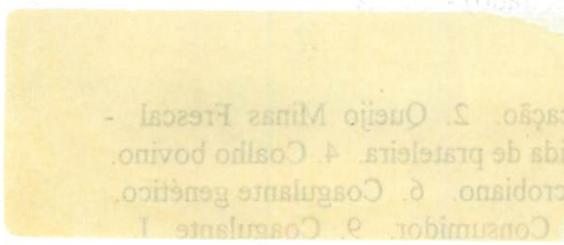


DAISE APARECIDA ROSSI

**UTILIZAÇÃO DO COALHO BOVINO E COAGULANTES MICROBIANO
E GENÉTICO NA ELABORAÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador
Luiz Ronaldo de Abreu**



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

Rossi, Daise Aparecida

Utilização do coalho bovino e coagulantes microbiano
e genético na elaboração do queijo minas frescal / Daise
Aparecida Rossi. -- Lavras : UFLA, 1977.

68 p. : il.

Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Queijo - Fabricação. 2. Queijo Minas Frescal -
Rendimento. 3. Vida de prateleira. 4. Coalho bovino.
5. Coagulante microbiano. 6. Coagulante genético.
7. Proteólise. 8. Consumidor. 9. Coagulante . I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

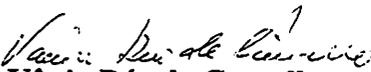
CDD-637.32

DAISE APARECIDA ROSSI

**UTILIZAÇÃO DO COALHO BOVINO E COAGULANTES MICROBIANO
E GENÉTICO NA ELABORAÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 28/02/97


Profa. Vânia Déa de Carvalho


Prof. Mauro Mansur Furtado


Prof. Luiz Ronaldo de Abreu
Orientador

**A todos que de alguma forma
acreditaram em mim e apoiaram**

OFEREÇO

**A meu marido, Edson pelo
incentivo constante, amor
e apoio incondicional**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele nada seria possível, à minha família pelo carinho e especialmente à minha sobrinha Bianca, pela ajuda na correção.

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

À CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho e ao Departamento de Produção Animal da Universidade Federal de Uberlândia pela liberação, que permitiu este aprimoramento na minha vida acadêmica.

Aos meus orientadores Luiz Ronaldo de Abreu e Múcio Mansur Furtado, pela orientação, amizade, apoio, incentivo, críticas construtivas e capacidade intelectual para apontar e resolver problemas.

Ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em especial aos professores Paulo Henrique da Silva, Fernando A. R. Magalhães e Heloísa Maria de Souza, e seus técnicos, em particular à Alcy e Carlinhos, pela disponibilidade e contribuição na condução de toda parte experimental.

À professora Vânia Déa de Carvalho, pelo auxílio na correção, sugestões, apoio e pela amizade sincera que sempre demonstrou.

Aos alunos da “Candinha” que de alguma forma auxiliaram e particularmente aos acadêmicos Giovani e Heloísa “Magali”, pela ajuda na condução da parte prática de fabricação e análises sensoriais.

Aos professores Maria Izabel Chitarra e Admilson Bosco Chitarra, por sua importância para a pós-graduação em Ciência dos Alimentos e por sua disponibilidade em auxiliar-me todas vezes que necessitei.

À professora Denise Garcia da Universidade Federal de Uberlândia, pela auxílio e orientação na elaboração da parte estatística.

Aos funcionários do Laboratório da EPAMIG, Sandra e Tina e de todos os outros laboratórios que na concessão de equipamentos ou em auxílio prático, foram essenciais à realização deste trabalho.

Ao Chefe do Departamento professor Paulo Clemente, Coordenadora do Curso, professora Eliana Pinheiro de Carvalho e Secretária Gicelda, pelas informações e orientações indispensáveis à realização deste.

Aos meus amigos Celso, Ana Cláudia, Anna Christina, Adriana Garcia, Regina de Abreu, Josane e aos outros colegas da pós-graduação que de alguma forma contribuíram, mas sobretudo, pela amizade sincera e excelente convívio.

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

Muito obrigada!

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| LISTA DE TABELAS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 4 |
| 2.1 Coagulação do Leite..... | 4 |
| 2.2 Coalhos e coagulantes..... | 5 |
| 2.2.1 Coalho animal..... | 6 |
| 2.2.2 Coagulantes microbianos..... | 6 |
| 2.2.3 Coagulante genético..... | 7 |
| 2.3 Rendimento de queijos..... | 10 |
| 2.4 Queijo tipo Minas Frescal e utilização de ácido láctico..... | 11 |
| 2.5 Proteólise em queijos..... | 13 |
| 2.6 Alterações no queijo Minas Frescal durante o armazenamento..... | 14 |
| 2.7 Métodos para avaliação da proteólise em queijos..... | 15 |
| 2.7.1 Extensão e profundidade da proteólise..... | 16 |
| 2.7.2 Índices de tirosina e triptofano..... | 17 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 Matérias primas..... | 18 |
| 3.1.1 Leite..... | 18 |
| 3.1.2 Ácido láctico..... | 18 |
| 3.1.3 Coalhos..... | 19 |
| 3.2 Fabricação dos queijos..... | 20 |
| 3.3 Análises..... | 22 |
| 3.3.1 Análises do coalho..... | 22 |
| 3.3.2 Análise do leite pasteurizado..... | 23 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3.2.1 | Acidez titulável..... | 23 |
| 3.3.2.2 | pH..... | 23 |
| 3.3.2.3 | Gordura..... | 23 |
| 3.3.2.4 | Sólidos totais..... | 23 |
| 3.3.2.5 | Umidade..... | 24 |
| 3.3.2.6 | Densidade..... | 24 |
| 3.3.2.7 | Determinação dos teores de Nitrogênio Total (NT) e Proteína Total (PT) | 24 |
| 3.3.2.8 | Nitrogênio Solúvel em TCA 12%..... | 24 |
| 3.3.2.9 | Contagem Padrão de mesófilas e psicrófilas | 25 |
| 3.3.2.9 | Coliformes totais e fecais..... | 25 |
| 3.4 | Análises do soro..... | 25 |
| 3.5 | Cálculos das porcentagens de transição de gordura e proteína bruta para o queijo..... | 25 |
| 3.6 | Rendimento das fabricações..... | 26 |
| 3.6.1 | Litros de leite por quilo de queijo (L/kg)..... | 26 |
| 3.6.2 | Gramas de sólidos totais por litro de leite (gST/L)..... | 27 |
| 3.7 | Análises dos queijos..... | 27 |
| 3.7.1 | Gordura..... | 27 |
| 3.7.2 | Sólidos totais..... | 27 |
| 3.7.3 | pH..... | 27 |
| 3.7.4 | Umidade..... | 28 |
| 3.7.5 | Gordura no extrato seco (GES)..... | 28 |
| 3.7.6 | Cloreto de sódio..... | 28 |
| 3.7.7 | Nitrogênio total (NT) e Proteína Total (PT)..... | 28 |
| 3.7.8 | Acidez..... | 29 |
| 3.8 | Proteólise dos queijos..... | 29 |
| 3.8.1 | Fracionamento do Nitrogênio Total..... | 29 |
| 3.8.1.1 | Nitrogênio solúvel a pH 4,6 (NS)..... | 29 |
| 3.8.2 | Cálculo dos índices de extensão da proteólise..... | 29 |
| 3.8.3 | Índice dos aminoácidos Tirosina (Tyr) e Triptofano (Trp)..... | 30 |
| 3.9 | Análise estatística..... | 30 |
| 3.10 | Análise sensorial..... | 31 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 34 |
| 4.1 | Análises físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado..... | 34 |
| 4.2 | Coagulação e ponto do queijo..... | 36 |
| 4.3 | Análises do soro..... | 39 |
| 4.4 | Análises dos queijos..... | 39 |
| 4.4.1 | Composição..... | 39 |
| 4.5 | Transição dos constituintes para o queijo e rendimento..... | 47 |
| 4.6 | Análises para acompanhamento da proteólise..... | 49 |
| 4.6.1 | Índice de extensão da maturação..... | 49 |
| 4.6.2 | Índice dos aminoácidos Tirosina e Triptofano..... | 52 |
| 4.7 | Análise sensorial..... | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 4.7.1 Teste de aceitação..... | 55 |
| 4.7.2 Análise Descritiva Quantitativa..... | 57 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 61 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 63 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Composição das frações de N solúvel usadas como índice de maturação de queijos..... | 16 |
| 2 | Atividade dos agentes utilizados para coagulação do leite..... | 19 |
| 3 | Resultados médios* da composição do leite utilizado para fabricação do queijo com o coalho bovino e coagulantes genético e microbiano..... | 34 |
| 4 | Resultados médios dos Índices de Nitrogênio Solúvel em TCA 12% do leite utilizado para fabricação dos queijos Minas Frescal | 35 |
| 5 | Resultados médios das análises microbiológicas do leite utilizado para fabricação dos queijos Minas Frescal | 35 |
| 6 | Tempos médios* em minutos para coagulação do leite pelo coalho bovino e coagulantes genético e microbiano. | 37 |
| 7 | Tempos médios* em minutos gastos até o ponto de enformagem do queijo Minas Frescal fabricados com o coalho bovino e coagulantes genético e microbiano..... | 37 |
| 8 | Resultados médios* da composição do soro das fabricações dos queijos com o coalho bovino e coagulantes genético e microbiano..... | 39 |
| 9 | Resultados médios* da composição dos queijos fabricados com o coalho bovino e coagulantes genético e microbiano..... | 40 |
| 10 | Transição de gordura, sólidos totais e proteína bruta do leite para o queijo e rendimentos de fabricação nos tratamentos com coalho bovino, genético e microbiano..... | |
| 10 | Evolução no pH dos queijos Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano | 46 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 11 | Transição dos componentes do leite para o queijo e rendimentos de fabricação nos tratamentos com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano..... | 48 |
| 12 | Resultados médios dos índices (mg/100g de queijo) de tirosina nos queijos Minas Frescal durante armazenamento a 12±1°C..... | 54 |
| 13 | Evolução dos índices do aminoácido triptofano no queijo Minas Frescal durante estocagem a 12°C..... | 55 |
| 14 | Notas médias obtidas no teste de aceitação para os diferentes agentes coagulantes nos diferentes períodos de armazenamento..... | 57 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Fluxograma da fabricação do queijo tipo Minas Frescal..... | 21 |
| 2 | Ficha de resposta do teste de aceitação..... | 32 |
| 3 | Ficha para avaliação sensorial descritiva dos queijos Minas Frescal..... | 33 |
| 4 | Fotografia evidenciando o tamanho dos grãos do queijo tipo Minas Frescal durante a mexedura..... | 42 |
| 5 | Gráfico de regressão evidenciando as variações na umidade dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento..... | 43 |
| 6 | Variações médias na acidez em ácido láctico (%) dos queijos Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano durante armazenamento..... | 45 |
| 7 | Gráfico de regressão evidenciando as variações na acidez em ácido láctico dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento..... | 45 |
| 8 | Gráfico de regressão evidenciando as variações no pH dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento..... | 47 |
| 9 | Gráfico de regressão evidenciando as variações nos índices de extensão dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento..... | 50 |
| 10 | Evolução dos índices de extensão nos queijos Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano durante armazenamento.. | 51 |
| 11 | Gráfico de regressão evidenciando as variações nos índices do aminoácido tirosina dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento | 53 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 12 | Resultados médios dos índices (mg/100g de queijo) de tirosina nos queijos Minas Frescal durante o armazenamento a $12\pm 1^{\circ}\text{C}$..... | 54 |
| 13 | Resultados da avaliação sensorial ao atributo cor em queijos Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano..... | 58 |
| 14 | Resultados da avaliação sensorial ao atributo gosto amargo em queijos Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano..... | 59 |
| 15 | Resultados da avaliação sensorial ao atributo acidez em queijos Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano.... | 59 |

RESUMO

ROSSI, Daise Aparecida. **Utilização do coalho bovino e coagulantes microbiano e genético na elaboração do queijo Minas Frescal**. Lavras: UFLA, 1997. 68p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).

Queijo tipo Minas Frescal é o terceiro queijo mais consumido no Brasil e sua tecnologia de fabricação têm sofrido modificações com o intuito de aumentar sua vida de prateleira e rendimento. Queijos Minas Frescal foram fabricados com o uso de salga direta no leite e ácido láctico substituindo o uso de fermento, e utilizados o coalho bovino e coagulantes genético e microbiano. Foram analisados rendimento, tempo de fabricação e transição dos constituintes do leite para o queijo. As análises da composição, índice de extensão da maturação, aminoácidos tirosina e triptofano e testes sensoriais foram realizadas após 1, 8, 15, 22 e 29 dias de armazenamento a $12\pm 1^{\circ}\text{C}$. O rendimento em litros de leite por quilo de queijo (L/kg) foi maior quando do uso do coalho bovino, porém, quando levou-se em consideração a composição dos queijos, o rendimento em gramas de sólidos totais por litro de leite (gST/L) foi maior no uso do coagulante microbiano ($p>0,05$). Observou-se diferenças significativas no tempo de coagulação do leite e no tempo de fabricação do queijo ($p<0,05$), que foram mais longos nos queijos fabricados com coagulante genético, provavelmente, devido à influência do sal na fase primária da coagulação pela quimosina, enzima predominante neste tipo de coalho. Os índices de extensão da maturação aumentaram gradualmente com o armazenamento ($p>0,05$), mas as diferenças entre os tratamentos não foram significativas. O tipo de coalho influenciou significativamente na composição

* Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu, Membros da banca: Vânia Déa de Carvalho e Mauro Mansur Furtado

dos queijos, sendo que os teores de gordura, acidez e sólidos totais foram maiores nos queijos fabricados com o coagulante genético, provavelmente como consequência da menor umidade apresentada. Os índices de extensão aumentaram gradualmente com o armazenamento ($p < 0,05$), porém não foram diferentes para os 3 agentes testados. O teor de tirosina mostrou a mesma tendência do índice de extensão, aumentando gradualmente, porém com diferença significativa para os diferentes agentes coagulantes, sendo o coagulante genético o que apresentou maior resultado médio (22,66mg/100g). Os índices obtidos na determinação do aminoácido triptofano só foram significativos para o fator armazenamento. A vida de prateleira foi avaliada através de um teste de aceitação, onde os melhores escores foram para o queijo fabricado com coalho bovino e armazenado por um dia e os piores para os queijos fabricados com coalho bovino e 29 dias de armazenamento. Todos os escores foram decaindo com o armazenamento, demonstrando manutenção das características organolépticas até oito dias de armazenamento, a exceção foram os queijos fabricados com coagulante microbiano que demonstraram serem aceitáveis até 15 dias. A análise descritiva quantitativa realizada através de teste de perfil modificado não demonstrou diferenças entre os tratamentos para os atributos cor, gosto amargo e acidez. De forma geral o coalho microbiano foi o mais adequado na fabricação do queijo Minas Frescal.

ABSTRACT

THE USE OF BOVINE, RECOBINANT CHYMOSIN (GENETIC) AND MICROBIAL RENNETS IN THE ELABORATION OF FRESH “MINAS” CHEESE

Fresh “Minas” Cheese is in third place among the cheeses most consumed in Brazil. The methods of production are changing with the objective of increasing productivity and shelf life. Cheeses were manufactured utilizing salt direct in milk and lactic acid substituting the use of starter. Bovine, genetic and microbial rennets were tested in the yield, time of fabrication and components transition from milk to cheese. Analyses of the composition, extension index, amino acids: tyrosine and triptofane, and sensorial tests were conducted after 1, 8, 15, 22 e 29 days of storage at 12°C. Yield in terms of liters of milk per kilogram of cheese (L/kg), increased with the use of the bovine rennet, however, when the composition of the cheese was taken into consideration, productivity, in terms of total grams of solid matter per liter of milk (gST/L), the microbial rennet was found to be superior ($p < 0,05$). Significant differences were also observed in the time required in the coagulation of the milk and the time required for the processing of the cheese ($p < 0,05$). More time was required when using genetic rennet, probably due the influence of salt in the primary phase of coagulation of chymosin, predominant enzyme in this type of rennet. The indexes of extension increased gradually during storage, but, the differences among treatments were not significant. The type of rennet used influenced ($p > 0,05$) in the composition of the cheeses in terms of fat levels, acidity and total solids with genetic rennet, probably *consequence of lower levels of moisture*. The indexes of extension increased gradually during the

storage, however significant differences ($p > 0,05$) among the three rennets tested, were not found. The amino acid, tyrosine, was associated with the extension indices, augmenting gradually. In this case significant differences among the rennets tested were found: the genetic rennet produced higher average (22,66 mg/100g). Results obtained in the determination of the amino acid triptofane, were significant during storage. Shelf life was examined using a test of consumer acceptance. Higher levels of acceptance were found among cheeses produced with the bovine rennet and aged for 1 day, while least acceptance was found for cheeses produced using the bovine rennet and aged during 29 days. All acceptance was found to decline during storage with the organoleptic characteristics holding up for 8 dias. The cheeses produced with a microbial rennet, however, were an exception with acceptance being maintained up to 15 days. A descriptive quantitative analyses under taken by modified profile test, did not show differences among treatments from the parameters color, bitterness and acidity. In general the microbial rennet was found to be the most adequate for the production of Fresch "Minas" cheese.

ABSTRACT

THE USE OF BOVINE, RECOBINANT CHYMOSIN (GENETIC) AND MICROBIAL RENNETS IN THE ELABORATION OF FRESH "MINAS" CHEESE

Fresh "Minas" Cheese is in third place among the cheeses most consumed in Brazil. The methods of production are changing with the objective of increasing productivity and shelf life. Cheeses were manufactured utilizing salt direct in milk and lactic acid substituting the use of starter. Bovine, genetic and microbial rennets were tested in the yield, time of fabrication and components transition from milk to cheese. Analyses of the composition, extension index, amino acids: tyrosine and triptofane, and sensorial tests were conducted after 1, 8, 15, 22 e 29 days of storage at 12°C. Yield in terms of liters of milk per kilogram of cheese (L/kg), increased with the use of the bovine rennet, however, when the composition of the cheese was taken into consideration, productivity, in terms of total grams of solid matter per liter of milk (gST/L), the microbial rennet was found to be superior ($p < 0,05$). Significant differences were also observed in the time required in the coagulation of the milk and the time required for the processing of the cheese ($p < 0,05$). More time was required when using genetic rennet, probably due the influence of salt in the primary phase of coagulation of chymosin, predominant enzyme in this type of rennet. The indexes of extension increased gradually during storage, but, the differences among treatments were not significant. The type of rennet used influenced ($p > 0,05$) in the composition of the cheeses in terms of fat levels, acidity and total solids with genetic rennet, probably consequence of lower levels of moisture. The indexes of extension increased gradually during the

storage, however significant differences ($p > 0,05$) among the three rennets tested, were not found. The amino acid, tyrosine, was associated with the extension indices, augmenting gradually. In this case significant differences among the rennets tested were found: the genetic rennet produced higher average (22,66 mg/100g). Results obtained in the determination of the amino acid triptofane, were significant during storage. Shelf life was examined using a test of consumer acceptance. Higher levels of acceptance were found among cheeses produced with the bovine rennet and aged for 1 day, while least acceptance was found for cheeses produced using the bovine rennet and aged during 29 days. All acceptance was found to decline during storage with the organoleptic characteristics holding up for 8 dias. The cheeses produced with a microbial rennet, however, were an exception with acceptance being maintained up to 15 days. A descriptive quantitative analyses under taken by modifield profile test, did not show differences among treatments from the parameters color, bitterness and acidity. In general the microbial rennet was found to be the most adequate for the production of Fresch "Minas" cheese.

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Regulamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Brasil (1980), queijo é o produto obtido do leite integral, padronizado, magro ou desnatado, coagulado natural ou artificialmente, adicionado ou não de substâncias permitidas no Regulamento e submetido à manipulações necessárias para a formação das características próprias. O queijo Minas é um dos produtos de laticínios mais difundidos no Brasil, ocupando o terceiro lugar na produção nacional de queijos, incluindo as variedades Frescal e Padronizado. O produto possui grande aceitação no mercado e pode ser encontrado em todo o país, notadamente no estado de Minas Gerais.

Sob o ponto de vista tecnológico, é um produto de fácil elaboração, apresenta elevado rendimento na fabricação e não é maturado, o que facilita grandemente seu escoamento e distribuição no mercado, já que dispensa o período de maturação na indústria (Wolfschoon-Pombo, Furtado e Munck, 1978). Entretanto, por ser um queijo fresco e de alta umidade, os fenômenos bioquímicos de proteólise causam alterações no seu corpo, amarelamento da casca e sabor acentuadamente ácido, o que torna o produto inaceitável para o consumidor. Um dos grandes problemas referentes a este tipo de queijo, é sua pequena durabilidade. Modificações na tecnologia de fabricação têm sido adotadas para minorar estes problemas, como também aumentar seu rendimento. O uso de leite pasteurizado, adição de fermento láctico, emprego do ácido láctico, utilização de prensagem, ultrafiltração, entre outras, foram as inovações mais bem sucedidas.

Segundo Fox e Law (1991), vários fatores interferem na proteólise dos queijos, sendo que os principais seriam as enzimas provenientes de bactérias, lácticas ou não, e as enzimas do coalho, possuindo o agente coagulante importante papel na degradação protéica. Algumas enzimas dos agentes coagulantes são mais proteolíticas do que outras, dependendo da sua

composição enzimática e especificidade, sendo este fator dependente da fonte de produção. A grande maioria dos coalhos utilizados na indústria queijeira do Brasil são produzidos à partir do abomaso de bovinos adultos e apresentam em média 80% de pepsina bovina e 20% de quimosina (Retil, Sguedoni e Juliano, 1992). A pepsina bovina é uma enzima mais proteolítica e menos específica que a quimosina, e em condições favoráveis pode hidrolisar excessivamente as caseínas, podendo causar diminuição no rendimento, sabor amargo e aumento na proteólise geral (Visser, 1981). O aumento na proteólise acarreta diminuição na vida de prateleira de queijos frescos.

Tradicionalmente, o coalho de vitelo é considerado o ideal para a fabricação de queijos, porém, na produção do queijo Minas Frescal, seu uso é insipiente, sendo mais utilizados os coalhos bovinos e microbianos. De acordo com Fox e Law (1991), o uso destes coagulantes em detrimento da utilização do coalho de vitelo, muitas vezes acarretam problemas tecnológicos, como redução no rendimento e defeitos no sabor e aroma em queijos. A formação da quimosina ocorre durante as primeiras semanas de vida do bezerro, sendo depois substituída principalmente pela pepsina, desta forma, é necessário sacrificar o animal ainda muito jovem. Com o aumento na demanda do consumo de carne e queijos, a oferta, qualidade e preços do coalho de vitelo começaram a variar, tornando necessária a busca de coagulantes alternativos (Fungaro, 1990). Substitutos adequados vêm sendo pesquisados.

Recentemente técnicas avançadas de engenharia genética permitem a produção de um coalho composto de 100% de quimosina. Este coalho é obtido através da fermentação por microrganismos transgênicos (coalho genético), possuindo como vantagens: pureza, oferta constante, custo reduzido e elevado rendimento na fabricação de queijos, já sendo utilizado em muitas das indústrias queijeiras americanas (Barbano e Rasmussen, 1992). O coalho genético já foi testado experimentalmente em outros países, em muitas variedades de queijos. Seu desempenho em queijos fabricados com leite bovino, comparado com o uso de coalho de vitelo não têm apresentado significância em termos tecnológicos (Barbano e Rasmussen, 1992; Broome e Hickey, 1990; Hicks, O'Leary e Bucy, 1988). No Brasil sua aplicação na indústria queijeira e pesquisas no setor, são ainda isoladas e insuficientes.

Levando-se em conta a importância do queijo Minas Frescal para a indústria brasileira, justifica-se a comparação da utilização dos principais tipos de coalhos presentes no mercado e sua influência no rendimento e vida de prateleira desta variedade de queijo. Desta forma, o presente trabalho possui como objetivos:

Objetivo geral:

Comparar os efeitos do uso dos coalho bovino e coagulantes genético (obtido por fermentação do *Aspergillus niger* var. *awamori*) e microbiano (*Mucor miehei*), no rendimento de fabricação e na vida de prateleira do queijo Minas Frescal.

Objetivos específicos:

- Avaliar variações na composição dos queijos;
- Verificar alterações no tempo de fabricação;
- Verificar o grau de proteólise dos queijos por métodos objetivos;
- Avaliar diferenças no rendimento dos queijos;
- Determinar através de testes sensoriais a preferência do consumidor e análise quantitativa das características principais dos queijos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Coagulação do leite

O leite mantém-se em sua forma coloidal devido a dispersão das micelas de caseína por repulsão de natureza estérica e eletrostática. A repulsão é principalmente causada pelos filamentos hidrofílicos da κ -caseína orientados para o meio externo, das cargas elétricas superficiais e da camada de hidratação (Kirchmeier, 1973; Walstra, 1990). Entretanto, filamentos de diferentes micelas podem se tocar e conduzir à agregação, dependendo de mudanças no meio como altas temperaturas, ligações covalentes e pontes salinas (Walstra, 1990).

Na fabricação de queijos, o complexo micelar caseínico deve ser desestabilizado, o que pode ser conseguido através de precipitação isoelétrica, ação do ácido e do calor e utilização de enzimas proteolíticas, como as dos agentes coagulantes (Fox, 1987). A coagulação enzimática do leite ocorre em dois estádios distintos, onde primeiramente há a quebra do macropéptido da κ -caseína e no segundo estágio, agregação das micelas de para- κ -caseína, mediadas pelo cálcio, quando a temperatura for adequada, 20°C Fox (1988), ou em torno de 30°C (Visser, 1993). A enzima quimosina (E.C. 3.4.23.4), do grupo das proteinases aspárticas, atua sobre as moléculas de κ -caseína ao acaso, até encontrar um sítio vulnerável. A clivagem ocorre preferencialmente no sítio fenilalanina (Phe-105) e metionina (Met-106), e a sequência compreendida entre a histidina (His-98) até a lisina (Lis-112) que garante a conformação espacial adequada (Fox, 1989), tornando as micelas instáveis. A segunda fase envolve a precipitação ou gelatinização da fração amino-terminal insolúvel aos íons cálcio, para- κ -caseína, que passa a fazer parte do coágulo. A

caseíno-macropéptido, que é a fração carboxi-terminal, solúvel na presença de íons cálcio, é perdida no soro (Fox e Law, 1991).

A adição de até 3 mN de cloreto de sódio, reduz o tempo de coagulação do leite, porém em concentrações mais elevadas, seu efeito é inibidor. Acredita-se que o efeito do cloreto de sódio é na fase enzimática primária (Fox, 1988).

2.2 Coalhos e coagulantes

A função primária dos coalhos é especificamente a hidrólise do componente estável da caseína (κ -caseína), com um mínimo de proteólise geral, que iria reduzir o rendimento de queijos (Fox, 1988). Existe uma grande variedade de proteinases que têm sido usadas como coagulantes do leite, como as enzimas microbianas, as extraídas de plantas (ficina, bromelina, papaína) e as proteinases gástricas de vitelos, cabritos e cordeiros (Retil, Sguedoni e Juliano, 1992; Fox, 1988).

As proteinases do coalho animal e de fungos são todas pertencentes ao grupo das proteases aspárticas. Na classificação internacional, o grupo leva a denominação E.C. 3.4.23, que representa as proteinases mais importantes. A composição das proteinases aspárticas caracteriza-se geralmente pelo alto conteúdo de hidróxido aminoácido e ácidos dis-carboxílicos e baixo conteúdo de grupo amina. Este grupo tem peso molecular compreendido entre 33.000 e 38.000 (Foltmann, 1987).

A pequena utilização dos coagulantes vegetais justifica-se por possuírem alta atividade proteolítica degradando α -lactoalbumina e soroalbumina, causando hidrólise tão rapidamente que produz redução no rendimento e/ou defeitos de sabor, só se prestando à fabricação de poucos tipos de queijos (Ortiz de Apodaca, Amigo e Ramos, 1994). Dinakar, Mathur e Datta (1989) comparando os coalhos de vitelo e de *Withania coagulans* em queijo Cheddar, encontraram nos queijos fabricados com a enzima vegetal, sabor amargo, frações adstringentes e grande hidrólise da β -caseína, o que inviabilizava a fabricação de queijos com este tipo de coalho.

Os tipos de coagulantes que têm merecido melhor aceitação como substitutos do coalho de vitelo são as pepsinas bovina, suína ou avícola e as proteinases ácidas de microrganismos. Destes, a pepsina avícola é a menos utilizada, sendo mais aceita somente em Israel e parte da Czechoslovachia, a pepsina bovina é provavelmente a mais satisfatória, possuindo inclusive importante papel na maturação de queijos (Fox, 1988). Atualmente coalhos obtidos por engenharia genética vêm sendo introduzidos.

2.2.1 Coalho animal

Coalho é definido como o extrato do estômago de animais ruminantes (abomaso), rico em proteinases ácidas, com atividade coagulante sobre o leite. Proteinases de outras origens, que também possuem capacidade de coagular o leite sob condições adequadas são denominados coagulantes. A composição do coalho extraído do abomaso de vitelos é de aproximadamente 20% de pepsina bovina e 80% de quimosina, sendo bastante diferente da composição de coalhos extraídos de bovinos adultos, onde esta relação se inverte (Retil, Sguedoni e Juliano, 1992). No Brasil há predominância do uso do coalho obtido de bovinos adultos.

2.2.2 Coagulantes microbianos

A utilização das enzimas coagulantes de origem microbiana aumentou nos últimos anos e têm obtido sucesso em algumas variedades de queijos. Pode-se encontrar comercialmente enzimas produzidas por três tipos de fungos: *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* e *Endothia parasitica*, todas do grupo das proteases aspárticas, classificadas como EC 3.4.23.6 (Foltmann, 1987). A característica principal destas enzimas é sua alta atividade proteolítica quando comparada a outros coagulantes e sua baixa especificidade (Fox, 1988). Dentre os problemas mais frequentes

encontrados em queijos fabricados com coalhos microbianos estão: sabor amargo, sinérese prolongada e desenvolvimento de textura não apropriada (Fungaro, 1990).

Os coagulantes microbianos são largamente utilizados nos Estados Unidos em queijos fabricados para utilização como matéria-prima para fundidos. Estas variedades de queijo são adequadas para utilização do coalho microbiano por serem submetidos a aquecimento rigoroso, o que inativa a ação enzimática do coalho. No Brasil os coagulantes microbianos são adotado em muitas indústrias brasileiras na fabricação do queijo Minas Frescal, que por ser de consumo rápido não são muito influenciados pelos fenômenos bioquímicos decorrentes da maturação por longos períodos.

2.2.3 Coagulante genético

Com a procura de substitutos adequados para o coalho de vitelo, coagulantes obtidos por engenharia genética alcançaram significância e sucesso comercial, já sendo utilizados em queijos como Cheddar, Edam, Manchego, Burgo e Hispânico (Ortiz de Apodaca, Amigo e Ramos, 1994).

A produção de quimosina por fermentação envolve avançados processos de biotecnologia. Para sua obtenção, o RNA mensageiro (m-RNA), contendo a sequência de bases codificadoras para a produção da proquimosina, é isolado de células do abomaso de bezerras (através de enzimas de restrição), e transcrito com o auxílio da enzima transcriptase reversa, a DNA complementar (c-DNA). O c-DNA contém a sequência de nucleotídeos responsável pela correta sequência de aminoácidos da proquimosina, porém, sem as sequências de introns presentes no DNA natural desta enzima. A sequência de bases do gene da proquimosina é determinada e o c-DNA pode ser então, obtido por síntese bioquímica (Folegatti, 1994; Teuber, 1990 e Stryer, 1988). Como o c-DNA não contém as sequências de introns presentes no DNA da proquimosina, há possibilidade da clonagem e expressão do DNA por vetores de expressão (plasmídios), que por sua vez são inseridos em microrganismos hospedeiros, normalmente bactérias e fungos. Para produção do coagulante, os microrganismos são cultivados e a quimosina produzida extraída e

purificada. Os microrganismos que vêm sendo mais largamente utilizados como hospedeiros na produção industrial de coalho são, *Escherichia coli* K12, *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus niger* var. *awamori*, embora outras bactérias e fungos possam ser utilizados (Teuber, 1990; Fox, 1988).

No caso do coalho genético obtido através da fermentação do *Aspergillus niger* var. *awamori* transformado, o gene da proquimosina B é isolado do m-RNA de estômago de vitelo e transcrito no c-DNA da proquimosina. Este é inserido no vetor de expressão (plasmídeo) após a região que codifica para glicoamilase, que é essencial para o metabolismo deste microrganismo. O plasmídeo é incorporado na célula do *A. niger*, passando a integrar seu genoma e secretar as proteínas glicoamilase e proquimosina. O sistema promotor-inibidor da glicoamilase passa a controlar a expressão do c-DNA da proquimosina. Supõe-se que a formação de quimosina ocorra por ativação de um mecanismo auto-catalítico e o complexo glicoamilase-proquimosina seja totalmente transformado em quimosina ativa, como consequência do pH relativamente baixo da fermentação. Para produção industrial, o *A. niger* var. *awamori* é submetido a fermentação convencional. Posteriormente as células são inativadas e a quimosina recuperada por métodos convencionais, que incluem tratamento ácido, cromatografia gasosa e ultrafiltração (Harboe, 1992).

A quimosina obtida por fermentação de microrganismos transgênicos é composta exclusivamente por quimosina tipo B, sendo que o coalho de vitelo é composto das quimosinas A, B e C e estruturas proteicas sem atividade enzimática, com proporção de aproximadamente 30:55:15 respectivamente. A quimosina C é um produto de degradação da quimosina A, e esta é ligeiramente mais específica que a quimosina B. A quimosina B é mais estável. (Harboe, 1992). A principal diferença entre a quimosina obtida por fermentação e coalho de vitelo é sua alta pureza, que em contraste aos produtos obtidos por fermentação, contém pepsina bovina. A quimosina obtida por fermentação é degradada em tempo a aminoácidos e peptídios, da mesma forma que a quimosina de vitelo. A utilização do fungo filamentoso *A. niger*, por seu longo uso em indústrias alimentícias garantem consumo seguro e habilidade para secretar grandes quantidades da enzima (Harboe, 1992). Praaning-Van Dalen (1992) ressalta como vantagens para o uso de coalho obtido

por fermentação, suas características de pureza, semelhança com o coalho de vitelo na habilidade de coagular o leite, garantia de não conter células viáveis nem DNA recombinante e ainda, ser aceito por naturalistas, já que não implica no sacrifício de animais para sua obtenção

Recentemente, grande número de experimentos científicos testaram o coalho obtido por fermentação e realizaram a comparação como outros tipos de coagulantes em diversas variedades de queijos: Broome e Hickey (1990), compararam o efeito do coalho de vitelo e genético na fabricação do queijo Cheddar em até 12 meses de fabricação. Os autores não encontram diferenças quanto ao tempo de fabricação, composição dos queijos, aspectos microbiológicos e proteólise, mas detectaram, um aumento ($p < 0,025$), no rendimento do queijo fabricado com coalho obtido por fermentação. Ainda em queijo Cheddar, Banks (1992) em experimeto similar, não encontrou diferenças significativas no rendimento, sólidos totais e flavor, em queijos com até 6 meses de maturação. Barbano e Rasmussen (1992), utilizaram coalho genético e microbiano em queijo Cheddar, e observaram maior perda de proteínas, quando do uso do coalho microbiano. O rendimento dos queijos fabricados com coalho obtido por fermentação de microrganismos transgênicos foi significativamente maior. Provavelmente consequência da alta atividade proteolítica e baixa especificidade do coalho microbiano. Neste mesmo experimento os autores compararam o coalho obtido por fermentação como o coalho bovino. Quando da utilização do coalho bovino, houve maior perda de gordura no soro e diminuição no rendimento. Os autores atribuíram as perdas à presença de pepsina no coalho bovino.

Disegna et al (1991) e Corradini et al (1990), estudaram a ação da quimosina obtida por fermentação do *Kluyveromices lactis* e coalho de vitelo, sobre as propriedades sensoriais e rendimento em queijo Grana e não encontraram diferenças entre os 2 tipos de coalhos. Nunez et al. (1992), também utilizando a quimosina de *K. lactis* e coalho tradicional, não encontraram diferenças nas características sensoriais e reológicas do queijo Manchego, porém, encontraram diferenças no nitrogênio solúvel a pH 4,6, provavelmente, devido a presença exclusiva de quimosina no coalho obtido por engenharia genética.

O rendimento, composição e proteólise em queijos Gouda fabricados com quimosina de *K. lactis* também não apresentaram diferenças quando comparados aos fabricados com coalho de vitelo. O tempo de coagulação apresentou-se ligeiramente diferente, fato que atribuíram à presença de pepsina no coalho tradicional (Van Den Berg e Koning (1990). Medina et al (1992), observaram que em queijos Burgo, a utilização da quimosina obtida por fermentação não interfere no rendimento, pH, umidade e proporção de frações α -S₁ e β -caseína liberadas, quando comparada ao coalho de vitelo. Em queijo Hispânico, o resíduo de β -caseína é maior que no queijo elaborado com coalho tradicional, porém, não existem diferenças quanto às características sensoriais e reológicas.

2.3 Rendimento de queijos

Um dos fatores primordiais para garantir a economicidade da produção de queijos é o rendimento. Rendimento em queijos é definido como a quantidade de queijo com determinado teor de sólidos totais, produzido a partir de um peso fixo de leite (Kosikowski, 1977) . Os principais fatores interferentes são: composição do leite (principalmente gordura e proteína), porcentagem de transição dos constituintes do leite para o queijo e a porcentagem de umidade retida (Banks et al., 1981). Segundo Kammerlhner (1994), também a qualidade do leite, aditivos como coalho e fermento láctico e tecnologia de fabricação, serão determinantes para o rendimento de queijos.

A fabricação da maioria das variedades de queijos envolve, essencialmente, a concentração das caseínas e da gordura do leite, de 6 a 12 vezes, dependendo da variedade (Fox, 1988). A concentração é obtida por meio de coagulação, dessoramento, prensagem e desidratação durante a salga e maturação do queijo (Silva, 1995). Várias fórmulas foram desenvolvidas para prever o rendimento de queijos. As fórmulas utilizadas para cálculo do rendimento, dividem-se em duas classes gerais, baseando-se na composição do queijo, ou então sendo derivadas da comparação do rendimento real e composição do leite utilizado, normalmente teores de caseína, gordura e sólidos solúveis (Emmons et al., 1990). Segundo Furtado, Wolfschoon-Pombo e Munck

(1979), um método adequado para estimativa de rendimento em queijos baseia-se nas cifras de transição dos constituintes do leite para o queijo, podendo ser preditas com sucesso por fórmulas, como demonstrou-se experimentalmente em queijos Minas Padrão , onde os valores calculados e reais foram bastante próximos para este tipo de queijo. O rendimento também é afetado pelas técnicas de fabricação e matérias primas utilizadas, possuindo o coalho importante função. Suas características proteolíticas sobre as frações proteicas do leite serão determinantes no rendimento do produto final.

2.4 Queijo Minas Frescal e utilização de ácido láctico

Para fins de padronização, os queijos devem ser classificados. O queijo Minas Frescal é um produto de coagulação enzimática, de massa crua, moldado em forma cilíndrica de diâmetro cerca de duas vezes a altura, pesando cerca de 1 kg (Ferreira et al., 1992). A fabricação tradicional do queijo Minas Frescal sofreu modificações ao longo do tempo, visando melhorias na qualidade do produto final como: aumento de rendimento e da vida de prateleira, padronização e segurança para a saúde pública. Para garantir estes aspectos foi introduzido o emprego de fermento láctico e utilização do leite pasteurizado, que, conjugado com os incentivos para uso de leite de boa qualidade higiênica, cuidados na produção e manipulação, garantiriam a qualidade deste tipo de queijo (Wolfschoon-Pombo, Furtado e Munck, 1978).

Com o passar do tempo, observou-se a incoerência do uso de fermento láctico em um queijo de consumo imediato como o Minas Frescal, já que um dos maiores problemas deste produto é a durabilidade no mercado. No queijo Minas Frescal, proteólise avançada caracteriza massa amolecida, coloração da casca ligeiramente amarelada e sabor fortemente ácido (Wolfschoon-Pombo et. al., 1984). O fenômeno causado pela atuação das bactérias do fermento láctico é apontada como a causa mais freqüente de proteólise, e conseqüentemente, deterioração no mercado (Furtado, Souza e Munck, 1980). Com a adição do fermento láctico mesofílico (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*), que são bactérias

homofermentativas da lactose, há aumento na produção de ácido láctico. O acúmulo deste ácido abaixa o pH e há aparecimento de flavor característico no queijo. Porém, além de ácido láctico, os microrganismos também liberam no meio proteases que atuam sobre a caseína e suas frações, aumentando o teor de proteínas solúveis do queijo. Este aumento provoca modificações sensíveis na textura, rendimento e sabor do queijo, com a formação de aminoácidos, tióis, ácidos, tioésteres, entre outras (Fox e Law, 1991). Estes compostos muitas vezes causam sabores e aromas indesejáveis em queijos.

Com a necessidade de um abaixamento do pH para garantir melhor atuação do coalho Foltmann (1987), e competição com contaminantes indesejáveis, foi proposto a utilização de ácido láctico em substituição ao fermento láctico (Van Dender e Moreno, 1991; Furtado, Souza e Munck, 1980). Esta alteração na tecnologia de fabricação teve como resultados principais o aumento na umidade e pH do queijo, baixa acidez e maior perda de sólidos solúveis no soro (Furtado, Souza e Munck, 1980). Apesar da maior perda de sólidos no soro, a utilização de ácido láctico aumenta o rendimento dos queijos, esta perda de sólidos no soro no processo onde não se utiliza o fermento láctico, pode ser explicada: O leite com fermento obviamente contém um maior número de bactérias lácticas e sofre maior hidrólise da lactose e conseqüente maior produção de ácido láctico durante a fabricação, o que melhora a atuação do coalho, porém, o maior rendimento quando da utilização do ácido láctico deve-se ao aumento no teor de umidade no queijo, já que, com um coágulo menos ácido, há menor favorecimento para reação do cálcio do paracaseinato com o ácido láctico, resultando assim em menos lactato e menor expulsão da água (Wolfschoon-Pombo et al., 1978).

O queijo Minas Frescal fabricado com adição de ácido láctico apresenta na estocagem menores alterações que os fabricados tradicionalmente com fermento láctico, tendo como características corpo mais firme, menor alteração na coloração da casca, sabor menos ácido e ainda, aumento no rendimento. (Van Dender e Moreno, 1991; Furtado, Souza e Munck, 1980; Wolfschoon-Pombo et al., 1978).

2.5 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). Leite proveniente de animais portadores de mamites podem conter proteinases de leucócitos, que alteram a qualidade e o rendimento de queijos.

Na coagulação enzimática do leite, a quimosina (EC 3.4.23.4), proteolisa especificamente a ligação Phe-105 e Met-106 (Visser, 1993). Somente cerca de 6% do coalho adicionado ao leite para queijo é retido na coalhada, a quantidade retida é influenciada pelo tipo de coalho, como por exemplo a pepsina suína que é extensivamente denaturada; pH, que quando baixo favorece a retenção de quimosina, mas não de microbiano ou pepsina, reduzindo a denaturação; e ainda, a temperatura de cozimento, como no queijo suíço, onde muito pouco ou nenhum coagulante continua ativo. A proteólise proveniente do agente coagulante vai variar conforme sua composição e especificidade (Fox e Law, 1991).

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 proteica original é o principal responsável pelas alterações nas propriedades reológicas dos queijos (Grappin, Rank e Olson, 1985).

A degradação das matérias proteicas 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 Alterações no queijo Minas Frescal durante o armazenamento

Um dos fatores importantes no processo de estocagem do queijo Minas Frescal é a decomposição da lactose em ácido láctico e seu teor residual no queijo. A metabolização do carboidrato é feita normalmente pelos microrganismos presentes e/ou adicionados no leite e irá influir na formação do flavor e na vida de prateleira (shelf life) do queijo. A degradação da lactose em ácido láctico acontece por processo enzimático, que requer numerosas enzimas e é conhecido por glicólise (Casagrande, Wolfschoon-Pombo, 1988). A velocidade de formação e quantidade de ácido láctico produzido influenciam o pH, o equilíbrio iônico, formação de lactato de cálcio e inibe o crescimento de patógenos. O lactato pode ser usado com fonte de energia para fermentações secundárias ou indesejáveis. Estas variações influenciam na qualidade e são determinantes na elaboração de algumas variedade de queijos (Fox, 1991; Casagrande e Wolfschoon-Pombo, 1988; Wolfschoon-Pombo, Casagrande, Lourenço-Neto e Munck, 1984).

O início da proteólise pela quimosina é um fator que regula o desenvolvimento de textura em queijos de alta umidade, a ação da quimosina é favorecida perto do centro do queijo, e ocorre devido a menor concentração de sal (Law, 1987). Quanto maior a proteólise em queijos, mais macia será sua consistência e seu aroma mais pronunciado. No queijo Minas Frescal, cor amarelada da casca, acidez acentuada e consistência amolecida são atributos negativos de sua qualidade (Wolfschoon-Pombo, Casagrande, Lourenço-Neto e Munck, 1984).

O queijo Minas Frescal é um queijo consumido sem maturação, porém, a tecnologia de fabricação e conseqüentemente a proteólise, influenciam decisivamente na consistência, sabor e durabilidade do produto (Wolfschoon-Pombo e Lima, 1989).

2.7 Métodos para avaliação da proteólise em queijos

Venema et al. (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, que foi tornada 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 mol/l, 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 continham principalmente, compostos de massa molecular elevada, sendo que 28% dos peptídios eram moléculas com massa molecular menor que 3000, 50% entre 3000 e 5000 e 20% maior que 5000. Para peptídios de baixo e médio peso molecular, tem sido empregado o ácido tricloroacético (TCA) em concentrações de 2 a 12% (Fox, 1989). Yvon et al (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 que 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 apresentam 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 utilizados como índice de maturação podem ser resumidos na tabela 1.

TABELA 1 - Composição das frações de N solúvel usadas como índice de maturação de queijos

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

SSA= ácido sufosalicílico; PTA= ácido fosfotungstico

Fonte: Law, 1987

2.7.1 Extensão e profundidade da proteólise

O avanço da proteólise em queijos podem ser mensuradas através de índices chamados de "extensão" e "profundidade". Extensão da proteólise é caracterizada pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis (NS) acumuladas durante o processo, e expressas como percentagem do nitrogênio total, também conhecido 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 α e β , 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 isoelétrica 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).

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

NT

Profundidade da proteólise diz respeito às substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, acumuladas durante o processo, tendo como compostos característicos: aminoácidos,

oligo-peptidases, aminas, entre outros. A quantificação da profundidade pode ser obtida pelo teor de nitrogênio não proteico (NPN), que são aqueles solúveis em ácido tricloroacético (TCA) a 12%, ou pela determinação direta dos aminoácido produzidos e expressos como percentual de proteína solúvel total (Wolfschoon-Pombo e Lima, 1989).

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

O índice de profundidade de proteólise é relacionado à atividade do fermento. As proteinases e peptidases atuam sobre os peptídios, principalmente os liberados devido a ação do coalho, produzindo compostos de baixo peso molecular, aumentando o nitrogênio solúvel em TCA 12% (Farrey 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 muito maiores que os fabricados com ácido láctico (Wolfschoon-Pombo e Lima, 1989).

2.7.2 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 comprimento de onda de 270 e 290 nm, torna sua quantificação 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

O experimento foi conduzido no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG e no Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT), Juiz de Fora-MG. Foram fabricados queijos tipo Minas Frescal com coalho bovino e coagulantes microbiano e genético. As análises foram realizadas após 5 períodos de armazenamento a $12\pm 1^{\circ}\text{C}$: D+1, D+7, D+14, D+21 e D+28 dias, sendo D o dia da fabricação. Foram avaliados os efeitos dos tratamentos na composição dos queijos, proteólise, tempo de fabricação e análises sensoriais. O experimento foi conduzido em 3 dias consecutivos, em fabricações simultâneas, onde foram utilizados 100 Kg de leite para cada tratamento em cada uma das 3 repetições.

3.1 Matérias primas

3.1.1 Leite

O leite utilizado para fabricação do queijo Minas Frescal foi do tipo "C", proveniente da região de Juiz de Fora, Minas Gerais, recebido na plataforma do Instituto de Laticínios Cândido Tostes e padronizado para cerca de 3,0% de gordura. A pasteurização foi realizada em pasteurizador a placa por $73^{\circ}\text{C}/15\text{-}20$ segundos. Para cada repetição foram adicionados em cada um dos 3 tanques de aço inoxidável 100 kg de leite, que foram então homogeneizados, amostrados e receberam os diferentes tratamentos.

3.1.2 Ácido láctico

Em todas fabricações o fermento mesofílico foi substituído por ácido láctico industrial (85% pureza), na quantidade de 23,5 ml para cada 100 Kg de leite. Para utilização, o ácido láctico foi previamente diluído a 2,5% em água destilada estéril, para evitar precipitação das proteínas do leite. (Furtado, Souza e Munck, 1980).

3.1.3 Coalhos

Foram utilizados três tipos de agentes coagulantes produzidos pela Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda, com as seguintes composições e características:

- coalho microbiano: enzimas proveniente da fermentação do *Mucor miehei*;
- coalho bovino : obtido de abomaso de bovinos adultos, 20% de quimosina, 80% de pepsina bovina e cloreto de sódio;
- coalho genético: obtido da fermentação do *Aspergillus niger var. awamori* modificado geneticamente, 100% de quimosina do tipo "B" e cloreto de sódio .

TABELA 2 - Atividade dos agentes utilizados para coagulação do leite.

| Tipo de agente coagulante | Força do coalho |
|----------------------------------|------------------------|
| Bovino | 1:60.000 |
| Genético | 1:100.000 |
| Microbiano | 1:40.000 |

Fonte: Laboratório de Físico-Química do ILCT, 1996

3.2 Fabricação dos queijos

A tecnologia de fabricação empregada foi a tradicional, acrescida das modificações sugeridas por Wolfshoon-Pombo, Furtado e Munck (1978), como descrita a seguir:

- Foram utilizados 100 kg de leite em cada fabricação e a temperatura ajustada para 37°C;
- Foi realizada a salga no leite (2%), o sal utilizado foi da marca comercial Cisne;
- Adição de CaCl_2 (cloreto de cálcio) - 50 ml de solução a 50% para cada 100 kg/leite;
- Em substituição ao fermento foi utilizado 23,5 ml de ácido láctico a 85% de pureza/100 kg de leite (previamente diluído em água destilada em solução a 2,5%);
- A cada tanque foi adicionado um tipo de coalho (bovino, microbiano, genético), na proporção adequada para que o leite coagulasse em aproximadamente 40-60 minutos. A quantidade do coalho foi padronizado de acordo com seu poder coagulante (tabela 2);
- O ponto de corte foi observado pelos métodos usuais e a coalhada cortada em grãos de aproximadamente 1-2 cm de aresta (grão 1), com auxílio de lira.
- Após o corte, a massa foi mantida em repouso por 5 minutos, e então, submetida a agitação lenta até obtenção do ponto (aproximadamente 30-40 minutos);
- A enformagem foi realizada em formas próprias para queijo Minas Frescal (1000g), o queijo virado por 2 vezes e depois armazenado nas próprias formas até o dia seguinte;
- Os queijos resultantes de cada fabricação foram pesados, embalados em sacos plásticos impermeáveis e armazenados em câmaras frigoríficas com temperaturas de $12\pm 1^\circ\text{C}$ e 90% de umidade relativa (UR).

O esquema de fabricação utilizado pode ser observado no fluxograma de fabricação como ilustrado na figura 1.

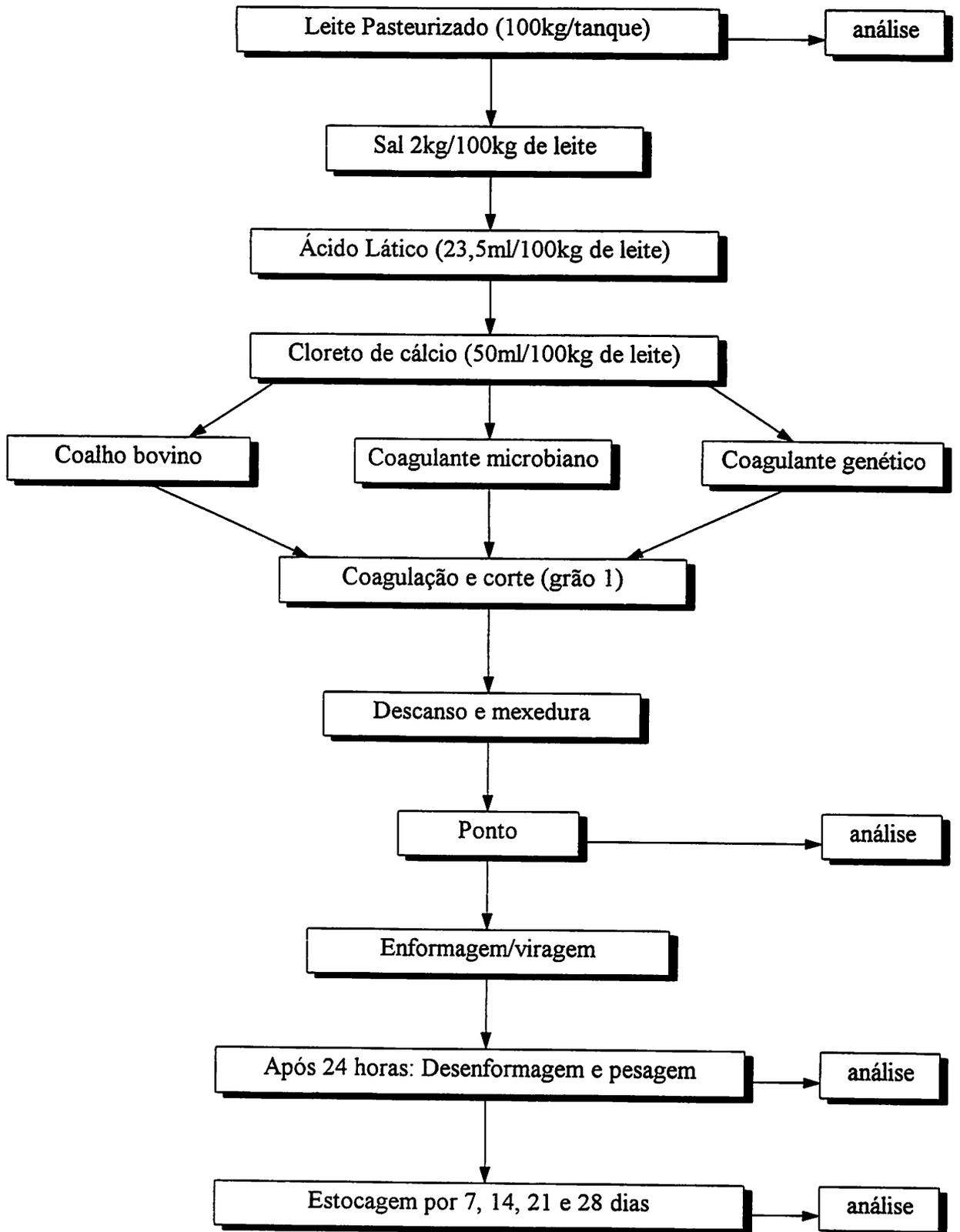


FIGURA 1 - Fluxograma de fabricação do queijo Minas Frescal

3.3 Análises

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Físico-química e Microbiologia do ILCT e do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

3.3.1 Análise do coalho

A atividade coagulante dos coalhos foi determinada pela metodologia proposta por Wolfschoon-Pombo (1980), conforme descrita a seguir:

- Foram diluídas 100 mg do coalho em 100 ml de água destilada (1);
- Desta solução, 5 ml foram adicionadas sob agitação constante à 100 ml de leite desnatado reconstituído a 9% de sólidos totais (ST);
- Leite e coalho foram mantidos a 35°C sob agitação lenta e contínua, até aparecimento de grumos finos;
- Foi cronometrado e anotado o tempo decorrido entre a adição do coalho e o início da floculação para utilização na fórmula que prediz a força do coalho.

$$FC = \frac{V \times 2.400.000}{C \times T}$$

Sendo:

FC = Força do coalho.

V = Volume de leite utilizado.

C = mg de coalho contido em (1).

T = Tempo em minutos decorrido entre a adição do coalho e início da floculação.

3.3.2 Análises do leite pasteurizado

O leite utilizado em cada repetição foi analisado em suas características físico-químicas, contagem de coliformes totais e fecais e bactérias mesófilas e psicrófilas.

3.3.2.1 Acidez titulável

As amostras foram analisadas utilizando o método da titulação com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), com a utilização do indicador fenolftaleína. (Brasil, 1981).

3.3.2.2 pH

As medidas de pH foram determinadas com o auxílio de pH-metro da marca Hanna modelo 8341, previamente calibrado, com imersão direta do potenciômetro na amostra.

3.3.2.3 Gordura

As percentagens de gordura dos leites foram determinadas pelo método butirométrico de Gerber, segundo técnica descrita por (Brasil, 1981). Utilizou-se para esta análise butirômetros e centrífuga da marca Original Gerber.

3.3.2.4 Sólidos Totais

Para determinação da umidade, foi adotada o método de secagem em estufa a 105°C, modelo 315-SE, FANEM, conforme metodologia descrita na (A.O.A.C., 1995).

3.3.2.5 Umidade

Foi determinada por diferença (A.O.A.C., 1995), utilizando-se a fórmula:

$$\text{Umidade} = 100 - \text{sólidos totais.}$$

3.3.2.6 Densidade

Foi utilizada a leitura direta em termolactodensímetro segundo Quevene, previamente calibrado, corrigindo-se o efeito da temperatura, como recomendado por (Brasil, 1981).

3.3.2.7 Determinação dos teores de Nitrogênio Total (NT) e Proteína Total (PT)

O método utilizado foi o Kjeldahl, segundo metodologia descrita por (Gripon et al., 1975). As amostras foram digeridas em bloco aquecedor da marca SARGE, modelo 40-25 e destiladas em equipamento TECNAL, modelo TE 036/1. O fator utilizado para conversão dos teores de nitrogênio para proteína bruta foi 6,38 (Kosikowski, 1977).

3.3.2.7 Determinação do Nitrogênio solúvel em TCA 12%

As amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 24%, obtendo-se concentração final de 12% e filtradas em papel de filtro WHATMAN 42. O nitrogênio contido nesta solução foi denominado nitrogênio não proteico, que foi então determinado pelo método Kjeldahl descrito por (Gripon et al., 1975). O fator utilizado foi 3,60.

3.3.2.8 Contagem padrão de mesófilas e psicrófilas

Após diluição seriada, as amostras foram semeadas em Agar Plate Count (agar padrão), e incubadas em estufa a 32°C/48 horas para mesófilas e 9°C/7 dias para psicrófilas, como recomendado por (Brasil, 1981).

3.3.2.9 Coliformes totais e fecais

Foi utilizada a técnica do número mais provável (NMP/ml), conforme metodologia preconizada por (Brasil, 1981). Foram realizadas diluições seriadas e as amostras distribuídas em tubos múltiplos de caldo verde bile brilhante e caldo E.C. e incubadas a 35 e 45°C/48 horas para coliformes totais e fecais respectivamente.

3.4 Análises do soro

As amostras do soro foram retiradas no momento do ponto de enformagem em todos os tratamentos e repetições. As análises foram realizadas em duplicata seguindo metodologia já descrita em 3.4., para os itens acidez, pH, gordura, sólidos totais, umidade, densidade, proteína total e nitrogênio total e solúvel em TCA a 12%. A porcentagem de cloreto de sódio foi determinada por titulação com tiocianato de potássio a 0,1N, como descrito pela (A.O.A.C., 1995).

3.5 Cálculos das porcentagens de transição de gordura e proteína bruta para o queijo

Para o cálculo das cifras de transição, foram consideradas as perdas dos constituintes no soro, sendo a transição para o queijo obtida por diferença. A metodologia utilizada foi a descrita

por Folegatti (1994), com pequenas modificações, para compensar os efeitos da salga diretamente no leite. O cálculo foi realizado da seguinte forma:

1. o volume de leite utilizado em cada fabricação, foi obtido dividindo-se a massa do leite pela sua densidade;
2. o volume de gordura ou proteína foi obtido multiplicando-se o volume total de leite pela sua quantidade percentual ;
3. a massa do soro foi obtida somando-se a massa do leite mais a massa do sal e subtraindo-se destes a massa dos queijos obtidos;
4. a massa do soro foi dividida por sua densidade resultando no volume total, que foi então multiplicado pela percentagem de gordura ou proteína, obtendo-se a quantidade do constituinte perdida no soro;
5. foi realizada a relação entre o volume de gordura ou proteína do soro e o volume de gordura ou proteína do leite, obtendo-se então a perda dos constituintes no soro;
6. o resultado obtido foi subtraído de 100, obtendo-se a transição do constituinte para o queijo.

3.6 Rendimento das fabricações

Os cálculos foram realizados conforme descrição de Folegatti (1994) para expressão do rendimento em litros (L) leite/kg de queijo e gramas (g) de ST de queijo/L de leite.

3.6.1 Litros de leite / kg de queijo (L/kg)

Foram calculados pela divisão do volume do leite empregado no processamento pela soma da massa dos queijos obtidos.

3.6.2 Gramas de sólidos totais de queijo / litro de leite (g ST/L)

Foram calculados transformando-se a % de sólidos totais (ST) em gST/1000g, obtendo-se assim a massa em gramas de ST por 1 kg de queijo. Dividindo-se a massa de ST/kg de queijo, pelo rendimento em litros de leite/kg de queijo, obtivemos o rendimento em gramas de ST de queijo/litro de leite.

3.7 Análises dos queijos

Os queijos resultantes de todos os tratamentos em todas repetições foram amostrados como recomendados pela norma FIL-IDF 50A, 1982 (Wolfschoon-Pombo et al., 1983). Todas as determinações foram realizadas em duplicata

3.7.1 Gordura

As determinações foram realizadas pelo método butirométrico de Gerber (A.O.A.C., 1995). A centrífuga e os butirômetros utilizados foram da marca Original Gerber.

3.7.2 Sólidos Totais

A metodologia utilizada foi a descrita na seção 16.217 da (A.O.A.C., 1995). Para as determinações foram utilizadas estufas de secagem (modelo 315-SE FANEM) a 105°C,

3.7.3 pH

Foi utilizado pH-metro Hanna 8314, previamente calibrado, sendo a leitura realizada com inserção do potenciômetro diretamente nos queijos.

3.7.4 Umidade

A porcentagem de umidade foi calculada por diferença: Umidade = 100% - porcentagem de sólidos totais no queijo.

3.7.5 Gordura no extrato seco (G.E.S.)

Foram utilizadas as massas médias de gordura correspondente a 100 g de queijo por 100 g de sólidos totais. O valor resultante foi dividido pela massa média de sólidos totais referentes a 100 g de queijo, e o resultado expresso como porcentagem (%) de gordura no extrato seco (Folegatti, 1994).

3.7.6 Cloreto de sódio

Foi utilizado o método de titulação com tiocianato de potássio a 0,1N (A.O.A.C, 1995).

3.7.7 Nitrogênio total (NT) e Proteína Total (PT)

As amostras de queijo previamente liquidificadas com citrato de sódio 0,5M foram filtradas (Gripon et al., 1975) e digeridas em bloco aquecedor/digestor SARGE, modelo 040/25, e destiladas em equipamento TE 036, da TECNAL (método Kjeldahl). Os teores de proteína total foram obtidos multiplicando-se os valores médios da porcentagem de nitrogênio total pelo fator 6,38 (Kosikowski, 1977).

3.7.8 Acidez

Foi utilizada a técnica preconizada por Brasil (1981), sendo as amostras tituladas com NaOH 0,1 N , e os resultados expressos em % de ácido láctico.

3.8 Proteólise dos queijos

As análises em duplicata foram realizadas após armazenamento por 1, 8, 15, 22 e 29 dias a $12\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.8.1 Fracionamento do nitrogênio total

Todas as determinações foram realizadas utilizando-se para digestão, bloco aquecedor da marca SARGE, modelo 40-25 e destilação em equipamento TECNAL, modelo TE-036.

3.8.1.1 Nitrogênio solúvel a pH 4,6 (NS)

As amostras previamente solubilizadas em citrato de sódio 0,5M foram precipitadas com ácido clorídrico 1,41 N até pH 4,6 e a mistura filtrada em papel de filtro Whatman n° 42. O nitrogênio presente nesta solução é o nitrogênio solúvel, determinado pelo método de Kjeldahl como descrito por (Gripon et al., 1975).

3.8.2 Cálculo dos índices de extensão da proteólise

Os métodos e fórmulas utilizados foram os propostos por Wolfschoon-Pombo e Lima (1989). Para índice de extensão da proteólise foram utilizados os teores de nitrogênio total e

nitrogênio solúvel previamente descritos nos itens 3.8.7 e 3.9.1.1., e os índices obtidos pela fórmula: $\text{Extensão} = \text{NS} \times 100 / \text{NT}$.

3.8.3 Índice dos aminoácidos Tirosina (Tyr) e Triptofano (Trp)

Foram determinados pelo método proposto por (Vakarelis e Price, 1959). A fração solúvel obtida no item 3.9.1.1. foi diluída em água destilada na proporção 1:1 e submetida a leitura em espectrofômetro BECKMAN modelo DU-64 0B. A determinação foi nos comprimentos de onda de 270 a 290 nm, e a concentração do aminoácido (mg/100g de queijo) calculados pelas fórmulas:

$$\text{Tyr} = 906 (0,95 \times A_{270} - 1,31 \times A_{290})$$

$$\text{Trp} = 1021 (0,307 \times A_{290} - 0,020 A_{270})$$

Onde:

A_{270} = leitura da absorvância a 270 nm

A_{290} = leitura da absorvância a 290 nm

Tyr = teor de tirosina em mg/100g de queijo

Trp = teor de triptofano em mg/100g de queijo

3.9 Análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos completos casualizados (DBC), em estrutura fatorial 3 x 5, com 3 repetições, com desdobramento dos graus de liberdade em dois fatores: tipo de coalho e período de armazenamento. A análise de variância foi realizada, fazendo-se as comparações entre médias pelo teste de Tukey a 1 e 5% de probabilidade. Foram realizadas análises de regressão linear para os itens quantitativos. Para a análise sensorial no teste de

aceitação, foi realizado análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste de Tukey. Para o teste de perfil modificado, foi utilizado análise de variância, comparação de médias e estabelecidas equações de regressão para cada atributo avaliado.

3.10 Análise sensorial

A avaliação sensorial foi realizada através de um teste de aceitação, utilizando-se ficha de resposta contendo escala hedônica estruturada de 9 pontos (figura 2), conforme descrito por (Chaves, 1990). Foram analisados os queijos produzidos com os 3 tipos de coalhos (bovino, microbiano e genético), submetidos aos 5 períodos de armazenamento. Os testes foram realizados, oferecendo-se as amostras na forma de cubos, em pratos devidamente codificados e à temperatura ambiente, para consumidores potenciais, sendo que cada tratamento foi avaliado por cerca de 90 provadores. Além do teste de preferência, para uma melhor avaliação de características isoladas, foi aplicado o teste quantitativo descritivo de perfil modificado, que fornece um meio sistemático definido de se avaliar o nível de qualidade do produto, refletindo a importância comparativa dos diversos termos que devem ser levados em consideração (Chaves, 1990). As características avaliadas foram coloração da casca, acidez e gosto amargo (figura 3).

TESTE DE ACEITAÇÃO - ESCALA HEDÔNICA

NOME: _____ DATA: ___/___/___

CÓDIGO DA AMOSTRA: _____

Por favor, avalie a amostra utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a posição da escala que melhor reflita seu julgamento.

- 9 - Gostei extremamente
- 8 - Gostei muito
- 7 - Gostei moderadamente
- 6 - Gostei ligeiramente
- 5 - Indiferente
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 3 - Desgostei moderadamente
- 2 - Desgostei muito
- 1 - Desgostei extremamente

Comentários:

FIGURA 2 - Ficha de resposta do Teste de aceitação.

ANÁLISE POR PERFIL MODIFICADO

NOME: _____ DATA: ___/___/___

CÓDIGO DA AMOSTRA: _____

Por favor, escreva seu nome, data e código da amostra nesta ficha de avaliação. Analise cada amostra e preencha as respostas na sequência em que aparecerem na ficha, fazendo um traço vertical na linha, na posição (ponto) que melhor reflita seu julgamento. Prove quantidade suficiente da amostra e disponha do tempo necessário para avaliar cada característica. Por favor, enxague a boca após a avaliação de cada amostra.

Atributos:

COR AMARELADA

_____ / _____ / _____
 Ausente Acentuada

GOSTO AMARGO

_____ / _____ / _____
 Ausente Forte

ACIDEZ

_____ / _____ / _____
 Típica Atípica

FIGURA 3 - Ficha para avaliação sensorial descritiva dos queijos tipo Minas Frescal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado

A composição do leite é um dos principais fatores interferentes no rendimento e na qualidade de queijos. Enquanto teores de proteínas (caseína) e gorduras são decisivas no rendimento, a acidez titulável é importante no processo de coagulação do leite e sinérese da coalhada. As características físico-químicas do leite influenciam portanto, na composição final do queijo (Kammerlhener, 1994; Kosikowski, 1982). Os dados relativos à composição média dos leites utilizados nos três dias de processamento encontram-se na tabela 3. As diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas, com exceção dos teores de sólidos totais ($p < 0,05$), que foram porém, compensados pelo uso do delineamento em blocos. A composição média do leite encontra-se dentro dos limites preconizados pela legislação e literatura (Jenness, 1988 ; Brasil, 1980).

TABELA 3 - Resultados médios* da composição do leite utilizado para fabricação do queijo com o coalho bovino e coagulantes genético e microbiano.

| DETERMINAÇÕES | TRATAMENTOS | | |
|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Bovino | Genético | Microbiano |
| Acidez (°D) | 15,83 ^a | 15,75 ^a | 15,75 ^a |
| Gordura (%) | 2,93 ^a | 2,88 ^a | 2,93 ^a |
| Sólidos totais (%) | 11,51 ^{ab} | 11,45 ^b | 11,63 ^a |
| Densidade (g/l) | 1032,30 ^a | 1032,37 ^a | 1032,40 ^a |
| Proteína bruta (%) | 3,07 ^a | 3,06 ^a | 3,03 ^a |

* médias obtidas de 3 observações

^{a,b} médias são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Além das análises composicionais foram determinados os índices de nitrogênio solúvel em TCA 12% (tabela 4), para acompanhamento da degradação protéica no leite antes da coagulação. Em todas as amostras não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$).

TABELA 4 - Resultados médios* dos Índices de Nitrogênio Solúvel em TCA 12% do leite utilizado para fabricação dos queijos Minas Frescal

| TRATAMENTOS | Nitrogênio solúvel em TCA a 12% |
|--------------------|--|
| Microbiano | 0,3192 ^a |
| Bovino | 0,3172 ^a |
| Genético | 0,3146 ^a |

* média de 3 determinações

a,b... ($p < 0,05$)

De acordo com Fox e Law (1991), um dos fatores que contribuem para a proteólise de queijos é a flora natural do leite. Para garantir a não influência deste fator, foram realizadas análises microbiológicas dos leites utilizados. Os itens analisados foram contagem padrão de mesófilas, contagem de psicrótróficos e coliformes totais e fecais. Em nenhuma das amostras, foram detectadas presença de coliformes totais e fecais (Número mais provável-NMP $< 0,03/\text{ml}$), a contagem de psicrótróficas de todas as amostras foram menores que 10 UFC/ml ($< 1,0 \times 10^1$) e a contagem padrão de mesófilas encontrou-se na ordem de 10^4 UFC/ml, não tendo sido detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$), conforme ilustrado na tabela 5.

TABELA 5 - Resultados médios * das análises microbiológicas do leite utilizado para fabricação dos queijos Minas Frescal

| DETERMINAÇÕES | TRATAMENTOS | | |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Bovino | Genético | Microbiano |
| Contagem Padrão Mésofilas | 2,87x10 ⁴ a | 2,92 ⁴ a | 2,63 ⁴ a |
| Contagem Padrão Psicrófilas | $< 1,0 \times 10^1$ a | $< 1,0 \times 10^1$ a | $< 1,0 \times 10^1$ a |
| Coliformes totais | $< 1,0 \times 10^1$ a | $< 1,0 \times 10^1$ a | $< 1,0 \times 10^1$ a |
| Coliformes fecais | $< 1,0 \times 10^1$ a | $< 1,0 \times 10^1$ a | $< 1,0 \times 10^1$ a |

* média de 3 repetições

a,b... ($p < 0,05$)

4.2 Coagulação e ponto da massa

Foram observadas diferenças no tempo de coagulação do leite pelos 3 agentes coagulantes, mesmo utilizando-se quantidades padronizadas dos coalhos baseados em sua atividade. O coalho que apresentou maior tempo de coagulação foi o genético (tabela 6), o que discorda dos resultados obtidos por Medina et al. (1991) em queijos Burgo e Hispânico e Nunez et al. (1991) em queijo Manchego, onde os autores obtiveram os menores tempos de coagulação utilizando o coalho genético. Todavia Van Den Berg e Koning (1990), comparando os tempos de coagulação do leite por coalho genético e de vitelo em queijo Gouda encontraram tempos ligeiramente mais altos de coagulação para o genético. O maior tempo de coagulação quando do uso do coalho genético pode ser explicado. Todos os experimentos realizados para comparação da atividade do coalho genético com outros agentes coagulantes têm sido conduzidos em queijos que utilizam fermento láctico e salga em salmoura, no presente trabalho utilizou-se a salga diretamente no leite antes da adição do coalho. Cloreto de sódio é sem dúvida, um fator inibidor da coagulação enzimática pela quimosina, já que possui ação conformacional na estrutura primária da κ -caseína (Dalglish, 1987). Sendo o coalho bovino composto de 20% de quimosina e 80% de pepsina, o microbiano composto de proteases inespecíficas diferentes capazes de induzir à coagulação do leite de forma semelhante à renina e o genético contendo 100% de quimosina, é de se esperar um maior efeito do sal sobre o terceiro. Avaliando o efeito do NaCl na coagulação do leite Fox (1988), afirma que concentrações maiores que 3 mN inibem a coagulação pela quimosina, já que influência significativamente nas interações eletrostáticas necessárias para a formação do complexo quimosina-substrato. A adição de 2% de cloreto de sódio ao leite corresponde a uma concentração de 0,35 mN e portanto capaz de influenciar negativamente a coagulação do leite pela quimosina.

TABELA 6 - Tempos médios* em minutos para coagulação do leite pelo coalho bovino e coagulantes genético e microbiano

| Tipo de agente coagulante | Tempo médio (min.) |
|----------------------------------|---------------------------|
| Genético | 54,67 ^a |
| Bovino | 40,00 ^b |
| Microbiano | 36,67 ^b |

* médias obtidas de 3 observações

^{a,b} (p<0,05)

O ponto de enformagem do queijo foi obtido por meios subjetivos, variando de 30 a 40 minutos nas diferentes fabricações, como exemplificado na tabela 7. As variações são decorrentes provavelmente, da menor eficiência na ação do coalho genético na coagulação do leite, devido a presença de sal no leite. Além disso, devido ao fato do ponto ser verificado por meios subjetivos e o pequeno número de repetições, estes resultados não devem ser considerados como definitivos. Um maior tempo de fabricação é esperado com o uso de ácido láctico, já que a acidez do coágulo é menor que em queijos obtidos com uso de fermento láctico. Com menor quantidade de ácido retido nos grãos, a expulsão do soro é mais lenta, tendendo a reter maior umidade (Munck e Souza, 1980). Diversos autores que estudaram o tempo de fabricação de queijos utilizando diferentes tipos de coagulantes, obtiveram tempos ligeiramente menores quando utilizaram coalho de vitelo e genético em comparação com outros agentes (Broome e Hickey, 1990; Medina et al., 1992; Nunez et al., 1992). Todavia, todos estes estudos foram realizados em queijos que não utilizam salga direta no leite, e além disso são variedades maturadas com uso de fermento láctico tornando difícil a correlação.

TABELA 7 - Tempos médios* em minutos gastos até o ponto de enformagem dos queijos fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano

| Tipo de agente coagulante | Tempo médio* (minutos) |
|----------------------------------|-------------------------------|
| genético | 42,67 ^a |
| bovino | 34,67 ^{ab} |
| microbiano | 29,67 ^b |

* média de 3 repetições

^{a,b} (p<0,05)

4.3 Análises do Soro

Foram realizadas análises físico-químicas no soro, para verificação das perdas ocorridas durante a fabricação dos queijos. Segundo tendência atual, o cálculo através da composição do leite e das perdas no soro é o melhor método para determinação dos componentes que ficaram retidos na coalhada.

A análise na composição do soro (tabela 8) não detectou diferenças significativas para os itens acidez, pH, densidade, proteína total, sólidos totais e umidade, porém houve diferença ($p < 0,05$) para o teor de cloreto de sódio, sendo que o soro do queijo fabricado com o coalho bovino apresentou a menor percentagem média de sal 2,02%. Chiappini e Santos (1995) analisando 30 amostras de soro resultantes da fabricação do queijo Minas Frescal, encontraram resultados semelhantes, sendo que as perdas de sólidos totais, gordura, acidez e pH foram ligeiramente superiores aos encontrados no presente trabalho. Os itens que apresentaram resultados maiores que os encontrados pelos autores, foi a perda de proteína total e a percentagem de cloreto de sódio, porém no mesmo trabalho, os autores comentam a grande variabilidade das determinações isoladas que resultaram na média final.

No soro dos queijos fabricados com o coalho microbiano, foram observadas as menores perdas para sólidos totais e teores de gordura (8,78% e 0,32% respectivamente), que mesmo não sendo significativos ($p > 0,05$) são importantes, já que serão utilizados nos cálculos de transição dos constituintes do leite para o queijo. Todos os valores de sólidos totais obtidos, assim como os da densidade, devem ser observados levando-se em conta os teores de cloreto de sódio, já que o método de salga utilizado foi o de adição do sal diretamente no leite, uma maior percentagem de cloreto de sódio implica diretamente em aumento nos índices de densidade e sólidos totais. Além da composição, foi também realizada análise do nitrogênio solúvel em TCA a 12% (NNP), visando avaliar diferenças na degradação protéica ainda no tanque de fabricação, os resultados não diferiram estatisticamente a 5%, conforme pode ser observado na tabela 8.

TABELA 8 - Resultados médios* da composição do soro das fabricações dos queijos com o coalho bovino e coagulantes genético e microbiano

| DETERMINAÇÕES | TRATAMENTOS | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | Bovino | Genético | Microbiano |
| Acidez (°D) | 11,67 ^a | 11,75 ^a | 11,67 ^a |
| pH | 6,17 ^a | 6,15 ^a | 6,17 ^a |
| Sólidos totais (%) | 8,81 ^a | 8,87 ^a | 8,78 ^a |
| Densidade (g/l) | 1041,95 ^a | 1041,95 ^a | 1042,2 ^a |
| Cloreto de sódio (%) | 2,02 ^b | 2,26 ^a | 2,24 ^a |
| Gordura (%) | 0,40 ^a | 0,38 ^a | 0,32 ^a |
| Proteína total (%) | 0,997 ^a | 0,990 ^a | 0,993 ^a |
| NNP | 0,379 ^a | 0,375 ^a | 0,375 ^a |

* médias obtidas de 3 observações

^{a,b} (p<0,05)

4.4 Análise dos Queijos

4.4.1 Composição

A composição dos queijos nos diferentes períodos de armazenamento encontram-se na tabela 9, sendo que após o armazenamento as alterações são consequência das variações na umidade dos queijos. Com 1 dia de fabricação os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se próximos da encontrada por Furtado, Souza e Munck (1980) em queijos Minas Frescal fabricados sem a utilização de culturas lácteas. Pode-se observar uma alta umidade nos queijos, com consequente diminuição nos teores de sólidos totais, o que também aconteceu no experimento conduzido pelos autores, que compararam queijos Minas frescal fabricados com o uso de fermento e ácido láctico.

A alta umidade de queijos fabricados com ácido láctico pode ser explicada pelo elevado pH da massa quando comparada a queijos fabricados com fermento láctico. Com o pH mais elevado, a massa mantém-se mais calcificada, portanto mais porosa, facilitando a retenção de água, o que diluiria a matéria seca total.

TABELA 9 - Resultados médios da composição dos queijos Minas Frescal armazenados por 1, 8, 15, 22 e 29 dias a 12°C.

| UMIDADE (%) | | | | | | |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| Tratamentos | Armazenamento (dias) | | | | | Média |
| | D+1 | D+7 | D+14 | D+21 | D+28 | |
| Bovino | 67,05 a | 60,63 a | 57,67 a | 57,27 a | 57,73 a | 60,07 A |
| Genético | 66,05 a | 58,52 a | 56,55 a | 57,86 a | 55,91 a | 58,78 B |
| Microbiano | 65,54 a | 60,25 a | 58,94 a | 57,27 a | 56,57 a | 59,72 AB |
| GORDURA (%) | | | | | | |
| Bovino | 15,42 a | 18,17 a | 19,50 a | 19,75 a | 20,42 a | 18,65 B |
| Genético | 15,58 a | 19,00 a | 20,25 a | 20,42 a | 21,25 a | 19,30 A |
| Microbiano | 15,33 a | 18,08 a | 19,58 a | 20,17 a | 20,58 a | 18,75 AB |
| SÓLIDOS TOTAIS (%) | | | | | | |
| Bovino | 32,95 a | 39,37 a | 42,33 a | 42,73 a | 42,27 a | 41,19B |
| Genético | 33,95 a | 41,64 a | 43,45 a | 43,14 a | 43,80 a | 40,31A |
| Microbiano | 34,46 a | 39,75 a | 41,06 a | 42,73 a | 43,53 a | 39,93AB |
| PROTEÍNA BRUTA (%) | | | | | | |
| Bovino | 17,80 a | 19,86 a | 14,61 a | 15,75 a | 17,25 a | 17,06B |
| Genético | 18,01 a | 19,14 a | 16,61 a | 16,56 a | 17,70 a | 17,60AB |
| Microbiano | 17,44 a | 19,46 a | 18,24 a | 16,58 a | 17,11 a | 17,76A |
| GORDURA NO EXTRATO SECO (%) | | | | | | |
| Bovino | 46,81 a | 46,19 a | 46,07 a | 46,22 a | 48,31 a | 46,72A |
| Genético | 45,95 a | 45,62 a | 46,56 a | 47,33 a | 48,51 a | 46,80A |
| Microbiano | 44,50 a | 45,51 a | 47,71 a | 46,48 a | 47,40 a | 46,32A |
| CLORETO DE SÓDIO (%) | | | | | | |
| Bovino | 1,79 ^b | 1,33 ^{ab} | 1,48 ^a | 1,60 ^a | 1,76 ^a | 1,59A |
| Genético | 1,93 ^{ab} | 1,41 ^a | 1,37 ^a | 1,39 ^b | 1,47 ^b | 1,51B |
| Microbiano | 2,08 ^a | 1,23 ^b | 1,39 ^a | 1,40 ^b | 1,39 ^b | 1,50B |

a,b...médias de 3 repetições dentro de cada período de armazenamento são diferentes ($p < 0,05$)

A,B... médias gerais dos 5 períodos são diferentes ($p < 0,05$)

As maiores porcentagens de umidade nos queijos após 1 dia de armazenamento ($p>0,05$) foram encontradas nos queijos fabricados com coalho bovino, seguidos dos fabricados com os coagulantes genético e microbiano (tabela 9). Os maiores teores de umidade quando do uso do coalho bovino estão de acordo com os resultados obtidos por Folegatti (1994) em queijo Prato, Disegna et al. (1991) em queijo Montasio, Broome e Hickey (1990), Corradini et al. (1990) e Van Den Berg e Koning (1990), para queijos Cheddar, Grana e Gouda respectivamente, que compararam queijos fabricados com diferentes tipos de agentes coagulantes, porém, deve-se levar em consideração que estes autores estudaram variedades maturadas, com uso de fermento láctico e salmoura, o que dificulta estabelecer paralelos entre os experimentos. O efeito da umidade nos teores de sólidos totais também influenciaram nos cálculos de rendimento em litros de leite/kg de queijo.

A alta umidade dos queijos de todos os tratamentos é também consequência da tecnologia de fabricação utilizada, que adotou o corte lento em grãos grandes, submetidos à agitação suave, visando evitar perdas de proteína e gordura no soro, o tamanho dos grãos pode ser observado na figura 4. Com grãos grandes, o ponto foi ligeiramente mais macio, levando a uma maior retenção de água no queijo. Na estocagem porém, com a evolução da acidez houve dessora após embalagem e os teores de umidade diminuíram tornando-se próximos aos preconizados para queijo Minas Frescal, que segundo os padrões do Instituto de Laticínios Cândido Tostes é 60-63% (Vargas, 1996).



FIGURA 4 - Fotografia evidenciando o tamanho dos grãos do queijo Minas Frescal durante mexedura.

As variações na umidade decorrentes do armazenamento ($p < 0,05$), assim como o gráfico de regressão para cálculo dos valores em outros períodos estão ilustrados na figura 5.

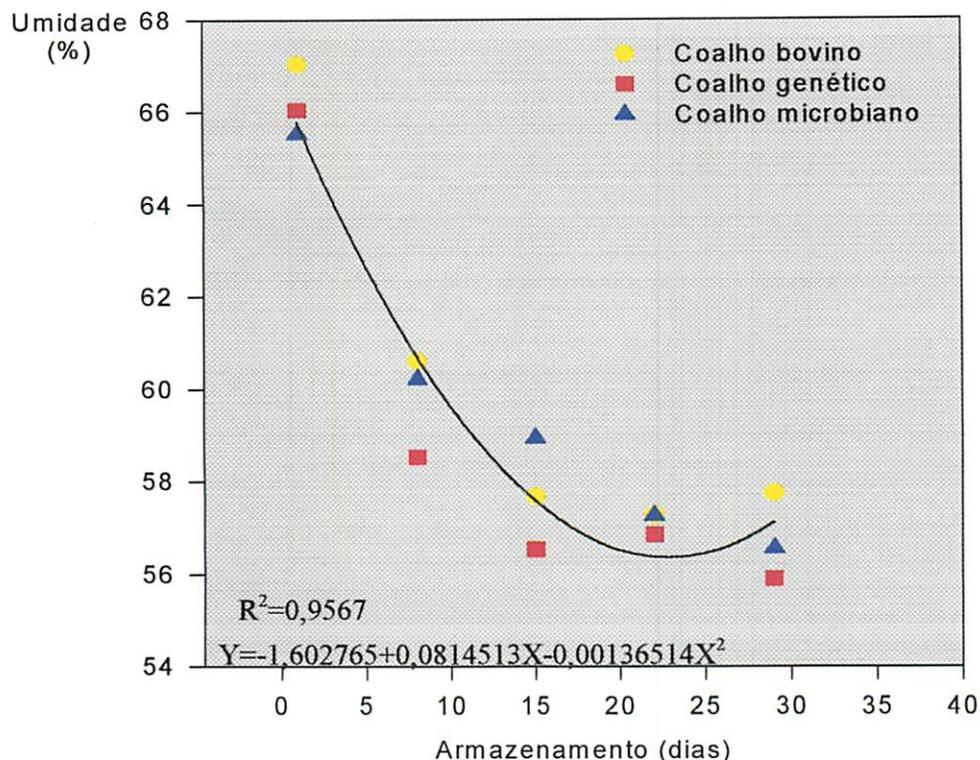
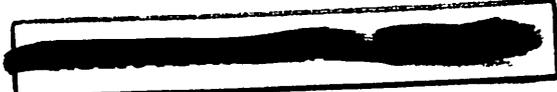


FIGURA 5 - Gráfico de regressão evidenciando as variações na umidade dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento.

Os teores médios da porcentagem de gordura com 1 dia de armazenamento foram superiores ($p > 0,05$) para os queijos fabricados com o coalho genético (tabela 9). De acordo com Barbano e Rasmussen (1992) a retenção de gordura na massa é mecânica, associada à estrutura do coágulo. Sendo os coalhos bovino e microbiano mais inespecíficos, devido à menor concentração de quimosina, a ação destes na cadeia peptídica é mais severa, dificultando a retenção mecânica da gordura no coágulo. Houve diferenças significativas na média dos diferentes períodos de *armazenamento*, porém estas variações são provavelmente consequência das variações na



porcentagem de umidade dos queijos (diluição do percentual), já que a gordura no extrato seco não diferiu nos diferentes tratamentos.

Os teores médios de nitrogênio total e conseqüentemente proteína bruta (tabela 9) nos queijos fabricados com os diferentes coalhos apresentaram diferenças ($p < 0,05$). Os maiores teores médios de proteína bruta nos queijos fabricados com o coalho microbiano (17,76%), diferem pouco em valores absolutos com os fabricados com coalho genético (17,60%) e bovino (17,06%). Observando-se os valores dos queijos fabricados com 1 dia, e portanto, não influenciado pelas variações da umidade durante a estocagem, pode-se constatar porém, que o coalho genético apresentou o maior resultado médio (18,01%), fato esperado devido sua maior especificidade (Fox, 1988 ; Harboe, 1992). Folegatti (1994) e Barbano e Rasmussen (1992), não encontraram diferenças significativas nos teores de proteína total em queijos fabricados com coalho bovino, de vitelo e obtido por fermentação, deve-se atentar entretanto, que estes autores trabalharam com variedades de queijos maturados e com uso de fermento láctico. Uma melhor avaliação destes fatores poderá ser obtida na análise da transição de proteínas, fracionamento do nitrogênio total e rendimento, que serão discutidos posteriormente.

A acidez e pH de queijos são atributos importante na aceitabilidade de queijo Minas Frescal, sendo necessária sua relação com outros fatores como índices de proteólise e testes sensoriais. Os tratamentos influenciaram na acidez titulável (ácido láctico/100g de queijo), sendo que o conhecimento destes índices nos diferentes períodos de armazenamento (figura 6), poderá ser fator importante para a determinação da vida de prateleira do queijo.

O armazenamento influenciou a acidez dos queijos, já que o queijo Minas Frescal sem uso de fermento láctico possui quantidade suficiente de lactose necessária para produção de ácido láctico, aumentando gradualmente até 29 dias de estocagem, podendo ser calculada nos diferentes períodos através da equação de regressão, como demonstrado na figura 7.

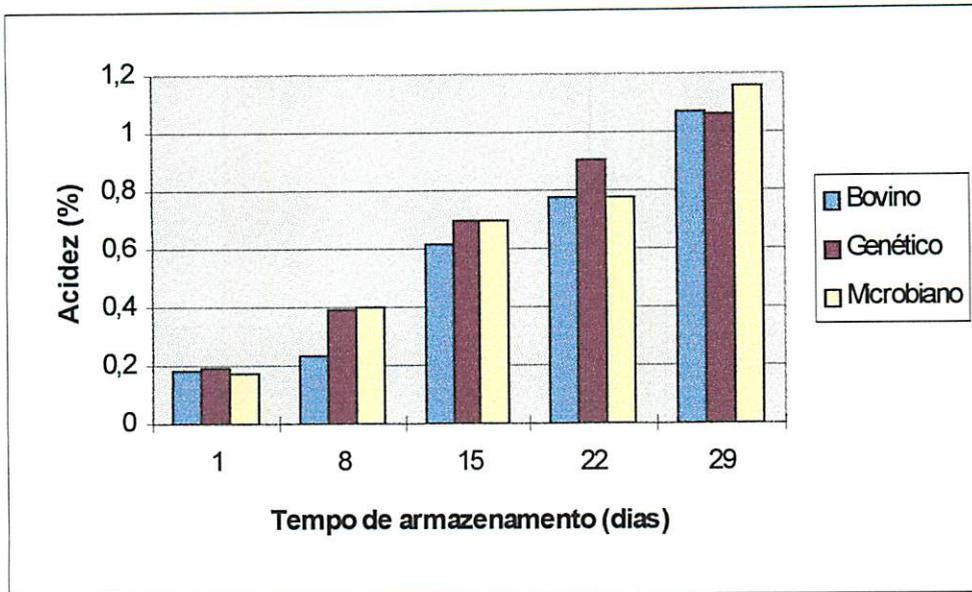


FIGURA 6 -Variações na acidez em ácido láctico (%) dos queijos Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano durante armazenamento.

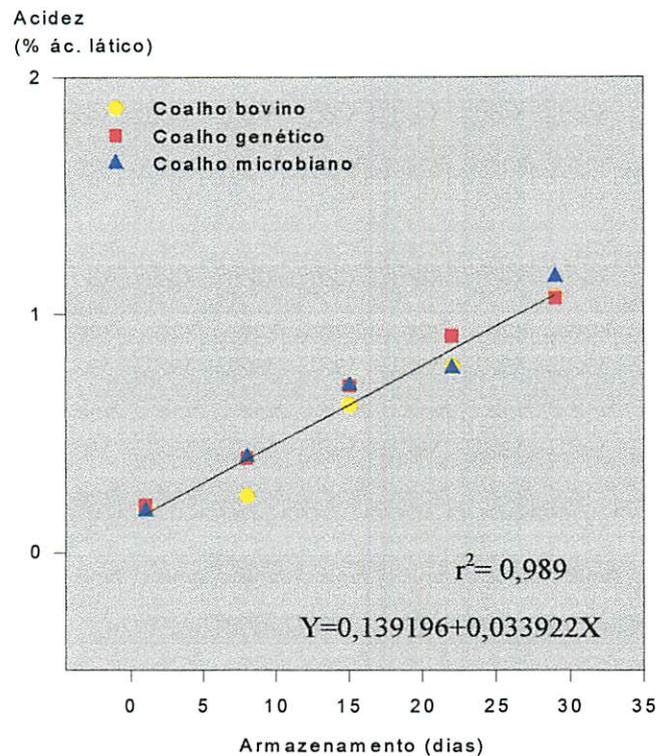


FIGURA 7 - Gráfico de regressão evidenciando as variações na acidez em ácido láctico dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento.

Os teores de ácido láctico nos diferentes períodos de armazenamento foram semelhantes aos encontrados por Furtado, Souza e Munck (1980), em 1 e 6 dias de armazenamento, porém inferiores aos teores médios determinados por Isepon e Oliveira (1995) em queijos armazenados por 0, 6 e 12 dias, sendo que estes autores não determinaram os teores de umidade. Os resultados obtidos para pH diferiram ($p < 0,05$) para os queijos fabricados com os diferentes coalhos nos diferentes períodos de armazenamento como pode ser observado na tabela 10. Os maiores resultados médios obtidos para os queijos fabricados pelo coalho microbiano são provavelmente consequência do menor tempo de fabricação, já que a ação das enzimas presentes neste tipo de coalho não são tão dependentes do pH do leite quanto a pepsina presente no coalho bovino nem influenciadas pela presença de sal como no coalho genético.

TABELA 10 - Evolução no pH dos queijos Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano e armazenados por 1, 8, 15, 22 e 29 dias.

| Tipo de coalho | Armazenamento (dias) | | | | | Média |
|----------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 8 | 15 | 22 | 29 | |
| Bovino | 6,46 a | 5,89 a | 5,37 a | 5,18 a | 5,01 a | 5,56AB |
| Genético | 6,44 a | 5,77 a | 5,22 a | 5,02 a | 5,02 a | 5,49B |
| Microbiano | 6,48 a | 5,91 a | 5,26 a | 5,16 a | 5,10 a | 5,58A |

a,b...médias de 3 repetições são diferentes ($p < 0,05$)

A,B... médias gerais são diferentes ($p < 0,05$)

Os valores de pH diminuíram progressivamente até os 29 dias de armazenamento tendendo à estabilização, provavelmente pela diminuição da quantidade residual da lactose, sendo que o maior valor individual encontrado foi para o tratamento com o coalho microbiano e estocagem por 1 dia (6,48) e o menor para o queijo fabricado com coalho bovino com 29 dias de estocagem (5,01). O cálculo dos valores de pH em diferentes períodos de armazenamento podem ser realizados através da regressão (fig.8).

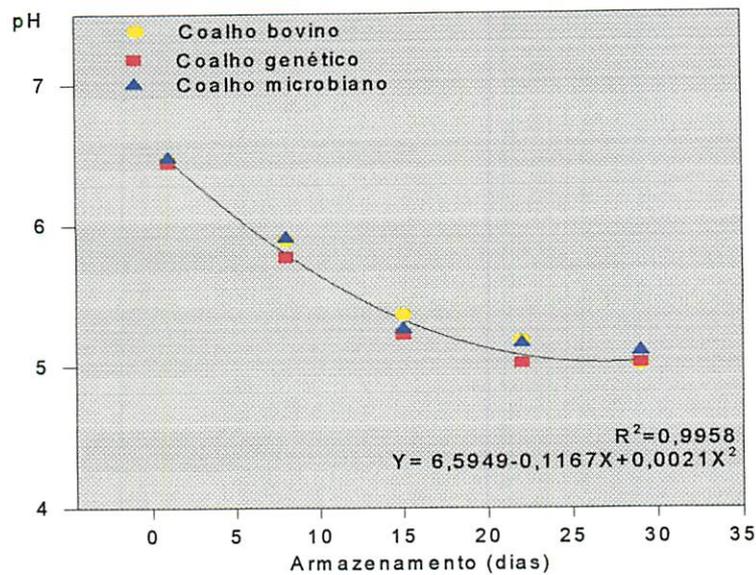


FIGURA 8 - Gráfico de regressão evidenciando as variações no pH dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento.

Os teores médios de cloreto de sódio (tabela 9) nos queijos fabricados com os diferentes coalhos encontram-se dentro dos esperados para o queijo Minas Frescal, que segundo padrões do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Vargas (1996), são de 1,40 a 1,60%, com exceção do dia 1 após a fabricação onde os valores encontrados variaram de 1,79 a 2,08% para os queijos produzidos com o coalho bovino e microbiano respectivamente. Provavelmente o maior teor percentual de cloreto de sódio é devido à maior umidade e conseqüente maior porção de água livre para dissolução do sal.

4.5 Transição dos constituintes para o queijo e rendimento

A tabela 11 apresenta as porcentagens de transição de gordura, sólidos totais e proteínas do leite para o queijo, assim como, os rendimentos de fabricação em litros de leite por quilo de

queijo (L/kg) e em gramas de sólidos totais de queijo por litro de leite (gST/L), nos diferentes tratamentos

TABELA 11 - Transição dos componentes do leite para o queijo e rendimentos das fabricações nos tratamentos com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano.

| DETERMINAÇÕES | TRATAMENTOS | | |
|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Bovino | Genético | Microbiano |
| Transição da gordura (%) | 89,44 ^a | 89,03 ^a | 91,10 ^a |
| Transição de ST (%) | 52,27 ^a | 51,80 ^a | 53,47 ^a |
| Transição proteínas (%) | 73,64 ^a | 72,88 ^b | 72,93 ^b |
| Rendimento (L/Kg) | 5,05 ^b | 5,47 ^a | 5,25 ^{ab} |
| Rendimento (gST/L) | 65,30 ^a | 62,02 ^a | 65,63 ^a |

* médias de 3 repetições

^{a,b} médias com o mesmo expoente não são diferentes ($p < 0,05$)

A transição de gordura e sólidos totais do leite para o queijo nos diferentes tratamentos não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$), porém os valores absolutos foram ligeiramente maiores para os queijos fabricados com o coalho microbiano, seguidos pelos tratamentos com coalho bovino e genético. Os resultados obtidos para transição da gordura em todos os tratamentos foram superiores aos encontrados por Wolfschoon-Pombo, Furtado e Munck (1978) em queijos Minas Frescal fabricados com fermento e ácido láctico, os autores encontraram valores similares para a transição de sólidos totais. Os teores de transição médios de proteína encontrados nos queijos fabricados com ácido láctico (82,2%), foram superiores aos encontrados no presente trabalho em todos os tratamentos, porém, os cálculos foram realizados baseando-se nos teores de caseína e não proteína bruta, o que justifica a diferença encontrada.

A transição de proteína e o rendimento em litros de leite por quilo de queijo apresentaram diferenças ($p < 0,05$), sendo a menor transição e rendimento encontrados quando do uso do coalho genético, porém, no cálculo de rendimento de gramas de sólidos totais por litro de leite não houve diferença entre os tratamentos. Estes resultados discordam dos encontrados por vários autores: Folegatti (1994), Banks (1992), Barbano e Rasmussen (1992), Broome e Hickey (1990), que analisando diversas variedades de queijos não encontraram diferenças no rendimento e transição em fabricações, comparando o uso de coalho genético e de vitelo. Os valores encontrados pelos autores foram ligeiramente superiores quando comparados com o coalho bovino, todavia, deve-se observar que todas as variedade analisadas são queijos maturados e a literatura não oferece consulta de nenhuma variedade de queijo fresco sem adição de fermento láctico e com salga direta no leite. O aumento no tempo de coagulação do leite devido a presença de sal e a menor umidade nos queijos Minas Frescal fabricados com o coalho genético provavelmente influenciaram na diminuição do rendimento, além disso, os resultados expressos em litros de leite por quilo de queijo desconsidera a umidade, sendo que necessariamente, não indicam um melhor aproveitamento dos componentes sólidos que não apresentaram diferença significativa.

As influências das enzimas coagulantes no rendimento dos queijos ainda não estão completamente esclarecidas (Folegatti, 1994). A qualidade do leite, equipamentos e variações na tecnologia de fabricação influenciam decisivamente no rendimento, que somadas à dificuldade de precisão em pesagens de grandes quantidades, comprometem a exatidão das determinações, sendo difícil afirmar que pequenas variações no rendimento sejam diferenças efetivas que tragam consequências práticas.

4.6 Análises para acompanhamento da proteólise

4.6.1 Índice de extensão da maturação

O índice de extensão da maturação corresponde à quantidade de nitrogênio solúvel em *pH* 4,6, representados principalmente por peptídios de baixo e médio peso molecular, produzidos

basicamente, pela ação das enzimas do coalho e acumulados durante a maturação ou estocagem (Farrey e Fox, 1990). Como esperado, os resultados obtidos para este índice foram significativos para o armazenamento, aumentando gradualmente. Períodos intermediários podem ser estimados pela equação de regressão como ilustrado na figura 9.

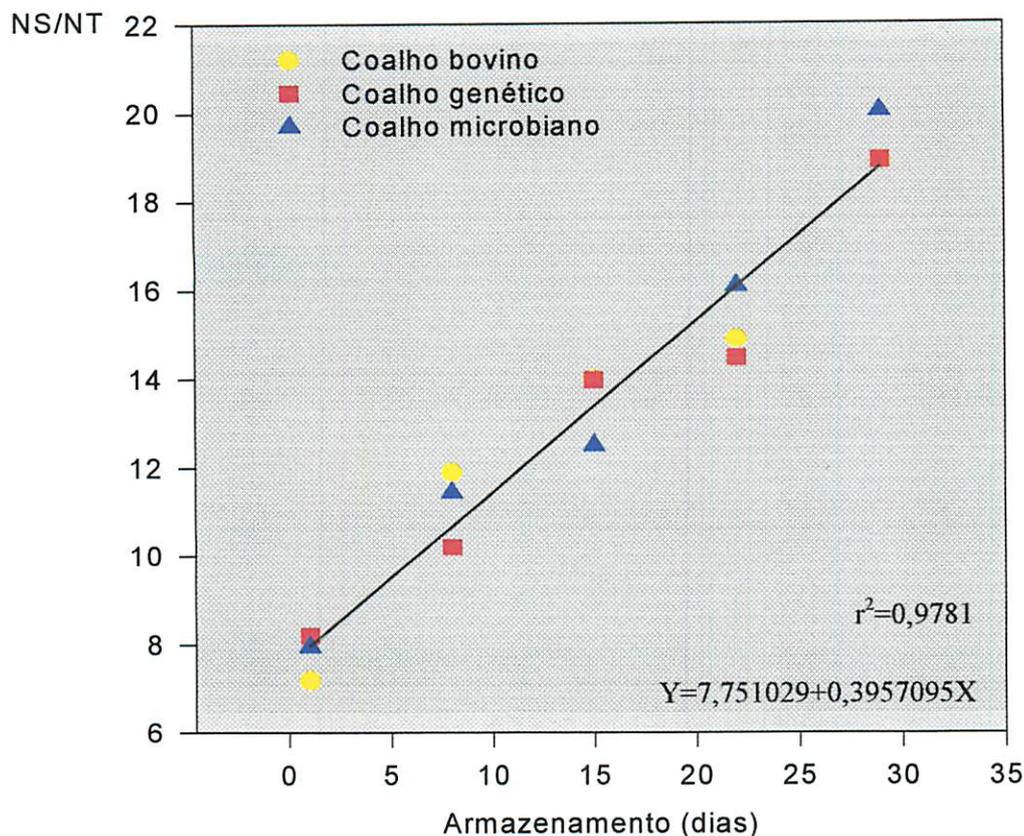


FIGURA 9 - Gráfico de regressão evidenciando as variações nos índices de extensão dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento.

Todas as determinações foram ligeiramente superiores às encontradas por Isepon e Oliveira (1995), em queijo Minas Frescal com acidificação direta e uso de coalho bovino estocado por até 12 dias, onde os autores encontraram valores médios de 6,87 para este período e concluíram que o tempo de armazenamento sob refrigeração não deve exceder 6 dias com valores médios de 5,19. Wolfschoon-Pombo et al. (1984), estudaram as variações em queijos Minas

Frescal durante o armazenamento por até 14 dias e encontraram resultados similares aos obtidos no presente trabalho, porém, em temperaturas de armazenamento mais baixas (6°C). Os autores estabeleceram 7 dias após a fabricação como o período máximo para comercialização, para que as características organolépticas fossem preservadas. Na avaliação do fator coalho a variação média dos índices médios de extensão não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), porém, as variações nos teores podem ser importantes para comparação com os testes sensoriais e outros índices de proteólise, os resultados estão ilustrados na figura 10.

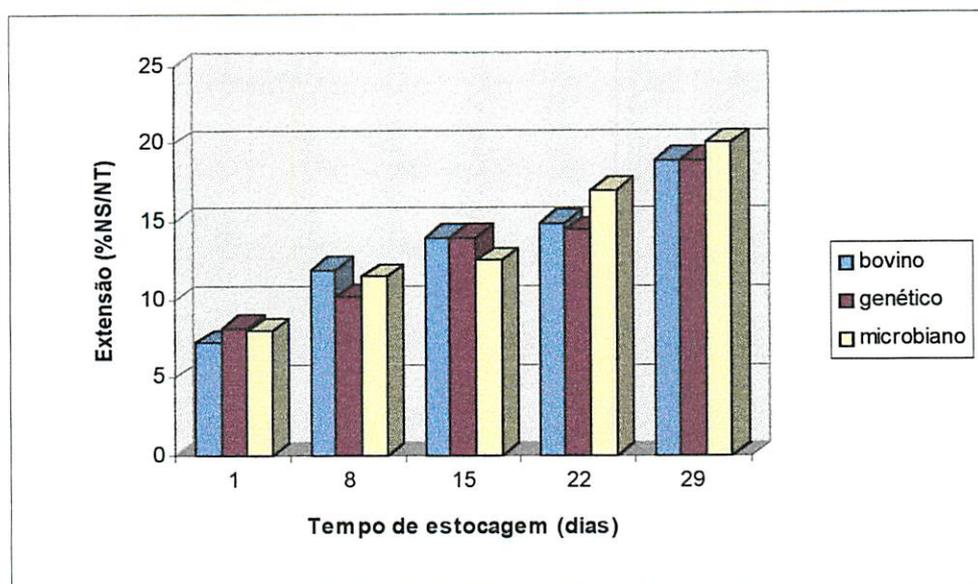


FIGURA 10 - Evolução dos índices de extensão nos queijos Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano durante armazenamento.

Os queijos fabricados com o coalho bovino que obtiveram os menores índices de extensão da maturação com 1 dia de estocagem (7,20), foram porém, os que apresentaram os maiores índices entre 8 e 15 dias (13,96 e 14,89 respectivamente), provavelmente pelo favorecimento da ação da pepsina em pH mais baixos. O pH mais alto no início da estocagem (média de 6,46) tende a prejudicar a ação da pepsina, mas não da quimosina, que atua em uma

faixa mais ampla de pH Fox (1988), o que pode explicar a diferença no comportamento dos diferentes coagulantes e justifica o fato dos queijos fabricados com o coalho genético apresentarem os maiores valores de extensão no primeiro dia (8,20) e serem em média inferiores durante o decorrer da estocagem. Os queijos fabricados com o coalho microbiano apresentaram valores mais elevados que os outros nas fases finais de estocagem, 16,08 e 20,02 respectivamente para 22 e 29 dias de armazenamento, fato esperado, já que este coagulante possui maior atividade enzimática não específica e de pepsina, do que de quimosina e portanto, mais potencialmente proteolítico e capaz de aumentar os índices de extensão. A importância destes índices tornam-se ainda mais acentuadas quando se observa a hipótese formulada por Yvon et al. (1989), de que a principal característica correlacionada com a solubilidade, é o aumento da hidrofobicidade superficial acessível dos peptídeos, que está relacionada com o sabor amargo em queijos, podendo tornar o produto menos aceitável ao consumidor. Para melhor avaliar os valores dos índices de extensão, deve-se analisá-los conjuntamente com os aminoácidos tirosina e triptofano e testes sensoriais.

4.6.2 Índices dos aminoácidos tirosina e triptofano

A determinação espectrofotométrica dos aminoácidos tirosina e triptofano em amostras de queijos previamente solubilizadas em pH 4,6, têm sido tradicionalmente utilizadas para avaliar a proteólise em queijos (Fox, 1989). Os teores de tirosina foram significativamente diferentes para os tipos de coalho e tempo de armazenamento ($p < 0,05$), seguindo a mesma tendência do índice de extensão da maturação. Os índices aumentaram gradativamente com o armazenamento, sendo que no dia posterior à fabricação o aminoácido não foi detectado pela análise. O comportamento do aminoácido durante o armazenamento pode ser observado na figura 11.

A influência dos diferentes tipos de coalhos nos índices de tirosina foram diferentes ($p < 0,05$), sendo que em todos os períodos de armazenamento, os maiores teores foram nos queijos fabricados com o coalho genético, diferindo dos resultados encontrados para o índice de

extensão, onde os maiores resultados médios encontrados foram para os queijos fabricados com o coalho bovino. Os resultados obtidos no presente trabalho são semelhantes aos encontrados por Isepon e Oliveira (1995), que compararam queijos Minas Frescal obtidos com coalho bovino e uso de culturas e ácido láctico armazenados por até 12 dias e obtiveram índices médios de 12,27 mg/1000g em queijos fabricados o uso de ácido láctico e salga direta no leite. Mesmo os resultados sendo significativos para o fator coalho, podemos observar que em números absolutos a diferença foi pequena entre os tratamentos (tabela 12). Os maiores teores de tirosina nos queijos fabricados com o coalho genético não concordam com os resultados obtidos por Folegatti (1994) em queijo tipo Prato, onde utilizando coalhos bovino, genético e de vitelo não encontrou diferenças significativas, porém, este estudo foi realizado em queijos maturados por até 60 dias e com uso de fermento láctico dificultando a comparação. Os resultados obtidos nos testes objetivos de mensuração da proteólise devem ser analisados conjuntamente com a análise sensorial.

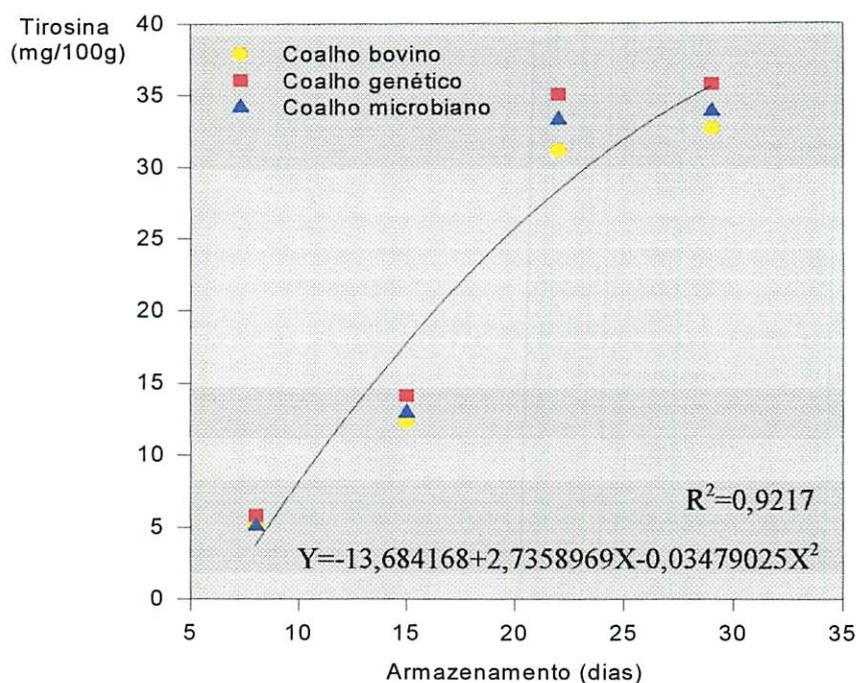


FIGURA 11 - Gráfico de regressão evidenciando as variações nos índices do aminoácido tirosina dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento.

TABELA 12 - Resultados médios dos índices (mg/100g de queijo) de tirosina nos queijos Minas Frescal durante o armazenamento a $12\pm 1^{\circ}\text{C}$.

| Tipo de coalho | Armazenamento (dias) | | | | Média |
|----------------|----------------------|---------|---------|---------|---------|
| | 8 | 15 | 22 | 29 | |
| Bovino | 5,15 a | 12,30 a | 31,13 a | 32,65 a | 20,31B |
| Genético | 5,77 a | 14,12 a | 35,00 a | 35,76 a | 22,66A |
| Microbiano | 5,05 a | 12,90 a | 33,23 a | 33,83 a | 21,56AB |

a,b...média de 3 repetições são diferentes em cada período ($p < 0,05$)

A,B...médias gerais são diferentes ($p < 0,05$)

Os valores do aminoácido triptofano não foram diferentes estatisticamente quando foram utilizados os diferentes coalhos, porém foram significativos para os períodos de estocagem. A evolução nos índices durante a estocagem pode ser observada na figura 12.

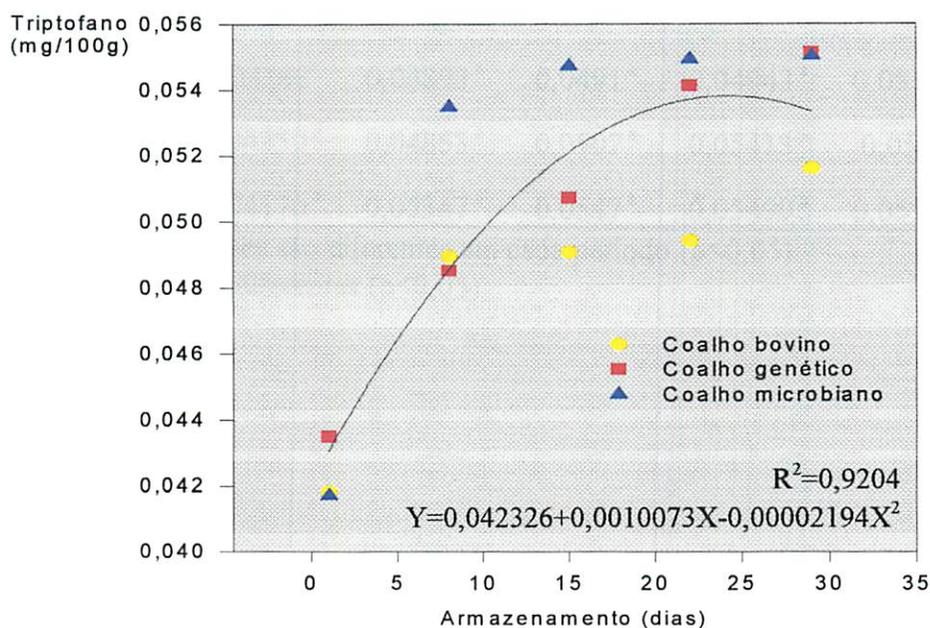


FIGURA 12 - Gráfico de regressão evidenciando as variações nos índices do aminoácido triptofano dos queijos Minas Frescal nos diferentes períodos de armazenamento.

Os resultados obtidos para triptofano (tabela 13) foram menores que os de tirosina, concordando com os resultados obtidos por Marcos et al. (1979), que observaram em queijos europeus um conteúdo mais elevado de tirosina que de triptofano em todas as variedades, exceto para o queijo Domiati. Pela pequena variação observada nos índices durante a estocagem, mesmo sendo significativos ($p > 0,05$), torna-se difícil estabelecer índices máximos para proteólise que tornariam o produto inaceitável para o consumidor e diferenças mínimas podem ser estatisticamente significativas levando a interpretações errôneas. Devido ao fato do queijo Minas Frescal não ser maturado, provavelmente o aminoácido triptofano não é um método adequado para avaliação da proteólise nesta variedade.

TABELA 13 - Evolução dos índices do aminoácido triptofano no queijo Minas Frescal durante estocagem a 12°C

| Tipo de coalho | Armazenamento (dias) | | | | | Média |
|----------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------|
| | 1 | 8 | 15 | 22 | 29 | |
| Bovino | 0,04180 ^a | 0,04893 ^a | 0,0491 ^a | 0,04943 ^a | 0,05160 ^a | 0,0519A |
| Genético | 0,04350 ^a | 0,04853 ^a | 0,0507 ^a | 0,05413 ^a | 0,0551 ^a | 0,0504A |
| Microbiano | 0,04170 ^a | 0,05347 ^a | 0,0547 ^a | 0,05490 ^a | 0,05503 ^a | 0,0482A |

a,b...média de 3 repetições são diferentes em cada período ($p < 0,05$)

A,B...médias gerais são diferentes ($p < 0,05$)

4.7 Análise sensorial

4.7.1 Teste de aceitação

A tabela 14 mostra as médias obtidas para os queijos elaborados com diferentes tipos de coalhos durante a estocagem. Como os tratamentos (amostras), são do tipo qualitativo e se

mostraram significativos na análise de variância, os escores médios foram avaliados utilizando um teste de comparação de médias “a posteriori”, como o teste de Tukey.

A amostra que apresentou melhor desempenho foi o queijo obtido com coalho bovino com 1 dia de estocagem, sendo que dos queijos armazenados por 1 dia, o fabricado com coalho microbiano foi o que apresentou pior desempenho, todavia, mesmo a diferença sendo significativa ($p < 0,05$), pode-se observar que os valores absolutos tiveram pouca variação. Aos 14 dias os queijos fabricados com coalho microbiano apresentaram números intermediários em comparação aos fabricados com coalhos genético e bovino nos índices de tirosina e os maiores resultados para o aminoácido triptofano, sendo menor somente no índice de extensão ($p > 0,05$), o que poderia explicar sua maior aceitação neste período. A diferença encontrada para aceitação dos queijos elaborados com coalho microbiano aos 14 dias além de ser avaliada conjuntamente com os testes objetivos, devem ser analisadas observando-se os outros testes sensoriais (quantitativos), já que testes subjetivos possuem alto coeficiente de variação. Folegatti (1994), trabalhando com 3 tipos de coalhos na fabricação de queijo Prato com 66 dias de maturação, assim como Medina et al. (1992) em queijos Hispânico e Burgo, assim como Nunez et al. (1992) em queijos Manchego, não encontraram diferenças sensoriais nos queijos fabricados com os diferentes coalhos, o que discorda dos resultados obtidos neste estudo, porém, como são variedades com características diferentes torna-se difícil a comparação. Todos os queijos avaliados após estocagem por 22 dias obtiveram escores menores que 5,0 (indiferente), sendo rejeitados pelos consumidores potenciais.

Considerando-se média acima de 5,5 (indiferente), como limite para oferta do queijo no mercado, somente o queijo fabricado com o coalho microbiano ainda estaria próprio para o consumo com 14 dias, sendo que os queijos fabricados com coalho genético e bovino só seriam aprovados até 8 dias de estocagem, concordando com os resultados obtidos por Isepon e Oliveira (1995), que estudaram queijo tipo Minas Frescal fabricados com fermento e ácido láctico, e encontraram prazo máximo de manutenção das características sensoriais com 6 dias.

TABELA 14 - Notas médias* obtidas no teste de aceitação para os diferentes agentes coagulantes nos diferentes períodos de armazenamento.

| Tipo de coalho | Armazenamento | Nº de dados* | Média |
|-----------------------|----------------------|---------------------|--------------|
| Bovino | 1 dia | 93 | 7,0 a |
| Genético | 1 dia | 96 | 6,9 ab |
| Microbiano | 1 dia | 95 | 6,6 abc |
| Microbiano | 7 dias | 89 | 6,6 abc |
| Microbiano | 14 dias | 90 | 6,0 abcd |
| Bovino | 7 dias | 90 | 5,9 bcd |
| Genético | 7 dias | 89 | 5,6 cde |
| Bovino | 14 dias | 91 | 5,5 de |
| Genético | 14 dias | 91 | 5,1 def |
| Microbiano | 21 dias | 91 | 4,7 efg |
| Bovino | 21 dias | 94 | 4,3 fg |
| Genético | 21 dias | 99 | 3,9 g |
| Microbiano | 28 dias | 94 | 2,9 h |
| Genético | 28 dias | 94 | 2,8 h |
| Bovino | 28 dias | 90 | 2,7 h |

* número de provadores da amostra

^{a,b,c...} médias seguida pela mesma letra na coluna, não diferem entre si ($p < 0,05$).

4.7.2 Análise Descritiva Quantitativa

A análise descritiva quantitativa foi realizada utilizando um teste de perfil modificado para os atributos cor, gosto amargo e acidez, que são importantes na avaliação da qualidade do queijo tipo Minas Frescal. A influência do tipo de coalho não foi significativa ($p > 0,05$), para o

atributo cor, porém o tempo de armazenamento influenciou significativamente. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 13. O atributo cor parece não ser limitante para a aceitação dos queijos até 15 dias de estocagem, onde o escore máximo obtido foi 2,61 para os queijos fabricados com o coagulante genético.

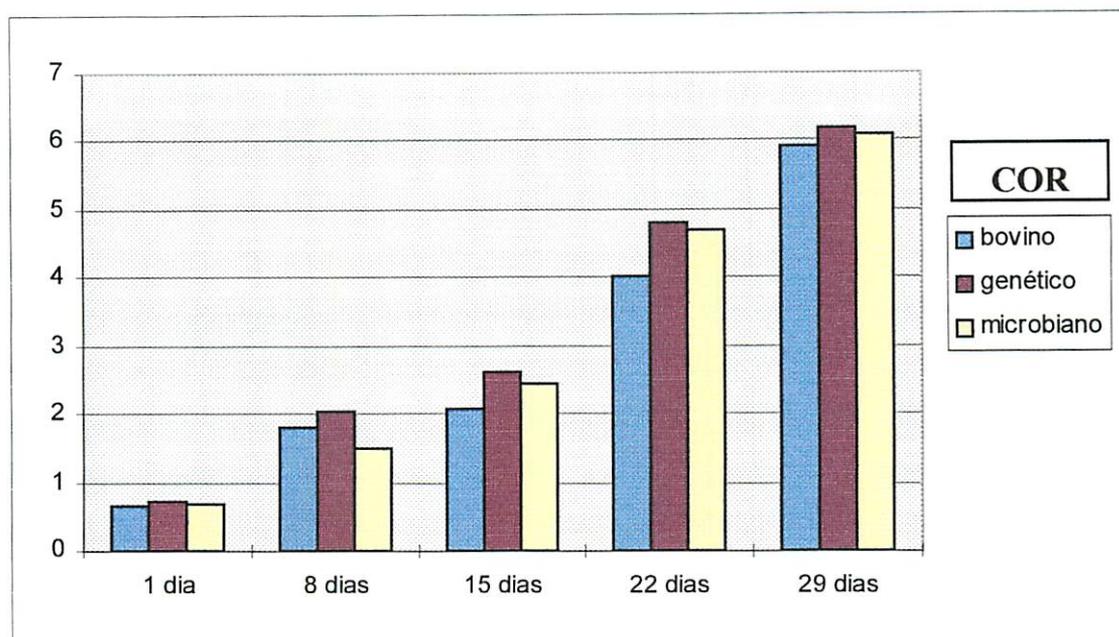


FIGURA 13 - Resultados da avaliação sensorial ao atributo cor em queijos Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano.

Para o atributo gosto amargo as diferenças só foram significativas ($p > 0,05$) para o fator armazenamento, sendo que os escores foram aumentando gradualmente com a estocagem como ilustrado na figura 14. Os menores escores obtidos para os queijos fabricados com o coagulante microbiano armazenados por 15 dias quando comparado com os outros tratamentos no mesmo período, coincidem com a maior aceitação neste período e com os menores índices de extensão.

Para o atributo acidez as diferenças também só foram significativas para o armazenamento, não tendo sido influenciada pelo tipo de coalho. Os escores obtidos no teste sensorial aumentaram gradualmente e não apresentaram relação estreita com a prova objetiva

acidez em ácido láctico, provavelmente porque outras características como gosto amargo e teor de sal mascararam a percepção dos provadores. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 15.

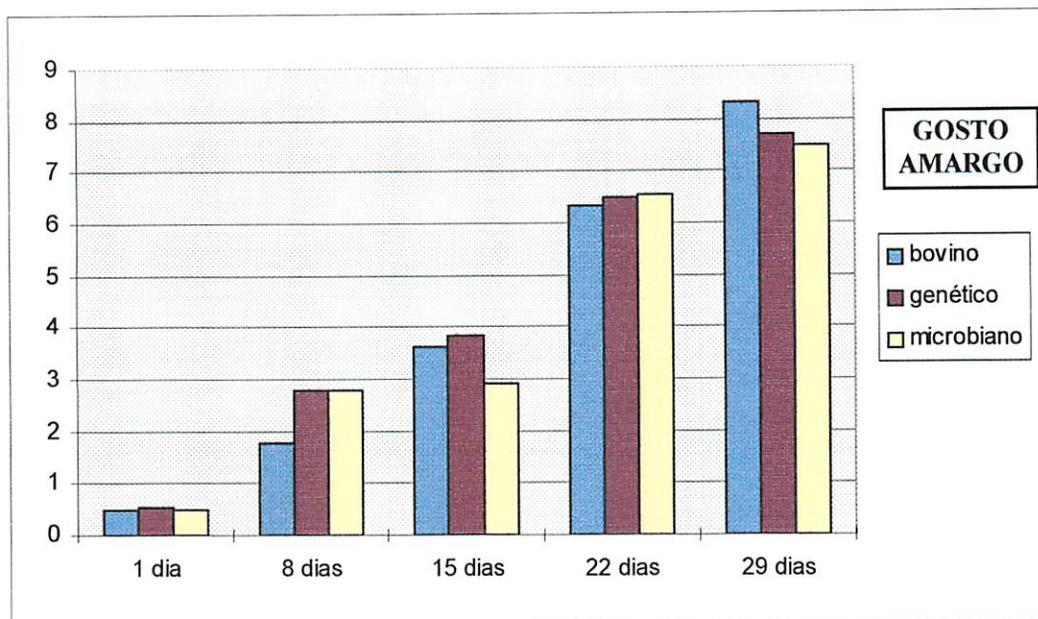


FIGURA 14 - Resultados da avaliação sensorial ao atributo gosto amargo em queijo Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano.

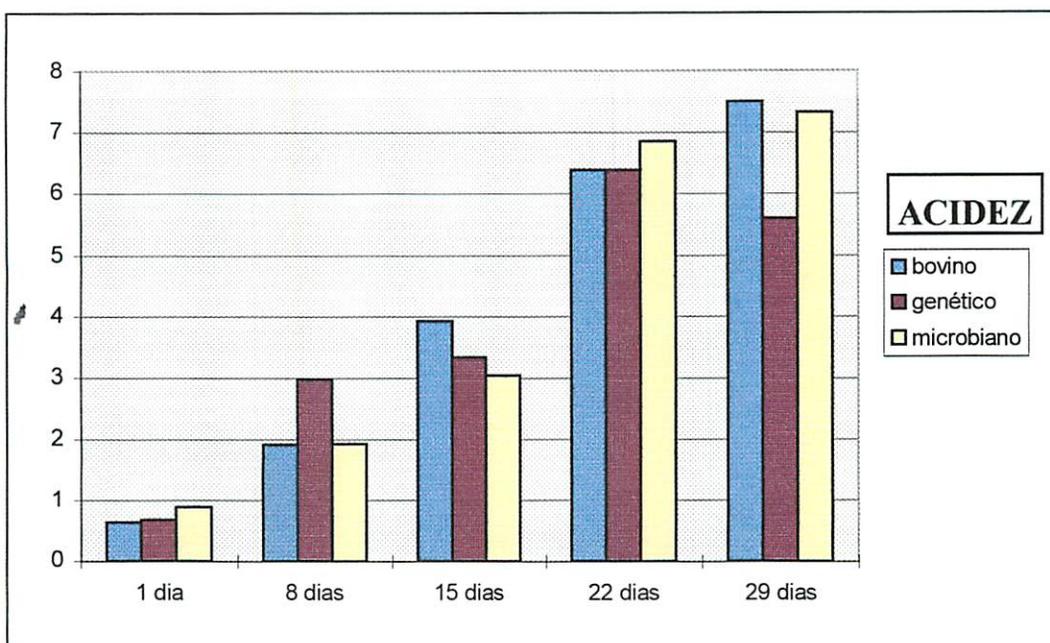


FIGURA 15 - Resultados da avaliação sensorial ao atributo acidez em queijo Minas Frescal fabricados com coalho bovino e coagulantes genético e microbiano.

Diversos estudos que compararam a influência do tipo de coalho nas características sensoriais de queijo também não encontraram diferenças significativas (Folegatti, 1994; Nunez et al., 1992; Corradini et al., 1990). A influência significativa do armazenamento em todos os atributos é consequência dos fenômenos bioquímicos de proteólise e das variações na composição, sendo o queijo Minas Frescal de alta umidade, as alterações com a estocagem são mais características que em outras variedades. Os resultados obtidos para todos os atributos devem ser analisados levando-se em consideração os altos coeficientes de variação encontrados, 36,389, 47,084 e 45,483% para os atributos cor, gosto amargo e acidez, respectivamente. A alta variação entre os provadores é problema constante em painéis de avaliação, mesmo quando os provadores são treinados.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através da avaliação do uso do coalhos bovino e coagulantes microbiano e genético em queijos Minas Frescal armazenados por 1, 8, 15, 22 e 29 dias e fabricados com salga direta no leite e uso de ácido láctico permitem concluir:

1. A composição dos queijos foi influenciada pelos diferentes tratamentos adotados. O uso do coagulante genético resultou em queijos com menor umidade e maiores teores de gordura e sólidos totais, sendo que a gordura no extrato seco não foi diferente em nenhum dos tratamentos. Os queijos elaborados com o coalho bovino obteve os maiores índices de umidade e cloreto de sódio.
2. O tempo de fabricação foi maior com o uso do coagulante genético e menor para o microbiano, o maior tempo de coagulação para o coagulante genético é provavelmente consequência da salga no leite que altera a conformação primária da κ -caseína, prejudicando a fase primária da coagulação pela quimosina, enzima predominante neste coalho.
3. Durante o armazenamento houve aumento progressivo dos índices de extensão da maturação em todas as amostras analisadas, sendo que o tipo de coalho não resultou em índices diferentes ($p > 0,05$). A determinação dos aminoácidos seguiram a mesma tendência dos índices de extensão, aumentando com a estocagem, porém os índices de tirosina foram significativamente influenciados pelo tipo de coalho, com os maiores índices médios para o coagulante genético e os menores para o bovino.

4. Os maiores rendimentos de fabricação em L/kg foram observados nos queijos com o uso do coalho bovino, porém, quando o rendimento foi avaliado levando-se em consideração a composição do queijo, o maior índice (gST/L) foi observado nos queijos fabricados com o coalho microbiano, a diferença não foi significativa ($p>0,05$)

5. No teste de aceitação os queijos obtiveram vida de prateleira média de 8 dias, sendo depois rejeitados pelos consumidores, com exceção do coagulante microbiano que apresentou bons resultados até os 15 dias de armazenamento. Neste período foi este agente o que apresentou os menores índices de extensão ($p>0,05$). O teste descritivo quantitativo para os atributos cor, gosto amargo e acidez não detectou diferenças entre os queijos fabricados com os diferentes coalhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12. ed. Washington, 1995. 1094p.
- BANKS, J.M.; BANKS, W.; MUIR, D.D.; WILSON, A.G. Cheese yield: composition does matter. **Dairy Industrial Internacional**, London, v.46, n.5, p.15-22, May 1981.
- BANKS, J.M. Yield and quality of Cheddar cheese produced using a fermentation-derived calf chymosin. **Milchwissenschaft**, Cork, v.47, n.3, p.153-156, 1992.
- BARBANO, D.H.; RASMUSSEN, R.R. Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.1, p.1-2, Jan. 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal-RIISPOA**. Brasília, 1980. 116 p.
- 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 físicos e químicos. Brasília, 1981a.
- BRASIL. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. I. Métodos microbiológicos. Brasília, 1981b.
- BROOME, M.C.; HICHEY, M.W. Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in cheddar cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Hightett, p.53-59, Nov. 1990.
- CASAGRANDE, H.C.; WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Fermentação da lactose no queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.43, n.258, p.38-40, jul./ago. 1988.

- CHAVES, J.B.P. A análise sensorial na indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.45, n.267-272, p.38-52, jan./dez. 1990.
- CHIAPPINI, C.C.J.; SANTOS, N.N. Determinação de alguns parâmetros físicos e químicos do soro de queijo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.50, n.292, p.3-9, mar./abr. 1995.
- 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.
- CORRADINI, C.; BOTTAZZI, V.; REMINI, P.; HOGENBOON, J.A.; PAZZAGLIA, C.; LODI, R.; CARINI, S.; RAMPILLI, M. Formaggio grana com chimosina do *Kluyveromyces lactis* (Maxiren). **Il Latte**, v.15, p.860-865, ott. 1990.
- DALGLEISH, D.G. The enzymatic coagulation of milk. In: FOX, P.F. **Cheese: chemistry physics and microbiology**. London: AVI Publishing Co., 1987. v.1, Cap.3, p.71-87, 1987.
- DESMAZEAUD, M.J.; GRIPON, J.C. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. **Milchwissenschaft**, Cork, v.32, n.12, p.731-734, 1977.
- DINAKAR, P.; MATHUR, M.P.; DATTA, R.D. Differences in proteolytic behavior in Cheddar cheese prepared with calf rennet and vegetable rennet. **Indian Journal of Dairy Science**. v.42, n.4, p.729-796, 1989.
- DISEGNA, L.; TEALDO, E.; LODDO, A.; SCULDO, G.; ANTONELLO, F.; GIACON, D.; FELLIN, A. Impiego di chimosina B de *Kluyveromyces lactis* nello tecnologia indicativa del Montasio. **Il Latte**, p.480-490, mag. 1991.
- EMMONS, D.B.; ERNSTROM, C.A.; LACROIX, C.; VERRET, P. Predictive formulas for yield of cheese for composition of milk: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.6, p.1365-1394, June 1990.
- FARKEY, N.Y.; FOX, P.F. Objective index of cheese ripening. **Trends in Food Science e Technology**, London; v.2, n.3, p.37-40, Mar. 1990.
- FERREIRA, C.L.L.F.; MOURA, K.R.P.; BOTINHON, L.; COELHO, A.A.; SCHILLER, O.R.. Avaliação tecnológica de culturas lácticas nacionais na Produção de queijo Minas. SEMANA DO LATICINISTA, 32, Juiz de Fora, 1992, **Anais...** Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 1992. p.32-37.

- FOLEGATTI, M.L.S. **Avaliação do uso de quimosina produzida por *Aspergillus niger* var. *awamori* na fabricação de queijo tipo Prato.** Campinas: UNICAMP, 1994. 65p. (Tese-Mestrado em Engenharia dos Alimentos).
- FOLTMANN, B. General and molecular aspects of rennets. In:FOX, P.F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology.** London: AVI Publishing Co., 1987. v.1, Cap.2, p.33-61.
- FOX, P.F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening:review. **Biothecnology and Applied Biochemistry**, v.10, p.522-535, July 1988.
- 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. ; LAW, J. Enzimology of cheese Ripening. **Food Biotechnology**, v.5, n.3, p.239-262, 1991.
- FUNGARO, M.H.P. **Genética e melhoramento de *Cândida* sp. para a produção de coalho microbiano.** Piracicaba:ESALC, 1990. 119p. (Tese-Doutorado em Agronomia)
- FURTADO, M.M. Formação de sabor amargo em queijos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.39, n.234, p.13-19, jul./ago. 1984.
- FURTADO, M.M.; SOUZA, H.M.; MUNCK, A.V. A fabricação do queijo Minas Frescal sem o emprego de culturas láticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.207, p.15-21, jan./fev. 1980.
- FURTADO, M.M. ; WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Fabricação de queijo Prato e Minas: estudo do rendimento. Parte I. Determinação das cifras de transição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.34, n.205, p.3-9, set./out. 1979.
- FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON-POMBO. A. F.; MUNCK, A.V. Determination of recovery values and calculation of expected yield of Brazilian Minas Frescal cheese. **Deutsche-Molkerei-Zeitung**, v.40, n.100, p.1425-1428, 1979.
- 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.

- HARBOE, M.K. Chimogen, a chymosin rennet manufactured by fermentation of *Aspergillus niger*. **Bulletin of IDF**, n. 269, p.3-7, 1992.
- HICKS, C.L.; O'LEARY, J.; BUCY, J. Use of recombinant chymosin in the manufacture of Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.71, n.5, p.1127-1131, May 1988.
- ISEPON, J.S.; OLIVEIRA, J.A. Variação do índice de proteólise e aceitabilidade do queijo tipo Minas Frescal. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATÍCIÍOS, 13, Juiz de Fora, 1995. **Anais...** Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 1995. p.287-290.
- JENNESS, R. Composition of milk. In: JENNESS, R. **Fundamentals of dairy chemistry**, 3.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. p.1-38.
- KAMMERLHNER, J. Rennet chese yield. **Deutsche-Milchwirtschaft**, v.45, n.3, p.118-125, 1994.
- KIRCHMEIER, O. Arrangement of components, electric charge and interaction energies of casein particles. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Wageningen, v.27, p.191-198, 1973.
- KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods**. 2.ed. An Arbor: Edwards, 1977. 711p.
- LAW, B.A. Proteolysis en relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P.F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. London: AVI Publishing Co., 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.
- MARCOS, A.; ESTEBAN, M.A.; LÉON, F.; FERNANDEZ-SALGUEIRO, J. Electrophoretic patterns of european cheeses: comparation and quantitation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.62, n.6, p.892-900, June 1979.
- MEDINA, M.; GAYA, P.; GUILLEN, A.M.; NUNUZ, M. Characteristics of Burgos and Hispanico cheeses manufactured with calf rennet or with recombinant chymosin. **Food Chemistry**, Oxford, v.45, p.85-89, 1992.
- MUNCK, A.A.; SOUZA, H.M. Estudo conclusivo a respeito da fabricação do queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.208, p.13-16, mar./abr. 1980.

- NUNEZ, M.; MEDINA, M.; GAYA, P.; GULLEN, A.M.; RODRIGUEZ-MARIN, M.A. Effect of recombinant chymosin on ewes' milk coagulation and Manchego cheese characteristics. **Journal of Dairy Research**, London, v. 59, n.1, p.81-87, Feb. 1992.
- ORTIZ DE APODACA, M.J.; AMIGO, L.; RAMOS, M. Study of the milk-clotting and proteolytic activity of calf rennet, fermentation-produced chymosin, vegetable and microbial coagulants. **Milchwissenschaft**, Cork, v.49, n.1, p.13-16, 1994.
- PRAANING VAN DALEN, D.P. Application and regulatory position of Maxiren. **Bulletin of the IDF**, v. 259, p.8-12, 1992.
- RETIL, C.; SGUEDONI, A.; JULIANO, A.M.M. Coalhos e coagulantes. **Leite e Derivados**, São Paulo, v.2, n.7, p.27-33, nov./dez. 1992.
- SILVA, P.H.F. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação do teor de caseína em leite e para avaliação de proteólise em queijos**. Viçosa:UFV, 1995. 64p. (Tese-Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SOHAL, T.S.; ROEHL, F.; JELEN, P. Rennet as a cause of bitterness development in Quark. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.71, n.2, p.3188-3196, Dec. 1988.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 3.ed. New York: Freeman, 1988. 1089p.
- TEUBER, M. Production of chymosin (E.C. 3.4.23.4) by microorganisms and its use for cheesemaking. **Bulletin of IDF**, n.251, p.3-15, 1990.
- USTONOL, Z.; HICKS, C.L. Effect of milk clotting enzymes on cheese yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.1, p.8-16, Jan. 1990.
- VAKALERIS, D.G.; PRICE, W.V. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. **Journal Food Science**, Champaign, v.42, n.2, p.264-276, Feb. 1959.
- VAN DEN BERG, C.; KONING, P.J. Gouda cheesemaking with purified calf chymosin and microbially produced chymosin. **Netherlands and Milk Dairy Journal**, Wageningen, v.44, p.189-205, 1990.
- VAN DENDER, A.G.F.; MORENO, I. Estudo de processos alternativos para a fabricação do queijo Minas Frescal. In: SEMANA DO LATICINISTA, 32, Juiz de Fora, 1991. **Anais...** Juiz de Fora:EPAMIG/ILCT, 1992. p.76-77.

- VENEMA, D.P.; HERSTEL, H.; ELENBAAS, H.L. Determination of the ripening time of Edam and Gouda cheese by chemical analysis. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Wageningen, v.41, p.215-226, 1987.
- VISSER, S. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins: a review. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Wageningen, v.35, p.65-88, 1981.
- 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.
- WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.8, p.1965-1979, Aug. 1990.
- WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Sobre a determinação da força do coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.207-212, p.33-34, mar./abr. 1980.
- WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; FURTADO, M.M.; MUNCK, A.V. Estudo da fabricação do queijo Minas Frescal com ácido láctico em substituição ao fermento láctico. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 5, Juiz de Fora, 1982. **Anais...** Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 1978. p.160-182.
- WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; CASAGRANDE H.R.; LOURENÇO-NETO, J.P.M.; MUNCK, A.V. Alterações no queijo Minas Frescal durante o período de armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.39, n.233, p.3-9, maio/jun. 1984.
- 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.
- WOLFSCHOON-POMBO, A.; LIMA, A.; LOURENÇO-NETO, J.P.M. Amostragem e análise de queijo Prato e Minas (nota prévia). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.38, n.226, p.37-42, mar./abr. 1983.
- 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**, v.34, p.166-176, 1989.