpe, 1981).

As bactérias propiônicas catabolizam a glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas. Essas bactérias podem fermentar o lactato, com produção do piruvato; partindo do piruvato, podem formar o acetato e CO<sub>2</sub>; e pela reação de



## **2.6 Proteólise em queijos**

Segundo Fox (1989), a proteólise pode ser dividida em três fases distintas: 1) no leite, antes da fabricação; 2) na coagulação enzimática do leite e 3) durante a maturação ou armazenamento. A proteólise no leite antes da fabricação pode ter origem na ação de microrganismos, principalmente das enzimas de bactérias psicrófilas e de proteinases naturais do leite, como a proteinase alcalina plasmina (E.C 3.4.21.7). Leites provenientes de animais portadores de mamites podem conter proteinases de leucócitos, que alteram a qualidade e o rendimento de queijos.

A maioria dos queijos obtidos por coagulação enzimática do leite são maturados. Na maturação, há alterações bioquímicas nos principais constituintes dos queijos, como proteínas, gordura e lactose residual. Os compostos principais resultantes dos fenômenos de proteólise e responsáveis pelas características de flavor são: peptídeos, aminoácidos, aminas, ácidos, tióis, tioésteres, ácidos graxos, metil-cetonas, lactonas, ácidos orgânicos, dióxido de carbono e álcoois (Fox e Law, 1991). A hidrólise de proteínas, com a consequente perda da estrutura protéica original, é o principal responsável pelas alterações nas propriedades reológicas dos queijos (Grappin, Ranck e Olson, 1985).

A degradação das matérias protéicas dos queijos (proteólise) é o resultado de várias atividades enzimáticas, sendo que os principais contribuintes são o coalho, proteinases e peptidases do fermento láctico e/ou da flora natural do leite e enzimas naturais do leite (Fox e Law, 1991). Todos estes agentes têm ação proteolítica sinérgica sobre a caseína, podendo o processo ser considerado como uma quebra em cadeia (Desmazeaud e Gripon, 1977; Fox e Law, 1991).

### **2.6.1 Métodos para avaliação da proteólise em queijos**

Venema, Herstel e Elenbaas (1987) definiram grau de maturação como sendo a extensão da degradação protéica em um queijo produzido e estocado sob

condições definidas. Os índices proteolíticos podem ser avaliados através da utilização de técnicas objetivas, como precipitação fracionada (com ácidos ou solventes), eletroforese, cromatografia, espectrofotometria, e métodos subjetivos como provas sensoriais.

A precipitação fracionada oferece a base de métodos rápidos e simples para quantificação das proteínas do queijo, tomaram-se solúvel pela ação de enzimas proteolíticas. Gripon et al. (1975) descreveram técnicas de fracionamento do nitrogênio em extrato de queijo preparado com citrato de sódio 0,5 M, utilizando precipitações com ácido clorídrico e com ácido tricloroacético.

Em 1977, Desmazeaud e Gripon realizaram estudos cromatográficos da fração solúvel em pH 4,6 e determinaram que esta continha, principalmente, compostos de massa molecular elevada, sendo que 28% dos peptídios eram moléculas com massa molecular menor que 3000; 50% estavam entre 3000 e 5000 e 20% eram superiores a 5000. Para determinação de peptídios de baixo e médio peso molecular, tem sido empregado o ácido tricloroacético (TCA) em concentrações de 2 a 12% (Fox, 1989). Yvon, Chabanet e Pelissier (1989) realizaram o fracionamento dos resíduos obtidos do uso do TCA e verificaram que os peptídios solúveis em TCA 12% continham de 2 a 20 resíduos de aminoácidos, enquanto os insolúveis continham de 10 a 65 resíduos, sendo que, todos os peptídios contendo menos do que sete resíduos de aminoácidos foram solúveis. Com estes resultados, os autores apresentam uma hipótese para o mecanismo de solubilidade no TCA: o aumento no número de resíduos de aminoácidos e na massa molecular dos peptídios não apresenta boa correlação com a solubilidade em TCA 12%. A principal característica correlacionada com a solubilidade em TCA 12% foi o aumento na hidrofobicidade superficial acessível dos peptídeos. O fracionamento do nitrogênio solúvel utilizado como índice de maturação pode ser resumido na tabela 1.

TABELA 1 Composição das frações de nitrogênio solúvel usadas como índice de maturação de queijos.

Índice	Composição
N solúvel (água, solução salina, pH 4,6)	proteínas, peptídios, aminoácidos
N não protéico (solúvel em TCA e álcool)	peptídios e aminoácidos
N solúvel em SSA	peptídios muito pequenos, aminoácidos
N solúvel em PTA e N solúvel em ác. Picrico	peptídios muito pequenos, aminoácidos

SSA= ácido sufosalicílico; PTA= ácido fosfotungstico

Fonte: Law, 1987.

### 2.6.2 Índice de extensão e profundidade da proteólise

O avanço da proteólise em queijos pode ser mensurado através de índices chamados de "extensão" e "profundidade". Extensão da proteólise é caracterizada pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis (NS) acumuladas durante o processo de maturação, é expressa como porcentagem do nitrogênio total e também conhecida como índice de maturação. Pode-se afirmar que extensão da proteólise em queijos é a ação proteolítica do coalho sobre as caseínas, principalmente nas frações  $\alpha$  e  $\beta$ , que elevam o teor de peptídeos de médio e baixo peso molecular que compõem o nitrogênio solúvel (Choisy et al., 1984).

A determinação analítica da extensão da maturação é baseada na precipitação isoeletrica da caseína a pH 4,6 em uma amostra diluída de queijo e quantificação das substâncias solúveis através do método de Kjeldahl (Wolfschoon-Pombo e Lima, 1989).

$$\text{Extensão} = \frac{\text{NS} \times 100}{\text{NT}}$$

Profundidade da proteólise diz respeito às substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, acumuladas durante o processo de maturação, tendo como compostos característicos: aminoácidos, oligo-peptídeos, aminas, entre outros. A quantificação da profundidade pode ser obtida pelo teor de nitrogênio não protéico (NPN), que são aqueles solúveis em ácido tricloroacético (TCA) a 12%, ou pela determinação direta do aminoácido produzido e expresso como percentual de proteína solúvel total (Wolfschoon-Pombo e Lima, 1989).

$$\text{Profundidade} = \frac{\text{NNP} \times 100}{\text{NT}}$$

O índice de profundidade de proteólise é relacionado à atividade do fermento. As proteinases e peptidases do fermento atuam sobre os peptídios, principalmente aqueles liberados devido à ação do coalho, produzindo compostos de baixo peso molecular e aumentando o nitrogênio solúvel em TCA 12% (Farkey e Fox, 1990; Choisy et al., 1984).

Dados experimentais em queijos Minas Frescal fabricados com ácido láctico e fermento láctico mostram que os fabricados com fermento apresentam extensão e profundidade da proteólise maiores que aqueles fabricados com ácido láctico (Wolfschoon-Pombo e Lima, 1989).

### 2.6.3 Índice de tirosina e triptofano

Outro método tradicional para avaliação da maturação em queijos é a determinação espectrofotométrica dos aminoácidos tirosina e triptofano. A liberação destes aminoácidos é uma consequência da ação das enzimas do coalho e do fermento (Fox, 1988). A presença de anel benzênico na estrutura

destes aminoácidos e sua capacidade de determinação em espectrofotômetro em comprimento de onda de 270 e 290 nm tornam sua quantificação um método simples e eficiente de determinação de índice de proteólise em queijos. Os valores obtidos com a determinação espectrofotométrica do aminoácido tirosina normalmente apresentam a mesma tendência daqueles dos índices de extensão e profundidade da maturação em queijos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Queijos Parmesão foram fabricados em três dias alternados, sendo cada dia uma repetição. Para cada fabricação foram utilizados 1500 litros de leite de boa qualidade, selecionado, padronizando o teor de gordura para 2,6%. O leite foi pasteurizado pelo processo HTST (placas) 72°C por 15 a 20 segundos e resfriado para 32°C. A seguir foi inoculado com  $10^4$  ufc/ml, de bactérias propiônicas comercial, PS1 (Christian Hansen). O leite inoculado foi dividido em duas porções de 750 litros cada, sendo uma adicionada de 20 gramas de nitrato de sódio para cada 100 litros de leite e a outra porção não recebendo o nitrato de sódio. Com essas duas porções de leite, com e sem nitrato de sódio, foram fabricados os queijos Parmesão segundo método proposto por Furtado e Lourenço Neto (1994), como pode ser visto no fluxograma Figura 1.

A fabricação dos queijos foi realizada nas instalações da Cooperativa Agropecuária Alto Rio Grande, na cidade de Lavras MG e as análises feitas nos laboratórios de laticínios, microbiologia e de físico-química de alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

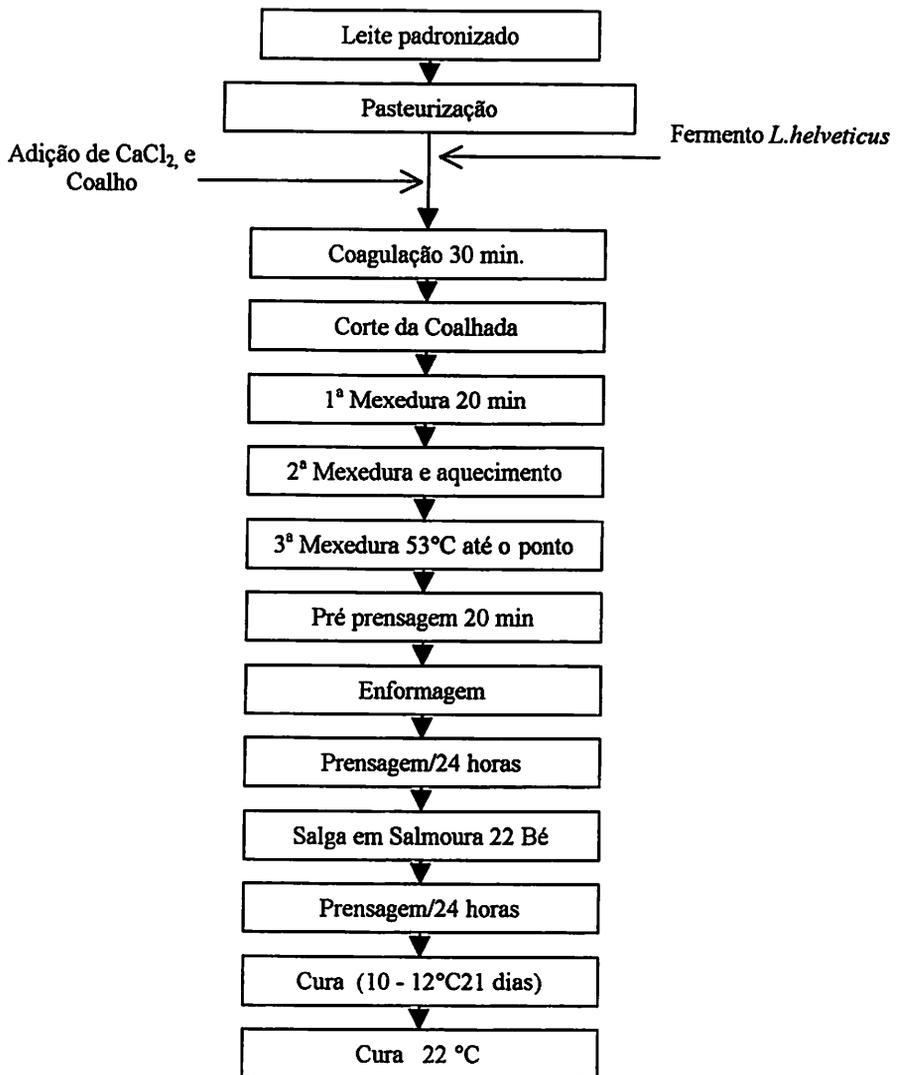


FIGURA 1 Fluxograma de fabricação do queijo Parmesão.

Logo após o ponto, as massas obtidas dos dois tratamentos foram divididas em 3 partes iguais antes da pré-prensagem, e cada uma dessas partes recebeu o seguinte tratamento:

1 - A massa foi pré-prensada diretamente como na fabricação convencional de queijo Parmesão. O peso utilizado na pré prensagem foi equivalente ao dobro do peso da massa por 20 minutos a seguir, a massa foi enformada em formas de 5 Kg e prensada por 24 horas, com viragens a cada 3 horas durante todo o tempo de prensagem;

2 - A massa foi adicionada de 2% de sal (NaCl) em relação ao peso estimado, incorporado manualmente. A seguir, a massa foi pré-prensada com peso equivalente ao dobro do de seu por 20 minutos e enformada em formas de 5 kg, sendo finalmente prensada por 24 horas, com viragens a cada 3 horas durante todo o tempo de prensagem;

3 - A massa foi adicionada de 5% de sal (NaCl), em relação ao peso estimado de massa, sendo incorporado manualmente. A seguir foi pré-prensada com peso equivalente ao dobro do seu, por 20 minutos e enformada em formas de 5 kg, sendo finalmente prensada por 24 horas, com viragens a cada 3 horas durante todo o tempo de prensagem.

Na Figura 2 é mostrado o esquema de condução desse trabalho.

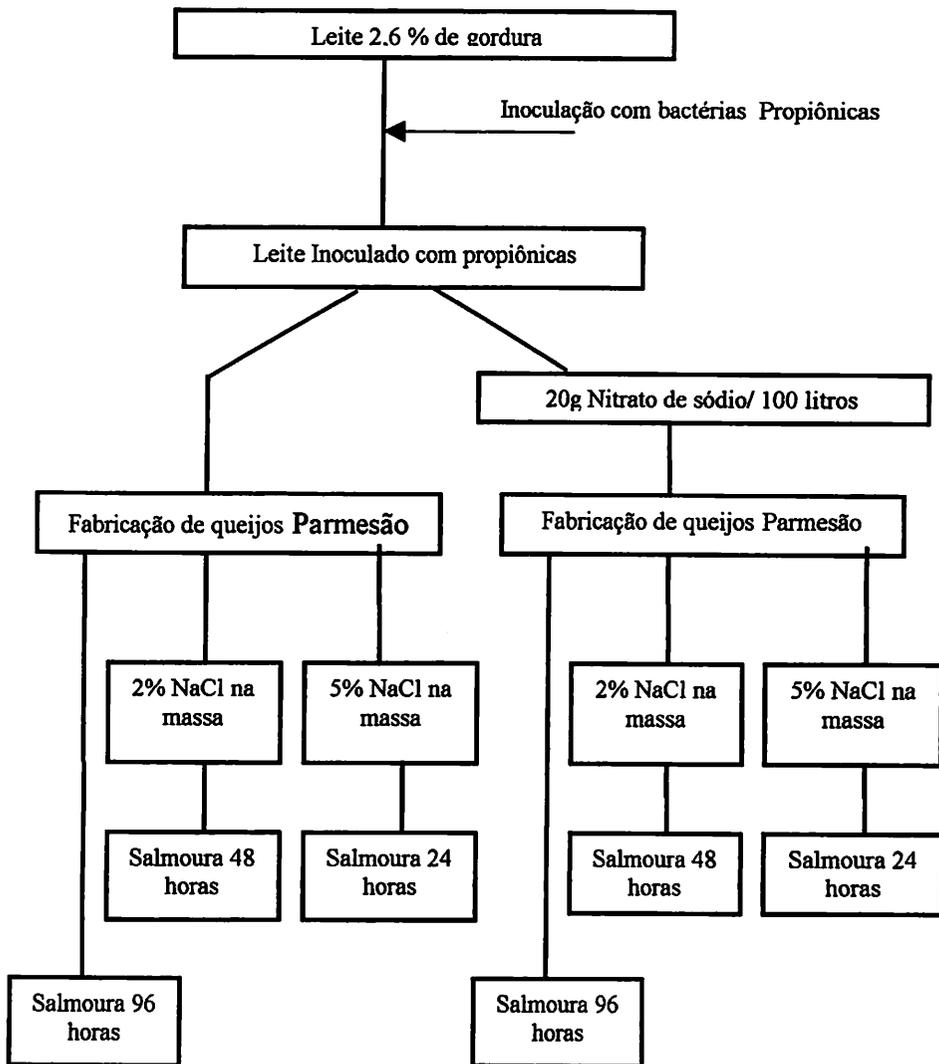


FIGURA 2 Fluxograma de condução do experimento

Os queijos, ao saírem da salmoura, foram transferidos para uma câmara fria com temperatura de 10-12°C e umidade relativa de 85%, onde permaneceram por 24 horas, para secagem. Após a secagem, os queijos foram transferidos para outra câmara fria com temperatura de  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 85%, permanecendo por 21 dias. Após esse tempo, foram transferidos

para outra câmara fria com temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de 85%, onde permaneceram por 90 dias. A cada tempo de análise (7; 30; 60 e 90 dias), foi retirado um queijo de cada tratamento e repetição para que fossem efetuadas as análises. Cada queijo foi partido de forma a mostrar a parte interna para o levantamento fotográfico e amostragens para as demais análises.

### **3.1 Inoculação do leite com bactérias propiônicas**

Após a padronização, pasteurização e resfriamento, o leite foi inoculado com a cultura de bactérias propiônicas comercial, PS1, da CHR Hansen, em quantidade tal que apresentasse no leite uma concentração de  $10^4$  ufc/ml.

### **3.2 Análises realizadas no leite antes da inoculação com bactérias propiônicas**

- Acidez Dornic segundo método preconizado pelo LANARA (Laboratório Nacional de Referência Animal) (Brasil, 1981).
- Teor de Gordura segundo método Gerber (Brasil, 1981).
- pH utilizando pHmetro Hanna 8314 previamente calibrado.
- Extrato Seco Total pelo método gravimétrico, segundo método preconizado pelo LANARA (Brasil, 1981).
- Densidade com a utilização do termolactodensímetro de Quevenne e corrigida para  $15^{\circ}\text{C}$ , segundo LANARA, Laboratório Nacional de Referência Animal, (Brasil, 1981).
- Contagem de microrganismos mesófilos totais, segundo método preconizado pela ABNT, (1991).

### **3.3 Análises realizadas no leite inoculado com bactérias propiônicas**

- Contagem de bactérias propiônicas segundo método descrito por Carvalho (1994).

O meio utilizado foi LGA (Lithium Glicerol Agar) com seguinte composição:

Peptona Pancreática	10g
Extrato de Levedura	10g
Lactato de Lítio	10g
Leite em pó desnatado	1g
Monhidrogenofosfato monobásico ( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ) 328g/L	1 mL
Sulfato de magnésio ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) a56g/L	1mL
Glicerol	6g
Solução Púrpura de Bromocresol	10mL
Água destilada	990mL

Preparo da solução de púrpura de bromocresol:

Púrpura de bromocresol	0,5g
Etanol 96 GL:	3mL
Água destilada	100mL

O pH foi ajustado para  $7,0 \pm 0,2$  e a seguir foi esterilizado a  $121^\circ C/15$  minutos. A incubação foi feita em anaerobiose a  $30^\circ C$  por 6 dias e em aerobiose por 2 dias. A contagem foi feita considerando as colônias que amarelas.

### 3.4 Análises realizadas nos queijos

Os queijos foram amostrados e analisados nos seguintes tempos após a fabricação: 7; 30; 60 e 90 dias.

- **pH:** foi medido com a utilização de pHmetro Hanna 8314 previamente calibrado e com eletrodo de penetração;

- **Nitrogênio Total, NT; Nitrogênio solúvel a pH 4,6, NS; Nitrogênio Não Protéico, NNP:** foram determinados pelo método de Kjeldahl, segundo técnica descrita por AOAC (1995).
- **Tirosina:** pelo método proposto por (Vakarelis e Price, 1959).
- **Cloreto de sódio:** foi utilizado o método de titulação com tiocianato de potássio a 0,1N (AOAC, 1995). Para determinar o gradiente de sal no queijo, foi extraído um filete, com uma sonda, do exterior ao centro. Nesse filete foi determinado o teor de sal a cada um cm, sendo a letra “A” a faixa mais externa e “F” a faixa mais central do queijo.
- **Contagem de microrganismos mesófilos totais,** segundo método preconizado pela ABNT, (1991).
- **Contagem de bactérias propiônicas** segundo método descrito por (Carvalho, 1994).
- **Umidade** foi determinada pelo método gravimétrico (AOAC, 1995).
- **Documentação fotográfica:** Foram feitas fotografias dos queijos cortados ao meio para verificação visual do interior, corpo e textura.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Matéria-prima

A qualidade do leite é de importância indiscutível na qualidade final de qualquer derivado. A Tabela 2 apresenta as características físico-químicas e microbiológicas do leite empregado para a fabricação dos queijos Parmesão deste trabalho.

Os resultados das análises físico-químicas do leite (Tabela 2) mostram que este atendeu às exigências da legislação brasileira para leite de indústria, atendendo, portanto, aos requisitos tecnológicos para fabricação do queijo Parmesão.

Os resultados negativo para a prova de fosfatase alcalina e positivo para a prova de peroxidase demonstram a eficiência do processo de pasteurização utilizado. A contagem de microrganismos mesófilos totais do leite foi baixa. Essa carga microbiana, juntamente com a eficiente pasteurização, são a demonstração de que o leite utilizado na fabricação dos queijos Parmesão possuía qualidade adequada.

A contagem de bactérias propiônicas apenas confirma o número que foi inoculado,  $10^4$  ufc/ml no leite. Observa-se que a contagem de mesófilos totais do leite após a inoculação com bactérias propiônicas não foi aumentada significativamente. Embora as bactérias propiônicas tenham como temperatura ideal de crescimento na faixa mesofílica, elas não crescem bem em meio de ágar padrão e aerobiose, condições estas usadas na contagem de mesófilos totais (Cummins e Johnson 1991).

TABELA 2 Características físico-químicas e microbiológicas do leite utilizado na fabricação dos queijos Parmesão <sup>1</sup>.

<b>Características físico-químicas</b>	<b>Resultados</b>
Densidade	1,0373
Gordura (% m/v)	2,66
Acidez (°Dornic)	16
Extrato Seco Total - EST (% m/v)	11,82
Extrato Seco Desengordurado – ESD (% m/v)	9,16
Crioscopia °Hortvet	- 0,535
Fosfatase Alcalina	Negativo
Peroxidase	Positivo
<b>Características microbiológicas</b>	
Contagem de mesófilos totais (antes da inoculação com bactérias. propiônicas) (ufc/g)	1,31 x 10 <sup>4</sup>
Contagem de mesófilos totais (após a inoculação com bactérias. propiônicas) (ufc/g)	1,7 x 10 <sup>4</sup>
Contagem de bactérias propiônicas (ufc/g)	1,9 x 10 <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Resultados médios de três repetições.

#### 4.2 Bactérias propiônicas nos queijos Parmesão

A Figura 3 mostra a variação na concentração de bactérias propiônicas ao longo dos 90 dias de cura dos queijos Parmesão fabricados com e sem adição de 20 gramas de nitrato de sódio para cada 100 litros de leite. Os dados demonstram que a utilização do nitrato de sódio pouco interferiu no desenvolvimento das bactérias propiônicas, sendo que, o sétimo dia, sua população manteve na ordem de 10<sup>4</sup> ufc/g em todos os tratamentos, ou seja, no

mesmo ciclo logarítmico que foi inoculado ao leite antes da fabricação. Isso pode ser explicado pelo fato, de que nesse período, além de pouco substrato (lactato) no meio, essas bactéria ainda estavam em fase de adaptação, já que o inóculo utilizado foi cultura concentrada liofilizada para uso direto.

A capacidade de redução do nitrato pelas bactérias propiônicas ainda não é um fato completamente elucidado. Alguns autores (Swart et al., 1998; Kaspar 1982.) relatam resultados de trabalhos indicando que essas bactérias possuem atividade redutora. Outros autores (Van Gent-Ruijters, Vries e Stouthamer, 1975; Cummins e Johnson 1991) argumentam que essa atividade é dependente de fatores fenotípicos, ambientais e que nem todas as espécies possuem esta capacidade, à exceção da *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*.

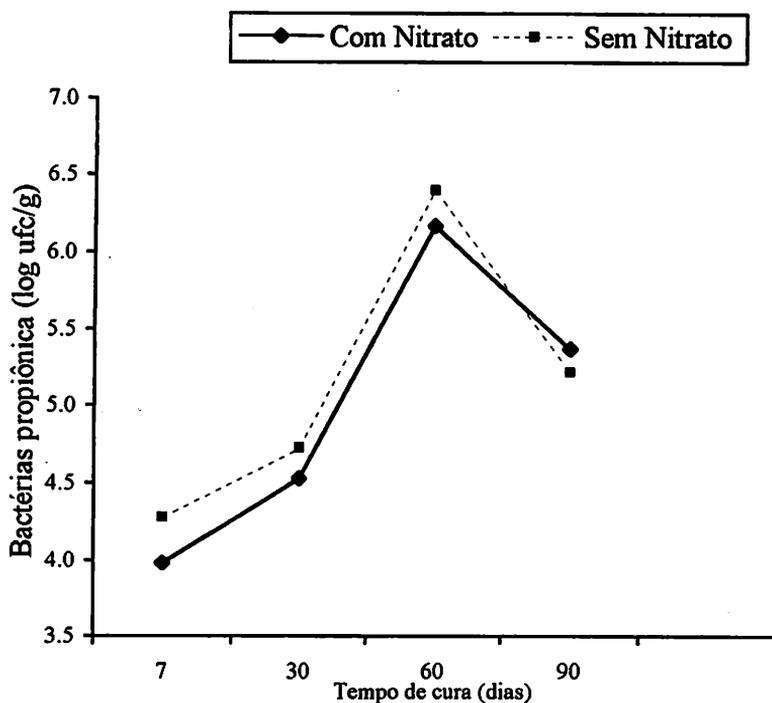


FIGURA 3 Variação da concentração de bactérias propiônicas em queijos Parmesão fabricados com diferentes concentrações de nitrato de sódio ao longo do tempo de cura

O efeito do nitrato de sódio sobre o desenvolvimento de bactérias propiônicas pode ser também ilustrado pelas fotografias (Figura 4), que mostram a presença de olhaduras características dessas bactérias no interior dos queijos Parmesão fabricados com e sem nitrato. Essas fotografias dos queijos aos 60 dias de cura confirmam os dados da Figura 1, quando foi encontrada a maior contagem de bactérias propiônicas nos queijos de todos os tratamentos.



Sem nitrato de sódio



Com nitrato de sódio

FIGURA 4 Queijos Parmesão aos 60 dias de cura, fabricados com e sem nitrato de sódio.

A Figura 5 mostra as contagens de bactérias propiônicas nos queijos Parmesão que receberam 0, 2 e 5% de cloreto de sódio (NaCl) direto na massa. Observa-se que até o trigésimo dia de cura, o desenvolvimento dessas bactérias foi muito semelhante para todos os tratamentos. Já aos 60 dias a, diferença das contagens de bactérias propiônicas entre os queijos salgados e não salgados na massa foi muito evidente, chegando a zero nos queijos tratados com 5% de sal. Nesse período, o efeito do NaCl sobre o crescimento de bactérias propiônicas foi bastante evidente.

Nos queijos adicionados de 2% de NaCl, a redução total só aconteceu aos noventa dias; entretanto, a contagem apresentada aos 60 dias não foi suficiente para promover a formação de olhaduras, conforme pode ser visto na

Figura 4. Ressalta-se, ainda, que nos queijos não tratados com sal (NaCl), aos 60 dias de cura apresentaram contagem significativamente maior do que os queijos tratados. Isso confirma dados da literatura sobre a baixa resistência das bactérias propiônicas ao cloreto de sódio (CARVALHO, 1994; Carcano et al., 1995).

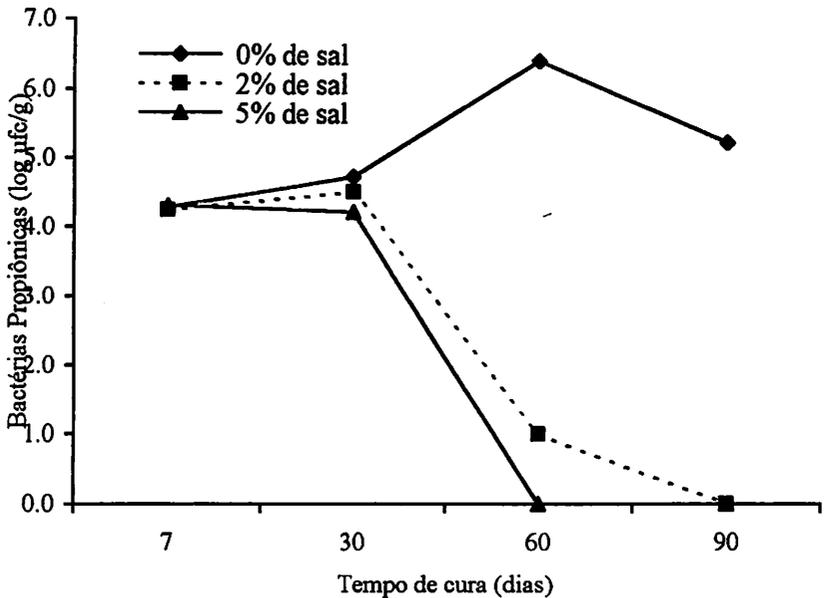


FIGURA 5 Bactérias propiônicas em queijos Parmesão adicionados de diferentes concentrações de sal (NaCl) na massa, durante o tempo de cura.

A Figura 6 apresenta fotografias dos queijos Parmesão salgados com 2 e 5% de cloreto de sódio (NaCl) na massa, aos 60 dias de cura. Observa-se que os queijos desses tratamentos não apresentam olhaduras propiônicas características como as presentes nos queijos da Figura 4, o que confirma os dados da Figura 5. Mesmo apresentando um certo número de bactérias Propiônicas nos queijos

tratados com 2% de cloreto de sódio (NaCl), essa quantidade de bactérias pode não ter sido o suficiente ou não ter encontrado ambiente favorável para fermentação e produção de CO<sub>2</sub>. Os queijos salgados na massa com 5% de sal (NaCl), nesse mesmo tempo, já não apresentavam bactérias propiônicas.

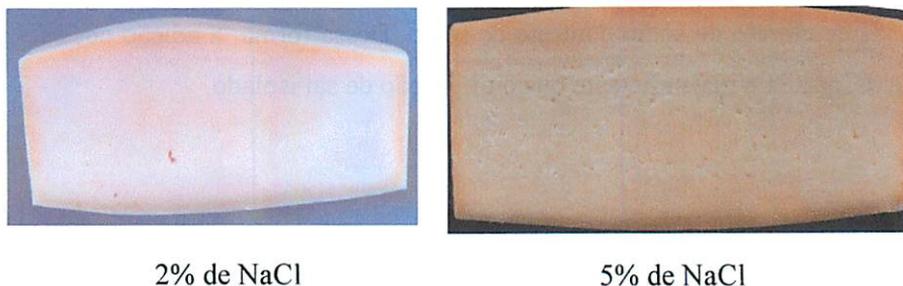


FIGURA 6 Queijos Parmesão com 60 dias de cura, salgados com diferentes concentrações de cloreto de sódio na massa .

A contagem de bactérias Propiônicas nos queijos Parmesão fabricados com nitrato de sódio e 0,2 e 5 % de cloreto de sódio (NaCl) na massa é mostrada na Figura 7. Comparando os dados das Figuras 3, 5, e 7, observa-se que a combinação de cloreto de sódio mais nitrato causou maior redução na contagem de bactérias propiônicas nos queijos. Esse efeito foi mais evidente aos 60 dias, quando a contagem dessas bactérias sofreu uma forte redução.

Verifica-se que nos queijos tratados apenas com o cloreto de sódio, aos trinta dias de cura, nos três tratamentos 0, 2 e 5% de NaCl (Figura 5), as contagens de bactérias Propiônicas foram muito próximas entre os tratamentos ( $10^4$  ufc/g). Na Figura 7 (tratamentos nitrato mais sal), observa-se alteração na contagem de  $10^4$ ,  $10^2$  e  $10^1$  ufc/g para os tratamentos 0, 2 e 5%, respectivamente, demonstrando, assim, uma significativa redução na contagem de bactérias Propiônicas quando se utilizou o nitrato e cloreto de sódio.

Esses dados indicam que a combinação cloreto de sódio/nitrato de sódio é mais eficiente no controle de bactérias propiônicas do que um dos sais isoladamente. Isso pode ser melhor visualizado comparando as contagens de bactérias propiônicas dos três tratamentos, nas Figuras 5 e 7, aos 60 dias. Observa-se que houve significativa redução da contagem nos queijos tratados com 2 % de cloreto de sódio e zero de bactérias propiônicas nos queijos tratados com 5% de cloreto de sódio e nitrato de sódio. Dessa forma, a adição dos sais de forma associada é mais eficiente que a utilização de sal isolado.

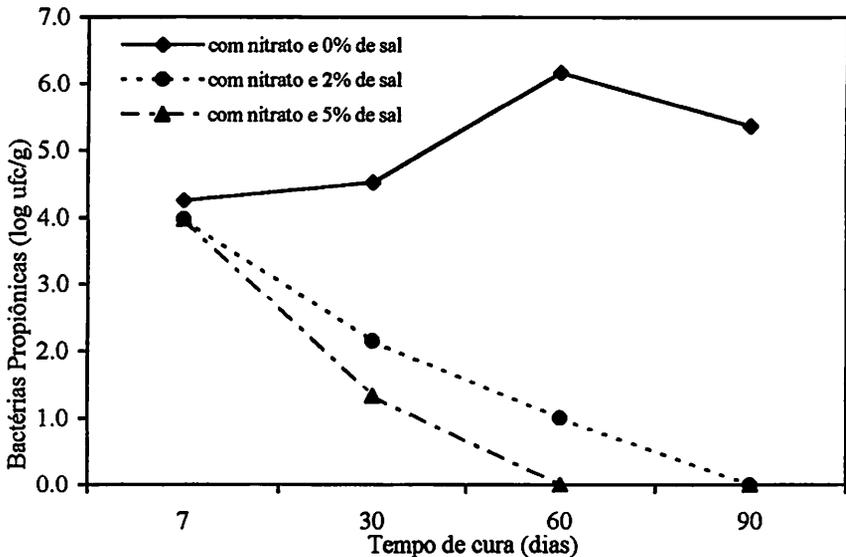


FIGURA 7 Bactérias propiônicas em queijos Parmesão fabricados com 20 g de nitrato de sódio para cada 100 litros de leite e diferentes concentrações de sal (NaCl) na massa.

### 4.3 Variação no pH dos queijos Parmesão

Na Figura 8 encontram-se as curvas de evolução do pH nos queijos fabricados com leite adicionado de nitrato de sódio e dos queijos fabricados sem esse sal mais 5% de sal na massa. Observa-se que o pH dos queijos com nitrato se manteve mais alto ao longo da cura, enquanto nos queijos fabricados sem o nitrato de sódio apresentaram um pH menor. Esse efeito pode ser devido a uma maior inibição das bactérias do fermento pela combinação dos dois sais nitrato e cloreto de sódio.

O pH dos queijos logo após a fabricação tende a abaixar graças à ação das bactérias lácticas do fermento, fermentando a lactose e liberando ácido láctico no meio. A atividade das bactérias do fermento no queijo pode sofrer interferência de alguns fatores, como inibidores ou bacteriostáticos, presentes no queijo. A utilização de cloreto de sódio em queijos, além da função de sabor interfere no crescimento microbiano. O nitrato de sódio, utilizado com o objetivo de prevenir o estufamento tardio em queijos pode também inibir o crescimento de bactérias lácticas (Abreu, 1986; Carcano et al., 1995).

Mesmo tendo sofrido uma ligeira elevação do pH nos queijos fabricados com nitrato, conforme ilustrado pela Figura 8, esses valores se mantiveram próximo a faixa normal, de pH, para esse tipo de queijo. Assim, deve-se ter cuidado para que a combinação de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) e cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) não interfira nos processos de maturação do queijo, de forma a prejudicar a qualidade final dos queijos.

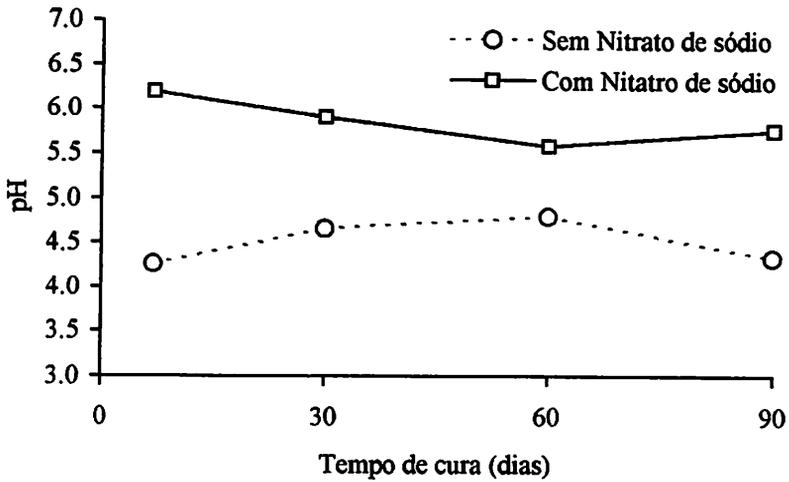


FIGURA 8 pH em queijos Parmesão fabricados com e sem nitrato de sódio e adicionado de 5% de sal (NaCl) na massa, durante o período de cura.

#### 4.4 Indicadores de maturação dos queijos

##### 4.4.1 Índice de extensão de maturação

A extensão de maturação expressa a relação de material nitrogenado solúvel (NS) acumulados no queijo durante o processo de maturação, sendo esse índice expresso como porcentagem do nitrogênio total (NT). Segundo Choisy et al. (1984), a extensão de maturação está ligada mais diretamente à ação das enzimas do coalho sobre as caseínas. Essa ação acontece principalmente sobre as frações  $\alpha$  e  $\beta$ , elevando a concentração de peptídios de médio e baixo peso molecular no queijo.

Na Figura 9 pode ser observada a evolução dos índices de extensão de maturação dos queijos parmesão fabricados com e sem nitrato e 0, 2 e 5% de sal (NaCl) na massa, durante 90 dias de cura.

Nos queijos tratados apenas com nitrato (0% de NaCl) o índice extensão de maturação tendeu a ser maior, enquanto os queijos tratados com nitrato e 5%

de NaCl tiveram o menor índice de extensão de maturação, mesmo se comparado ao tratamento 5% sal e sem nitrato. Isso indica uma tendência de que a combinação nitrato/cloreto de sódio pode ter interferido na velocidade de maturação dos queijos. Dessa forma, o uso desses dois sais deve ser rigorosamente controlados para evitar o comprometimento da maturação dos queijos. No tratamento com 2% de sal (NaCl) e nitrato de sódio, houve uma pequena redução do índice de extensão de maturação, comparado ao mesmo teor de sal (NaCl) e sem o nitrato de sódio.

Fazendo-se uma observação geral da Figura 9, pode-se dizer que há uma tendência de redução no índice de extensão de maturação nos queijos tratados com a associação cloreto/nitrato de sódio, quando comparados com os queijos tratados apenas com um desses sais.

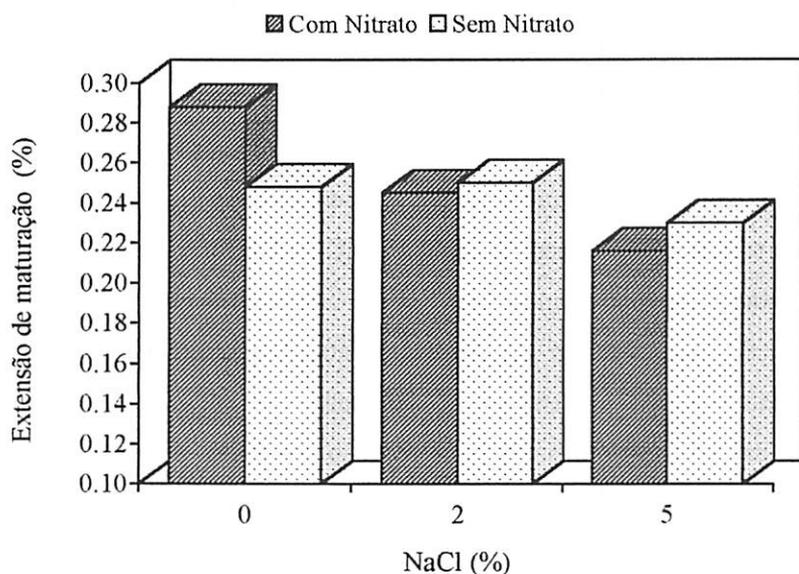
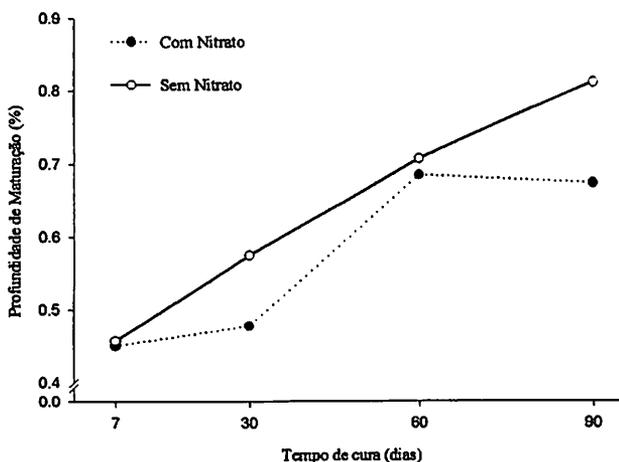


FIGURA 9 Índice de extensão de maturação de queijos Parmesão durante 90 dias de cura, fabricados com e sem nitrato de sódio e diferentes concentrações de sal (NaCl) na massa.

#### 4.4.2 Índice de profundidade de maturação

O índice de profundidade de maturação de queijos expressa o percentual de compostos nitrogenados de baixo peso molecular em relação ao nitrogênio total do queijo. Este índice é diretamente relacionado à ação de enzimas bacterianas que atuam sobre os macropetídeos liberados principalmente pela ação de enzimas do coalho. Essa ação leva à formação de compostos nitrogenados de menor peso molecular, podendo chegar até a aminoácidos, ou seja, quanto maior o índice de profundidade de maturação maior o grau de maturação do queijo (Wolfschoon-Pombo e Lima, 1989; Farkey e Fox, 1990).

A Figura 10 apresenta os resultados de índice de profundidade de maturação em queijos Parmesão fabricados com leite adicionado ou não de nitrato de sódio e salgados com 5% de sal (NaCl) na massa, durante 90 dias de cura. O índice de profundidade de maturação foi maior nos queijos sem nitrato de sódio. Isso pode ser devido à ligeira inibição das bactérias lácticas nos queijos tratados com nitrato de sódio associado ao sal (NaCl). Esses dados podem ser confirmados também pelos resultados de pH apresentados na Figura 8, quando o pH dos queijos tratados com a associação sal (NaCl)/nitrato foi maior do que os dos queijos tratados apenas com o NaCl. Esse comportamento pode ter sido devido à inibição das bactéria do fermento láctico, que ao reduzirem sua atividade, reduzem, conseqüentemente, a quantidade de enzimas proteolíticas e/ou peptidolíticas no meio, causando uma redução nos níveis de maturação dos queijos. Dados semelhantes foram encontrados por Kristiansen et al. (1999), levando os autores a afirmar que o cloreto de sódio reduz a atividade de água, e conseqüentemente, o crescimento bacteriano e o grau proteólise. Entretanto Abreu (1986) comenta que o uso do nitrato de sódio no leite para fabricação de queijos pode, além de prevenir o estufamento tardio, inibir bactérias do fermento láctico, principalmente na presença de alta concentração de sal (NaCl).



**FIGURA 10** Índice de profundidade de maturação de queijos Parmesão fabricados com leite adicionados de nitrato de sódio e 5% de sal (NaCl) durante o período de cura.

#### 4.4.3 Aminoácidos tirosina e triptofano

A liberação dos aminoácidos tirosina e triptofano no queijo é uma consequência da ação de enzimas do coalho, principalmente, e também enzimas microbianas sobre as proteínas e peptídeos do queijo. Sendo que sua presença em maior ou menor quantidade pode indicar o grau de maturação do queijo. A Figura 11 mostra a evolução dos índices de tirosina e triptofano em queijos fabricados com nitrato de sódio e salgados na massa com 0 e 5% de sal (NaCl). Observa-se que o índice de tirosina aumentou nos queijos não tratados com cloreto de sódio na massa em relação aos queijos tratados com 5% desse sal, indicando o efeito do cloreto de sódio sobre a maturação do queijo. O mesmo comportamento é observado para o aminoácido triptofano, embora essa diferença tenha ocorrido com menor intensidade.

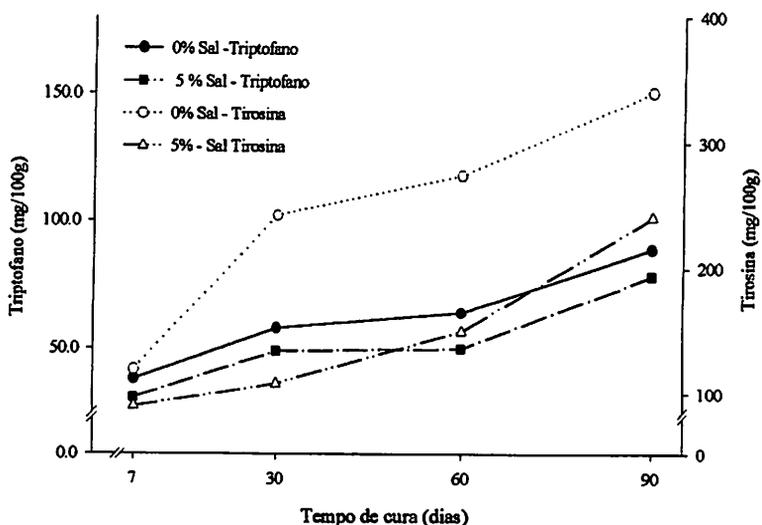


FIGURA 11 Índice de tirosina e triptofano em queijos Parmesão fabricados com nitrato de sódio e salgados na massa com 5% de NaCl, durante 90 dias de cura.

Na Figura 12 pode-se comparar a evolução dos índices de profundidade de maturação e triptofano dos queijos fabricados com nitrato de sódio e 5% de sal (NaCl) na massa. Observa-se que o teor de cloreto de sódio influenciou nos dois índices. Tanto o índice de triptofano quanto à profundidade de maturação foram maiores nos tratamentos sem cloreto de sódio. Verifica-se que índice de triptofano foi mais baixo ao longo de toda a cura no tratamento com 5% de sal (NaCl), em relação ao tratamento sem cloreto de sódio, enquanto o índice de profundidade de maturação aumentou de maneira mais acentuada aos 60 dias, reduzindo ligeiramente aos 90. Fica evidente, pelos dados, a tendência de que a combinação nitrato/cloreto de sódio interfere na maturação do queijo, diminuindo a velocidade e intensidade da maturação.

Esses dados são confirmados pela literatura. Segundo Kristiansen et al., (1999); Ardô e Gippon, (1995); Fox, (1988) que diz que o teor de sal dos queijos

interfere diretamente sobre o crescimento de bactérias lácticas, sobre a atividade enzimática e, conseqüentemente, sobre o processo de maturação dos queijos.

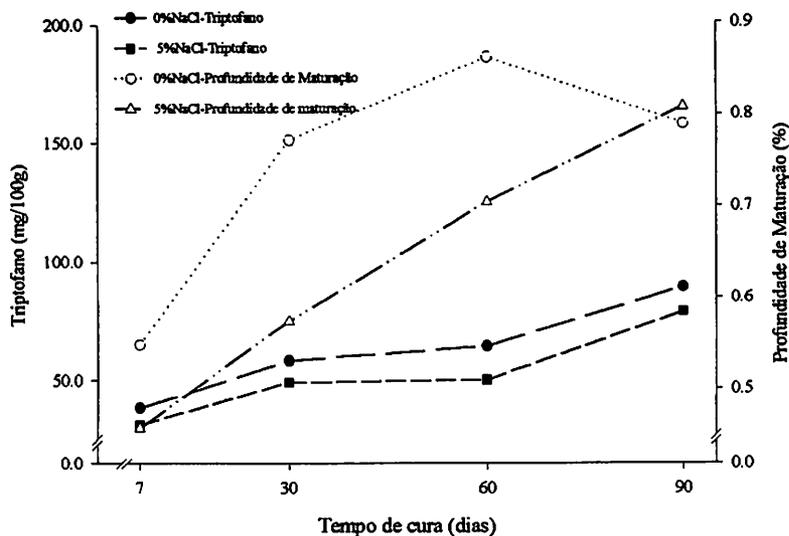


FIGURA 12 Índice de triptofano e profundidade de maturação em queijos Parmesão fabricados com nitrato de sódio e sal (NaCl) na massa durante o período de cura.

Na Figura 13 são apresentadas as curvas dos índices de profundidade de maturação e tirosina ao longo de 90 dias de cura dos queijos Parmesão fabricados com e sem nitrato e 0 e 5% de sal (NaCl) na massa. Nela pode ser visto o efeito do NaCl sobre a liberação de tirosina nos queijos, assim como sobre o índice profundidade de maturação. Comparando os resultados dos queijos não tratados com sal (NaCl) com os queijos tratados, verifica-se que os dois índices, tirosina e profundidade, de maturação foram maiores para os queijos que não foram tratados com esse sal na massa. Esses dados mostram que o aumento do teor de sal no queijo reduziu a liberação de tirosina e,

conseqüentemente, o nível de maturação dos queijos. Os queijos com 0% de sal (NaCl) foram salgados apenas em salmoura. Neste sistema de salga, leva um tempo maior para que o teor de sal se uniformize no queijo deixando o centro do queijo com uma menor concentração enquanto os queijos tratados com o sal na massa já apresentam uma distribuição de sal mais uniforme desde o início da maturação.

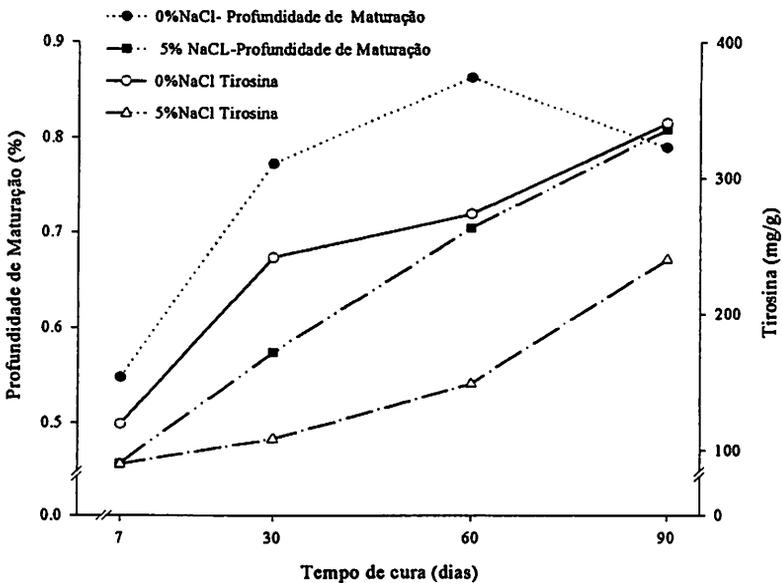


FIGURA 13 Índice de tirosina e profundidade de maturação em queijos Parmesão fabricados com nitrato de sódio e sal (NaCl) na massa, durante o período de cura.

A Figura 14 mostra a evolução dos índices de tirosina e triptofano ao longo de 90 dias de cura dos queijos Parmesão fabricados com e sem nitrato de sódio e salgados na massa com 5% de cloreto de sódio. Observa-se, pelos dois gráficos, que nos queijos fabricados com nitrato os teores de tirosina e triptofano

foram ligeiramente menores do que nos queijos sem esse sal (NaCl). Isso confirma dados anteriores de que a combinação nitrato e maior concentração de cloreto no queijo pode levar a um retardamento do processo de maturação dos queijos. Essa redução pode ser devida a uma inibição das bactérias lácticas do fermento e à própria ação do cloreto de sódio, que, segundo vários autores (Alais, 1991; Lawrence, Creamer e Gilles, 1987; Fox, 1987), reduz a intensidade de maturação de queijos.

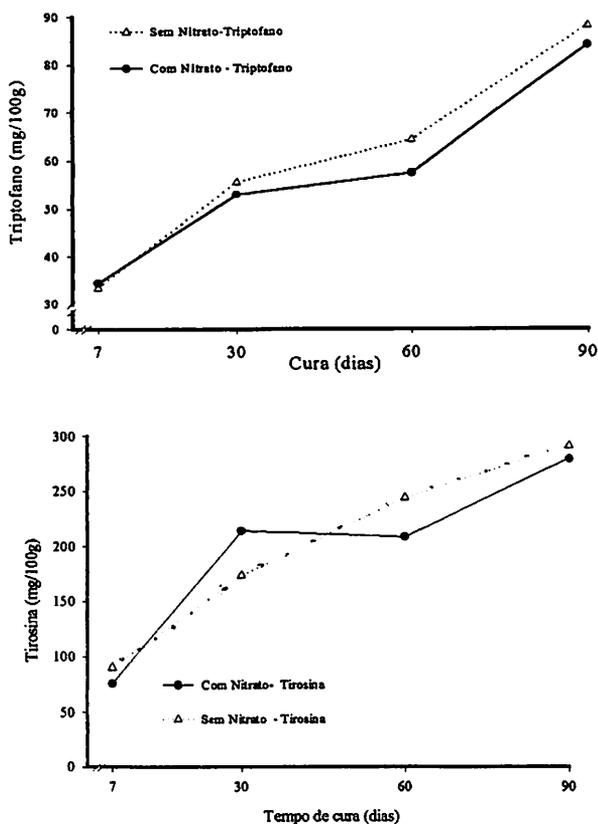


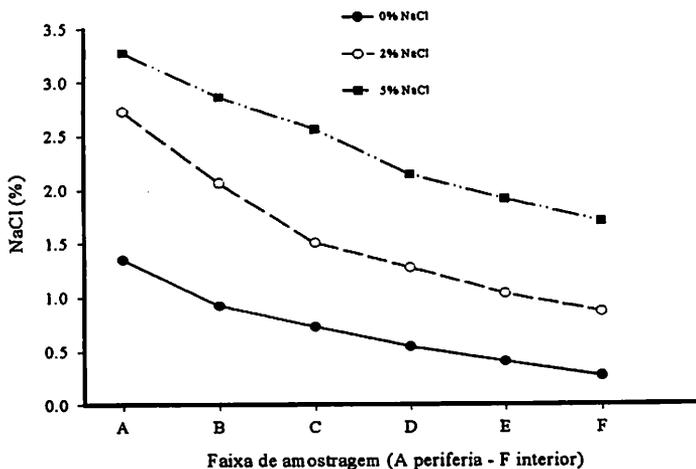
FIGURA 14 Índices de triptofano e tirosina em queijos Parmesão fabricados com nitrato de sódio e salgados na massa com 5% de sal (NaCl).

#### 4.5 Cloreto de sódio nos queijos

A distribuição de sal no queijo é fundamental na definição das características de sabor, além de interferir nos aspectos de crescimento de microrganismos e maturação do queijo. Vários fatores interferem na difusão e gradiente de distribuição de sal nos queijos (Spreer, 1991; Sandri et al., 1995). O formato, o tipo de salga, a temperatura, a umidade são exemplos desses fatores. Farkye e Fox. (1990) afirmam que queijos Gouda salgados em salmoura apresentam, na região próxima à periferia, até 2.28 vezes o teor de sal do centro do queijo.

Foram analisados os teores de cloreto de sódio nos queijos, a cada 1,0 cm da periferia para o centro, sendo a letra “A” correspondente à região da periferia e a “F” à região central. Na Figura 15 são apresentadas as curvas demonstrativas do gradiente de sal (faixas A a F) nos queijos Parmesão salgados com 0, 2 e 5% de cloreto de sódio direto na massa e 96, 48 e 24 horas em salmoura a 20% de sal, aos 7 dias de cura. Os dados mostram que o teor de sal no interior dos queijos (faixa F) salgados na massa com 2 e 5% de sal (NaCl) foi maior do que nos queijos que foram salgados apenas em salmoura (0%). Considerando que o sal nos queijos tem efeito inibidor sobre microrganismos, esse nível mais alto de sal no interior dos queijos desde o início da cura pode explicar o baixo crescimento de bactérias propiônicas nos queijos tratados com sal (NaCl) na massa. Esses resultados estão de acordo os encontrados por Sandri et al., (1995); Carvalho, (1994); Sandri et al., (1995); Richoux, Faivre e Kerjan, (1998), que demonstram que as bactérias propiônicas têm pouca resistência a concentrações de cloreto de sódio.

Essa maior concentração de sal no interior dos queijos desde o início da maturação proporciona maior segurança, considerando o efeito inibidor do sal sobre microrganismos e, em especial, sobre as bactérias propiônicas.



**FIGURA 15** Gradiente de sal (NaCl) em queijos Parmesão salgado em salmoura e direto na massa com 2 e 5% de sal, aos 7 dias de cura.

As fotografias apresentadas na Figura 16 mostram o interior dos queijos tratados e não tratados com sal (0% NaCl), permitindo a visualização de corpo e textura. Observa-se que os queijos sem sal apresentam um considerável número de olhaduras características de bactérias propiônicas. As olhaduras nesses queijos se encontram predominantemente na região central, ou seja, onde está a menor concentração de sal, conforme Figura 15. Essa região de baixa concentração de sal e pouco oxigênio é um ambiente favorável ao desenvolvimento de bactérias propiônicas, que são anaeróbias e pouco resistentes ao sal (NaCl).

Já os queijos tratados com sal (NaCl) na massa apresentaram uma estrutura interna compacta, sem a presença de olhaduras causadas pelo desenvolvimento de bactérias propiônicas. A diferença visual das fotografias, comparadas ao gráfico (Figura 15), confirmam o interior do queijo que não foi salgado na massa (0%) (faixa F) apresenta o menor teor de sal, enquanto os

queijos salgados na massa com 5% de sal apresentaram o maior teor de sal desde os 7 dias de cura. A presença de uma maior ou menor concentração de sal (NaCl) na região central do queijo desde o início da maturação pode determinar se esse queijo apresentará ou não o defeito de estufamento por bactérias propiônicas. A utilização de sal (NaCl) diretamente na massa é uma forma de evitar o desenvolvimento de bactérias propiônicas em queijos, graças à melhor e mais rápida distribuição do sal na massa do queijo.

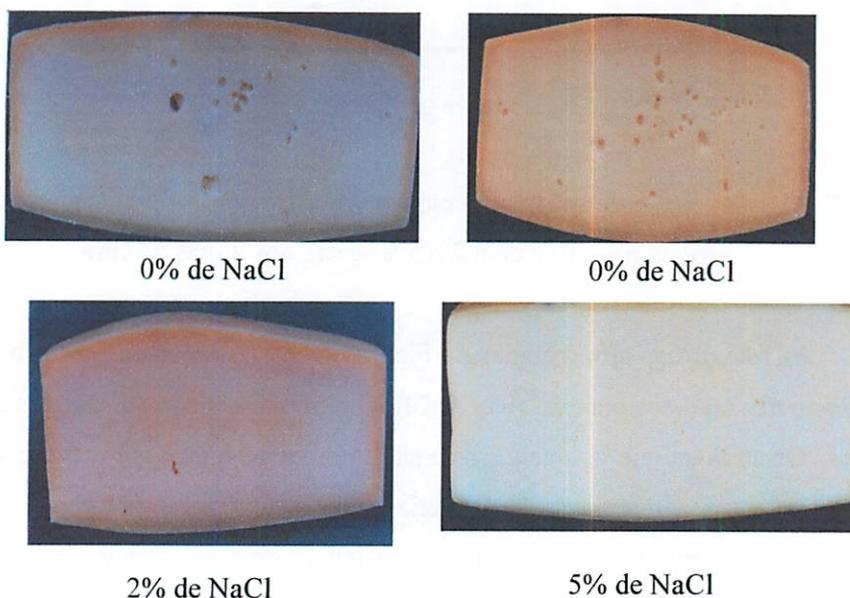


FIGURA 16 Fotografias dos queijos Parmesão salgados na massa com 0, 2 e 5% de sal (NaCl).

Ao longo da cura, é natural a perda de água pelo queijo. A Figura 17 mostra a curva de umidade dos queijos durante de 90 dias de cura. Verifica-se que o queijo apresentava uma umidade de 37,38% aos 7 dias, cai para 31,2% ao final de 90 dias. Como o sal presente no queijo fica dissolvido na água, a sua

redução provoca uma concentração de sal na umidade, tornando o ambiente desfavorável ao crescimento microbiano.

As curvas de teores de cloreto de sódio, nas faixas A e F (região da periferia e central) dos queijos tratados com 5% de NaCl na massa, são mostradas Figura 17. Observa-se que desde os 7 dias, a região da periferia já se apresentava com uma concentração de cloreto de sódio superior à da região central do queijo sendo que a diferença entre os dois tratamentos cai aos 90 dias de cura. A maior diferença na região periférica (faixa A) pode ser devido à maior desidratação que ocorre na região periférica do queijo, comparada com a desidratação da região central. E a dedução da diferença aos 90 dias de cura é devida à melhor distribuição de sal no queijo ao longo do tempo.

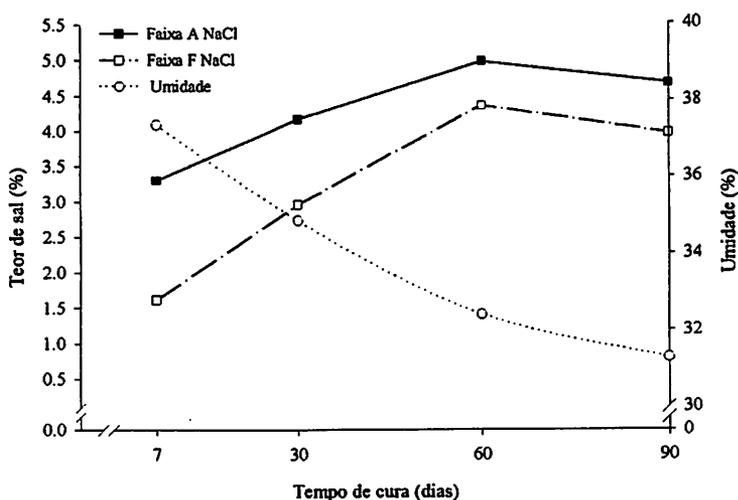


FIGURA 17 Cloreto de sódio na região da periferia (faixa A) e no centro (faixa F) e umidade dos queijos Parmesão salgados na massa com 5% de sal (NaCl).

Comparando a curva de umidade com as dos teores de sal nas faixas A e F aos 7 dias de cura, verifica-se que nesse período a concentração de sal na

região periférica era muito maior (faixa A) do que na região central do queijo (faixa)F; enquanto aos 90 dias essa diferença entre as duas faixas diminuiu. Essa redução da diferença entre os teores de sal (NaCl) na região periférica e da região central pode ser devido à perda de umidade ao longo da cura e à tendência de a concentração de sal no queijo se equilibrar ao longo da cura.

A Figura 18 mostra as curvas com os teores de sal na região central dos queijos salgados em salmoura (0%) e direto na massa com 2 e 5% de sal (NaCl) (faixa F), durante 90 dias de cura. Esses resultados mostram que os queijos salgados diretamente na massa, desde o início da maturação já apresentaram, na região central, um teor de sal maior do que os queijos salgados apenas na salmoura. Esses dados, associados à contagem de bactérias propiônicas (Figura 5), confirmam porque a contagem dessas bactérias reduziu ao longo da cura nesses tratamentos, quando comparados ao tratamento sem a salga na massa. Isso pode ser devido à baixa resistência das bactérias propiônicas a maiores concentrações de sal.

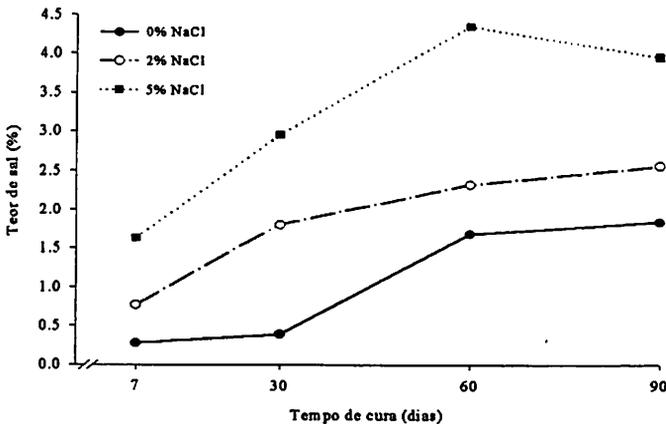


FIGURA 18 Teor de Sal (NaCl) na região central (faixa F) dos queijos salgados na massa com 0, 2 e 5% sal na massa, durante 90 dias de cura.

O processo de salga mais utilizado para queijos Parmesão é o uso de salmoura. Nesse processo, o sal leva um tempo relativamente grande para que migre até a região central do queijo. Durante esse tempo, o ambiente se torna favorável ao crescimento de bactérias propiônicas, que são anaeróbias e exigem lactato como fonte de energia e não toleram altas concentrações de cloreto de sódio, ocorrendo, assim, o seu crescimento e consequente formação de olhaduras como pode ser visto na Figura 16.

A Figura 19 mostra os teores de cloreto de sódio na região periférica (faixa A) dos queijos Parmesão fabricados com e sem nitrato de sódio, durante 90 dias de cura. Observa-se que o nitrato de sódio não afetou a absorção de sal nos queijos. Ao longo da cura, os teores de sal dos queijos com e sem nitrato evoluíram de maneira muito semelhante, embora tenha ocorrido um aumento da concentração de sal nesse período. Esse aumento de concentração nos queijos se deve à perda de umidade durante a cura desses queijos. Como o sal no queijo está dissolvido na fase aquosa, à medida que esta diminui, a concentração aumenta.

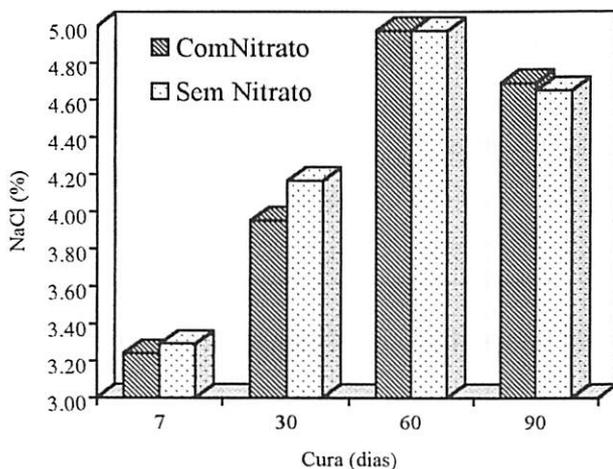


FIGURA 19 Cloreto de sódio na região periférica (faixa A) dos queijos Parmesão fabricados com e sem nitrato de sódio e salgados com 5% de sal (NaCl) na massa, durante 90 dias de cura.

A difusão do sal nos queijos ocorre devido à diferença de pressão osmótica. Quando entra o sal saem a água e substâncias solúveis do interior da massa do queijo. Assim, à medida que aumenta o teor de sal na massa do queijo há uma tendência de para o equilíbrio osmótico, ocorrendo uma redução na velocidade migração de sal no queijo. Essa redução na velocidade de migração de sal no queijo não está bem clara, mas pode ser devida a um aumento de viscosidade da solução que se torna mais um fator de impedimento da difusão de sal nos queijos (Guinee e Fox, 1987). Na Tabela 3 são apresentados dados referentes ao percentual de aumento (absorção) de cloreto de sódio no interior dos queijos (faixa F), entre 7 e 90 dias de cura. Os dados mostram que o aumento de sal (NaCl) nos queijos tratados com 0% de sal na massa foi 4,7 vezes maior que o aumento observado nos queijos salgados com 5% de sal na massa. Essa grande diferença pode ser explicada pela maior diferença de pressão osmótica entre a massa dos queijos salgados na massa e os salgados em salmoura (0%). Observa-se que os queijos salgados na massa com 2% de sal (NaCl) apresentaram um aumento intermediário (235%), ficando entre os tratamentos 0 e 5% de sal.

**TABELA 3** Comparação entre a porcentagem de aumento do teor de sal no interior (faixa F) dos queijos Parmesão tratados com 0,2 e 5 % de cloreto de sódio, entre 7 e 90 dias de cura <sup>1</sup>.

<b>Tratamentos (% sal na massa)</b>	<b>% de aumento do teor de sal (NaCl)</b>
0	678
2	235
5	144

<sup>1</sup> Resultados médios de 3 de repetições.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais pode-se concluir que:

- A adição de sal (NaCl) à massa do queijo foi eficiente no controle de bactérias propiônicas, e evitou a formação de olhaduras propiônicas em queijo Parmesão;
- O nitrato de sódio por si só não foi efetivo para evitar o crescimento de bactérias propiônicas;
- A associação do nitrato ao cloreto de sódio apresentou uma ação mais efetiva na inibição de bactérias propiônicas e provocou redução nos indicadores de maturação porém sem afetar as características normais do queijo Parmesão.
- A velocidade de migração de sal nos queijos não salgado na massa foi maior do que nos queijos salgados na massa.
- A concentração de sal no interior dos queijos salgados na massa foi superior à dos queijos sem sal na massa em todos os tempos de análises.
- O nitrato de sódio não afetou a migração de sal nos queijos Parmesão.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.R. **Efeito dos diferentes níveis de nitrato de sódio adicionado ao leite, nos teores de nitrato e nitrito do soro e do queijo prato ao longo da maturação.** Lavras: ESAL, 1986. 89p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- ALAIS, C. **Ciência de la Leche.** Mexico: Cia editorial continental, 1991. 591p.
- ARDÔ, Y.; GRIPPON, J.C. **Comparative study of peptidolysis in some semi-hard cheese round-eyed cheese varieties with different fat contents.** *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v.62, n.3, p.543-547, Aug. 1995.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Microrganismos viáveis aeróbios e anaeróbios em alimentos: contagem padrão em placas.** Rio de Janeiro: ABNT, nov. 1991, 02p. (MB-3462).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis** 12.ed. Washington, 1995. 1094p
- BRASIL. Ministério da Agricultura **Portaria n. 353 de 04 de Setembro de 1997.** Brasília, 1997a.
- BRASIL. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Laboratório Nacional de referência Animal Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes II Métodos físico-químicos** Brasília, 1981. p.i.r.
- BRASIL. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA.** Brasília, 1997b. 241p
- BRITZ, T.J.; JORDAAN, H. **The rapid presuntive detection of propionibacterias the causative organisms of defects in Gouda cheese** *International Journal of Dairy Technology*, Huntingdon, v.8, p.79-83. 1976
- CARCANO, M.; TEDESCO, R.; LODI, R.; BRASCA, M. **Propionibacteria in Italian hard Cheese.** *Lait*, Paris, n.75, p.415-426, 1995

- CHAPMAN, C.S.; SHARPE, M.E Microbiology of cheese, In: ROBINSON, R.K **The microbiology of milk** Barking, Engel: Applied Science Publishers, 1981. v.2, p.157-243.
- CHOISY, C.; DESMAZEAUD, M.; GRIPRON, J.C.; LAMBERT, G.; LENOIR, J.; TOURNEUR, C. Les phenomenes microbiologiques et enzymatiques et la biochimie de Taffinage. In: ECK, A. **Le Fromage**. Paris: Tec et Documentation (Lavoisier), 1984. p.62-100.
- CHRISTENSEN, V.W. Manufacturing methods for high and low moisture mozzarella. **American Dairy Review**, Mpont Morris, v.28, n.9, p.38 e 92-96, Sept. 1966.
- CROW, V.L Utilization of lactate isomers by propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii: regulatory role for intracellular pyruvat **Appllied Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.2, p.352-358, Aug. 1986
- CUMMINS, C.S.; JOHNSON, J.L. The Genus Propionibacterium. In: BALOW, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (eds). **In the Prokaryotes**. Heidelberg: Springer Verlag, 1991. p.834-848.
- CARVALHO, A.F **Systematique des bactérias propioniques látiéres: classification, nomeclature et identification**. Rennes: ENSA, 1994. 227p. (Tese de Doutorado).
- DESMAZEAUD, M.J.; GRIPON, J.C. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. **Milchwissenschaft**, Cork, v.32, n.12, p.731-734, 1977.
- FARKEY, N.Y.; FOX, P.F. Objective index of cheese ripening **Trends in Food Science e Techonology**, London, v.2, n.3, p.37-40, Mar. 1990
- FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacturing and ripening **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, n.6, p.1379-1400, June 1989
- FOX, P.F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening: review. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v.10, p.522-535, July 1988.
- FOX, P.F.; LAW, J. Enzimology of cheese Ripening. **Food Biotechnology**, New York, v.5, n.3, p.239-262, 1991.

- FRYER, T.G.; PEBERDY, M.F. Growth of propionibacteria in Swiss and Egmont cheese. *New Zeland Journal Dairy Science Technology*. v.12, p.133-134. 1977.
- FURTADO, M.M. *A arte e a ciência do queijo*. São Paulo: Globo, 1991. p.239-244.
- FURTADO, M.M. Fermentação Propiônica em Queijo Suiço. *Informativo Hala Biotec*, Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda. Valinhos, n. 13, jan. 1993
- FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. *Tecnologia de queijos*. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.
- GHOSH, B.C.; SINGH, S.; KWALA, S.K. Rheological Properties of Mozzarella cheese: a review. *Indian Journal of Dairy Science*, New Delhi, v.43, n.1, p.71-80, 1990.
- GRAPPIN, R.; RANK, T.C.; OLSON, N.F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening: review. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.68, n.3, p.531-534, Mar. 1985.
- GRIPON, J.C.; DESMAZEAUD, J.; LE BARS, D.; BERGERE, J.L. Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes are cours de la maturation des fromages. *Le Lait*, Paris, v.55, n.548, p.502-512, sept./oct. 1975.
- GUINEE, T.P.; FOX, P.F. Salt in Cheese: Phisycal, chemical and Biological Aspects. In: FOX, P.F. *Cheese: chemistry, phisysics and microbiology*. London: Elsevier Applied Science, 1987. v.1, p.251-297.
- HETTINGA, D.H.; REINBOLD, G.W. The propionic-acid bacteria - A review I Growth. *Journal Milk Food Tehnology*, Orange, v.35 p.295-301, 1972.
- HETTINGA, D.H.; REINBOLD, G.W. The propionic-acid bacteria - A review II Growth Metabolism. *Milk Food Tehnology*, Orange, v.35 p.358-372, 1972.
- HETTINGA, D.H.; REINBOLD, G.W.; VEDAMUTHU, E.R. Split Defect of Swiss Cheese: II Effect of Low Temperatures on the Metabolic Activity of *Propionibacterium*. *Journal Milk Food Tehnology*, Orange, v.38, p.31-35, 1975.

- HETTINGA, D.H.; REINBOLD, G.W.; VEDAMUTHU, E.R.. Split Defect of Swiss Cheese: I Effect of Strain of *Propionibacterium* and Wrapping material. **Journal Milk Food Technology**, Orange, v.37, p.322-328, 1974
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. Genus propionibacterium, p.580.
- KINDSTEDT, P.S.; GUO, M.R. A Physio-chemical approach to the structure and function of Mozzarella Cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.53, n.1, p.70-73, June 1998.
- KRISTIANSEN, K.R.; DEDING, A.S.; JENSEN, D.F.; ARDÔ, Y.; QVIST, B. Influence of sat content on ripening of semi-hard round-eyed cheese of Dambo-type. **Milchwissenschaft**, Cork, v.54, n.1, p.19-23, 1999.
- LAW, B.A. Proteolysis en relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P.F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. London: AVI Publishing, 1987. v.1, cap.10, p.370-373.
- LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.K.; GILLES, J Symposium: cheese ripening technology. texture development during cheese ripening **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.70, n.8, p.1750-1760, Sept. 1987
- MALIK, A.C.; REINBOLD, G.W.; VEDAMUTHU, E.R. Evaluation of taxonomy of the *propionibacterium*. **Canadian of Journal Microbiology**, Ottawa, v.14 p.1185-1191, 1968
- MOCQUOT, G. Reviews of the progress of dairy science: swiss-type cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.46, n.1, p.133-160, Jan. 1978.
- MAURER, L.; STOCK, H. Teneur en chlorure de sodium de fromage emmental autrichien et son rapport avec les defaults due fromage. In: **INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS**, 20., E.766. 1978
- PARK, H.S.; REINBOLD, G.W.; HAMMOND, E.G.; CLARK, W.S. Growth of Propionibacteria at Low Temperatures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.50, n.4, p.589-591, Apr. 1967.
- REINBOLD, G.W. **The propionibacteria: milk products in bacterium starters cultures for foods**. In Stanley Gilliland CRC Press, 1985. p.74-84.

- RICHOUX,R.; FAIVRE,E.; KERJAN,J.R. Effect de la teneur en NaCl sur la fermentation du lactate par *Propionibacterium freudenreichii* dans des minifromages à pâte cuite. *Lait*, Paris, v.78, n.3, p.319-331, mai/ juin 1998.
- SANDRI, S.; PECORARI, M.; FOSSA, E.; MARIANI, M.S.; MARIANI, P.; PELLEGRINO, L. Osservazioni su alcuni case di gonfiore butirrico e propionico nel formaggio Parmiggiano-Reggiano: composizioni chimica, protelisi e lipolisi. *Scienza e Tecnica Latiero-Casaria*, Parua, v.46, n.6, p.343-360, 1995.
- SHERMAN, J.M. The cause of eyes and characteristic flavor in Emmental or Swiss cheese. *Journal Bacteriology*, Washington, v.6, p.273-279, 1989.
- SIPA/ABIQ/DATAMARK/DESK.RESEARCH. Números disponívem em <http://www.cel.org/leite%/número/informações/D Bra-Pro.htm>. Acesso em 25/abr. 2001.
- SOUZA NETTO, A.C.M. Isolamento de bactérias propiônicas naturais em regiões de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 1997. 64p. (Dissertação – Mestrado em ciência dos Alimentos).
- SPREER, E. *Lactologia Industrial*. Zaragoza: Acribia, 1991. 632p.
- SWART, R.; RIEDEL, K.H. BRITZ, T. Otimized standart conditions for determination of nitrate reduction in propionibacteria. *Lait*, Paris n.78, p.217-226. 1998
- VAKALERIS, D.G.; PRICE, W.V. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *Journal of Food Science*, Champaign v.42, n.2, p.264-276, Feb. 1959
- VAN GENT-RUIJTERS, M.L.W; VRIES,W.; STOUTHAMER,A.H. Influence of nitrate on feremntation pattern, molar grouwth yields and synthesis of cytochrome b in *Propionibactrium pentosaceum*. *Journal of General Microbiology*, Essex, v.88, p.36-48, 1975.
- VASSAL, L.; AUCLAIR, J. Apptitude de différentes souchs debctéries propioniques à la formation de l'ouvertude dans le fromage de Gruyère. In: **INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 19.**, 1F, p.796-797, 1978.
- VENEMA, D.P.; HERSTEL, H.; ELENBAAS, H.L. Determination of the ripening time of Edan and Gouda cheese by chemical analysis, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, Wageningen, v.41, p.215-226, 1987.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview. **Journal of Dairy Science**, Champaign v. 76, n.1, p.329-350, Jan. 1993.

WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise no queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.44, n.261-266, p.50-54, jan./dez. 1989.

YVON, M.; CHABANET, C.; PELISSIER, J.P. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions: Hypothesis on the precipitation mechanism. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v.34, n.2, p.166-176, Feb. 1989.

