

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Fabricação e avaliação da maturação de queijo Prato obtido a
partir de leite pré-acidificado com CO₂ e redução de coagulante**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção de título de mestre em
Tecnologia de Alimentos

Atílio Coutinho Silveira
Engenheiro de Alimentos

Prof^ª. Dra. Mirna Lúcia Gigante
Orientadora

Campinas
Junho - 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Si39f Silveira, Atilio Coutinho
Fabricação e avaliação da maturação de queijo prato obtido a partir de leite pré-acidificado com CO₂ e redução de coagulante / Atilio Coutinho Silveira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Queijo prato. 2. Maturação. 3. Coagulante. 4. Dióxido de carbono - CO₂. 6. Pré-acidificação. 7. Soro. 8. Propriedades funcionais. I. Gigante, Mirna Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(CARV/FEA)

Título em inglês: Manufacture and ripening of prato cheese made from preacidification of milk with CO₂ follow coagulant reduction

Palavras-chave em inglês (Keywords): Prato cheese, Ripening, Coagulant, Carbon dioxide - CO₂, Preacidification, Whey, Physical properties

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Mirna Lúcia Gigante

Leila Maria Spadoti

Walkiria Hanada Viotto

Data de defesa: 18/06/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante
(Orientadora - UNICAMP)

Dra. Darlila Aparecida Gallina
(Membro - ITAL)

Dra. Leila Maria Spadoti
(Membro - ITAL)

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(Membro - UNICAMP)

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
(Membro - UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Deus pela vida, força, saúde e a certeza de que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos;

Aos meus familiares pelo amor e incentivo;

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões na redação desta dissertação;

Aos mestres que tanto acrescentaram na minha bagagem de conhecimento, em especial à professora Walkíria e ao professor Homero;

Ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida;

À Renata, técnica do Laboratório de Instrumentação, pela ajuda e orientação durante a realização de parte das análises deste trabalho;

A todos os técnicos e funcionários da FEA, em especial os do DTA;

Aos amigos do Laboratório de Leite: Ana Patrícia, Bárbara, Renata, Camila, Milena, Priscila Mamede, pela agradável convivência e trabalho;

Aos amigos Bruno, Juliana, Dani, Camila (cereais), Willon, Baiano, Adriano, Bebel, Simone, Cabeludo, Chico, Cibebe, Leilane e Cintia, pela amizade e por todos os momentos que passamos juntos;

A todos os colegas da Pós-Graduação;

Aos republicanos da Al'lambique: Sanaiotti (Guilherme), Patrick (Patricoloso), Ciro (Ciroca), Danilo (Índio), Ricardo (Tony), Diogo (Ossão), Rafael (Tim-Tim) e ao Bullzinho;

A todos que de alguma forma me incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

E em especial:

Aos meus pais e minha irmã Ber pelo amor incondicional, compreensão, pela força e suporte, mesmo antes do início, até a concretização deste trabalho;

À Bete, técnica do Laboratório de Leite, pela amizade, ajuda, conselhos e compreensão nos momentos de dúvida e necessidades;

À amiga Priscila, que foi fundamental para realização deste trabalho, com a disponibilidade em todos os momentos (principalmente os mais difíceis) e infinita boa vontade em todas as fases;

À professora Dra. Mirna Lúcia Gigante. Muito obrigado por não se restringir a apenas orientar e ensinar a pesquisa e atividades acadêmicas. Muito maior que sair mestre hoje e ser uma pessoa muito melhor que quando entrei. Agradeço a você por ter feito tudo isso por mim; e

À Mari, por ser a minha amiga, companheira, conselheira, incentivadora e meu bom senso, tanto nos bons e principalmente nos piores momentos; e acima de tudo, por ser a única pessoa que eu nunca imaginei encontrar aqui, e mesmo assim, parecer ser aquela que me fez vir, apenas para conhece-la. Te amo minha linda!

A todos vocês, dedico esse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1 Queijo Prato.....	3
3.2 A maturação do queijo Prato	7
3.3 A ação do coalho na maturação e a fabricação de queijo a partir de leite pré-acidificado	10
3.4 O aproveitamento do soro da Indústria Láctea.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1 Metodologia para avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO ₂ sobre o tempo de coagulação	15
4.1.1 Matéria Prima	15
4.1.2 Amostragem	16
4.1.3 Determinação do tempo de coagulação e da dosagem de coagulante	16
4.1.4 Delineamento experimental.....	17
4.2 Metodologia para avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO ₂ e da redução da quantidade de coagulante sobre as características do queijo Prato	17
4.2.1 Matéria prima	18

4.2.2	Coadjuvantes tecnológicos	18
4.2.3	Fabricação do queijo Prato	19
4.2.4	Procedimento de amostragem e análises realizadas	20
4.2.5	Determinação da recuperação dos constituintes do leite e do rendimento dos processos.....	21
4.2.6	Avaliação das propriedades funcionais	22
4.2.6.1	Avaliação do perfil de textura dos queijos	22
4.2.6.2	Capacidade de Derretimento	22
4.2.7	Delineamento experimental e análise estatística	22
4.3	Metodologias para as determinações analíticas.....	23
4.3.1	Determinações físico-químicas do leite cru.....	23
4.3.2	Determinações físico-químicas do leite pasteurizado e soros	23
4.3.3	Determinações físico-químicas do queijo.....	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	Efeito da pré-acidificação com CO ₂ sobre o tempo de coagulação do leite.....	27
5.2	Processamento e maturação do queijo Prato	31
5.2.1	Composição físico-química do leite cru e pasteurizado.	31
5.2.2	Efeito dos tratamentos sobre os parâmetros de processo e as características do queijo Prato e do soro.	31
5.2.3	Efeito dos tratamentos e do tempo sobre as características de maturação do queijo Prato.....	41
5.2.4	Efeito da redução do coagulante sobre a firmeza e o derretimento do queijo Prato.....	49
6	CONCLUSÕES	53

REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE A: Verificação de Ordens de Reação	62
APÊNDICE B: Resultados completos da avaliação da regressão linear para proteólise .	66
APÊNDICE C: Resultados completos da avaliação da regressão linear para firmeza.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do esquema geral do trabalho avaliar efeito da pré-acidificação do leite com CO ₂ sobre o tempo de coagulação.	15
Figura 2. Fluxograma do esquema geral do trabalho para avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO ₂ e da redução da quantidade de coagulante sobre as características do queijo Prato.	18
Figura 3. Efeito do pH sobre o tempo de coagulação do leite pré-acidificado através da adição de CO ₂	29
Figura 4. Comportamento do pH durante o processo de fabricação do queijo Prato.....	33
Figura 5. Comportamento do pH entre as etapas do processo de fabricação do queijo Prato.....	34
Figura 6. Efeito dos tratamentos na recuperação dos constituintes no queijo e no soro.	35
Figura 7. Efeito do tempo de armazenamento sobre o pH dos queijos	42
Figura 8. Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre o NS-pH 4,6 (%NT)	43
Figura 9. Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre o NS-TCA 12% (%NT).....	44
Figura 10. Regressão linear para avaliar efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamentos sobre a formação de NS-pH 4,6 (%NT).	45
Figura 11. Regressão linear para avaliar efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamentos sobre a formação de NS-TCA 12% (%NT).....	46
Figura 12. Perfil eletroforético do queijo Prato durante a maturação.	47
Figura 13. Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre a firmeza dos queijos.....	50
Figura 14. Regressão linear para avaliar efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamentos sobre a firmeza do queijo Prato.	51
Figura 15. Efeito do tempo de armazenamento sobre o derretimento médio dos queijos...	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias das determinações físico-químicas do leite cru e pasteurizado.....	27
Tabela 2. Efeito dos processamentos, dos tratamento assim como da sua interação entre eles sobre o tempo de coagulação do leite.....	28
Tabela 3. Dose de coagulante para cada pH e redução da porcentagem de coagulante em relação ao pH controle.....	30
Tabela 4. Características físico-químicas do leite cru e pasteurizado.	31
Tabela 5. Efeito dos tratamentos, das etapas do processo, bem como da interação desses fatores sobre o comportamento do pH durante a fabricação do queijo Prato.....	32
Tabela 6. Efeito dos tratamentos sobre o rendimento dos processos de fabricação.	37
Tabela 7. Composição físico-química do queijo e efeito dos tratamentos sobre a composição dos queijos.	38
Tabela 8. Composição físico-química do soro e valor p para diferenças significativas entre os tratamentos.	39
Tabela 9. Resumo da análise de variância (ANOVA). Efeito do tratamento, tempo e da interação tratamento x tempo sobre umidade, pH, % do nitrogênio solúvel em pH 4,6 (%NT) e % do nitrogênio solúvel em TCA 12% (%NT).	41
Tabela 10. Resumo da análise de variância (ANOVA). Efeito do tratamento, tempo de armazenamento e da interação tratamento x tempo sobre a firmeza e o derretimento do queijo Prato.....	49

RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da pré-acidificação do leite e da redução da dosagem de coagulante na fabricação e maturação do queijo Prato. Inicialmente, para definir a porcentagem de redução de coagulante a ser adotada, avaliou-se o efeito do pH sobre o tempo de coagulação do leite. A variação do pH (6,8; 6,6; 6,4 e 6,2) foi obtida através da injeção direta de CO₂ ao leite pasteurizado (72-75°C/15-20 seg.). O delineamento experimental utilizado foi o Split-plot e o experimento completo foi repetido três vezes. Os resultados indicaram a redução do tempo de coagulação com a gradativa queda de pH, além da possibilidade da redução de aproximadamente 65% do coagulante, para a manutenção da mesma condição de coagulação (40 minutos a 35°C), no pH 6,4. Na segunda etapa do trabalho, compararam-se as características de processamento, composição e comportamento durante a maturação do queijo Prato controle e do fabricado após pré-acidificação (CO₂) do leite a pH 6,4 e da redução de 65% do coagulante. A composição foi avaliada um dia após a fabricação dos queijos, enquanto a proteólise, a firmeza e a capacidade de derretimento após 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 40 dias. O experimento completo foi repetido três vezes e os resultados foram avaliados por análise de variância e de regressão linear. Os tratamentos não afetaram significativamente a recuperação de proteínas, caseína, gordura e cinzas dos queijos e nem o rendimento de fabricação. Os queijos e o soro não apresentaram diferença significativa na composição, exceto no teor de umidade, que foi menor no queijo obtido a partir de leite pré-acidificado com CO₂ e com redução de 65% do coagulante. Os tratamentos afetaram significativamente a proteólise, a capacidade de derretimento e a firmeza dos queijos. Os queijos fabricados a partir da pré-acidificação do leite com redução de 65% do coagulante apresentaram menor proteólise, maior firmeza e menor capacidade de derretimento. Embora no início da maturação, do 1º ao 15º dia, o comportamento da proteólise primária e secundária tenha sido semelhante, a proteólise do queijo controle foi aproximadamente duas vezes maior que do queijo com teor reduzido de coagulante ao final do 40º dia de avaliação, permitindo um maior tempo de manutenção das propriedades físicas do queijo após as transformações iniciais do produto.

Palavras-chave: Queijo Prato, maturação, coagulante, dióxido de carbono - CO₂, pré-acidificação, soro, propriedades funcionais.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of preacidification of milk and the quantity of coagulant reduction on manufacture and ripening of Prato cheese. Initially, to determine the percentual reduction of coagulant to be used, it was evaluated the effect of pH on the time of coagulation of milk. The variation of pH (6.8, 6.6, 6.4 and 6.2) was obtained by direct injection of CO₂ under pressure to the pasteurized milk (72-75°C/15-20 seconds). It was used a Split-plot experimental design and the experiment was repeated three times. The results indicated the possibility of reduction of approximately 65% of the coagulant to maintain the coagulation condition (40 min at 35° C) at pH 6.4. In the next stage, the characteristics of processing, composition and the ripening of Prato cheese control were compared with the cheese made by preacidification of milk and 65% less coagulant. The cheese composition was evaluated one day after its manufacture, while the proteolysis, firmness and melting capacity were evaluated after 1, 5, 10, 15, 20, 25 and 40 days. The complete experiment was repeated three times and the results were analyzed by ANOVA and linear regression. The treatments did not affect the recovery of protein, casein, fat and ash of the cheese neither the yield of process significantly ($p < 0,05$). The cheese and whey compositions were not significantly different ($p < 0,05$), except the cheese moisture content, which was lower in Prato cheese made from milk preacidified with CO₂ followed 65% less coagulant. The treatments significantly affected ($p < 0,05$) the proteolysis, the melting capacity and the firmness. The cheeses made from preacidification of milk with 65% less coagulant had lower proteolysis, higher firmness and lower melting capacity. Although at the beginning of ripening the behavior of primary and secondary proteolysis was similar between the 1st and the 15th day, the proteolysis of control cheese was approximately two times faster than the cheese made from preacidification of milk with 65% less coagulant until the 40th day of analysis, allowing cheese physical properties sustain after the initial changes of the product.

Keywords: Prato cheese, ripening, coagulant, carbon dioxide - CO₂, preacidification, whey, physical properties.

INTRODUÇÃO

O queijo Prato é um queijo brasileiro originário da região Sul de Minas Gerais, que segue princípios básicos de fabricação dos queijos dinamarqueses e holandeses, devido à presença de imigrantes na região. É um queijo de massa lavada, semi-cozida, sabor suave, corpo macio, podendo ser de massa fechada ou apresentar algumas pequenas olhaduras lisas, brilhantes e redondas (FURTADO, 1983; FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

Em 2005 o queijo Prato representou aproximadamente 20% de toda a produção brasileira de queijos e mais que 30% dos queijos chamados “commodities” (EMBRAPA, 2009). Planzer *et al.* (2009) apontaram o queijo Prato como o terceiro mais consumido por 1000 entrevistados no estado do Rio de Janeiro. O alto consumo deve-se à sua forma de utilização, seja puro, na forma de aperitivo, ou como recheio de sanduíches quentes ou frios. Essas formas de utilização fazem com que a maciez, a fatiabilidade e a capacidade de derretimento sejam consideradas quesitos de qualidade deste queijo.

O soro, resíduo gerado da fabricação do queijo, é um problema sério para as indústrias, primeiramente devido ao grande volume resultante (cerca de 90% do volume de leite processado) e também por seu potencial poluidor. Além disso, seu descarte constitui prática antieconômica, devido ao grande potencial de transformação em outros produtos (JULIANO; PETRUS; TORRANO, 1987), como bebidas láteas, concentrado protéico de soro, creme de soro para fabricação de manteiga e lactose. No aproveitamento do soro, seja pela concentração e separação dos seus constituintes ou pela sua utilização como matéria-prima para a fabricação de outros produtos, é importante que o produto não seja fermentado ou adicionado de ácidos, como ocorre na pré-acidificação do leite antes da fabricação de queijos, usualmente com ácido láctico. A utilização de dióxido de carbono como acidificante pode ser uma alternativa para o melhor aproveitamento do soro. Em meio aquoso, o gás solubilizado se transforma em ácido carbônico, abaixando o pH do leite durante o processo de fabricação do queijo. A remoção do soro se dá posteriormente pela passagem do produto em câmara de vácuo (NELSON; LYNCH; BARBANO, 2004a; AMIGO; OLANO; CALVO, 1995; RUAS-MADIEDO *et al.*, 1996) ou pelo seu desprendimento durante a agitação e aquecimento da massa no tanque de fabricação

(CHAMPAGNE; ST-GELAIS; DE CANDOLLE, 1998; HOTCHKISS; WERNER; LEE; 2006).

Nossa hipótese para este trabalho é que a pré-acidificação do leite através da adição de CO₂, seguida da redução da dosagem de coagulante pode levar à produção de um queijo Prato, onde a proteólise ocorra mais lentamente, preservando por mais tempo as propriedades físicas do queijo. Além disso, o soro resultante desse processo de fabricação poderia ser utilizado diretamente, sem previa neutralização, diminuindo custos e possivelmente melhorando a qualidade dos produtos resultantes.

Dentro deste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da pré-acidificação do leite por meio da adição de CO₂ e o efeito da redução da quantidade de coagulante na fabricação, rendimento, proteólise, firmeza e derretimento do queijo Prato.

1. OBJETIVOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO₂ sobre o seu tempo de coagulação;
2. Avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO₂ e da redução da quantidade de coagulante sobre o rendimento, a composição físico-química, o perfil de maturação e as características funcionais do queijo Prato.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Queijo Prato

O queijo Prato foi introduzido no Brasil na década de 20 do século passado, na região Sul de Minas Gerais, através de imigrantes dinamarqueses. Acredita-se que naqueles tempos pioneiros, os queijos eram elaborados seguindo-se os princípios básicos de fabricação de queijos dinamarqueses, como o Danbo, Tybo, Fynbo e Molbo, e holandeses, como o Gouda e o Edam. Todos esses queijos, de forma geral, são de massa lavada, semi-cozida, sabor suave, corpo macio, podendo apresentar algumas olhaduras lisas, brilhantes e redondas. A tecnologia de fabricação do queijo Prato foi adaptada às condições locais, o que explica as diferenças de sabor e abertura de massa observada no Prato em relação aos queijos que lhe deram origem. Enquanto aqueles se apresentaram sempre com presença de olhaduras regulares e pequena, o Prato pode ser encontrado tanto com olhaduras regulares ou irregulares, como também completamente fechado. (FURTADO, 1983; FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994)

O Prato é o segundo queijo mais produzido no Brasil e a produção em 2007 foi de 126.000 t (ABIQ, 2007), o que representou naquele ano aproximadamente 20% de toda a produção brasileira de queijos, mais que 30% dos queijos chamados “commodities”, além da utilização de cerca de 7% de todo o leite recebido por indústrias sob fiscalização federal (EMBRAPA, 2009). A produção do queijo Prato é menor apenas que a produção do queijo Mussarela, que consumiu em 2007 pouco mais de 10% de todo o leite produzido nas mesmas condições. A produção do queijo Prato teve um aumento superior a 27% no período de 2000 a 2005 (ABIQ, 2005). Dados coletados por Planzer *et al.* (2009), de 1000 entrevistados no estado do Rio de Janeiro, demonstraram que dos queijos citados como os consumidos pelos entrevistados, o queijo Prato foi o terceiro mais citado.

Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade (BRASIL, 1997), o queijo Prato é um queijo maturado, obtido pela coagulação do leite por ação enzimática do coalho e/ou outras enzimas coagulante apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como queijo gordo e de média umidade. Dependendo da variedade, seu peso é de 0,4 a 5 kg e tem as seguintes designações comerciais: queijo Prato Lanche ou Sanduíches, na forma de paralelepípedo de

seção transversal retangular; queijo Prato Cobocó, que é cilíndrico e queijo Prato Esférico ou Bola, que é esférico.

Embora o processo de fabricação do queijo Prato possa ser considerado relativamente bem padronizado na indústria brasileira, existem variações nos procedimentos de fabricação que podem afetar o rendimento, a composição e as características do produto. Estes procedimentos incluem o tipo de cultura láctica utilizada, o uso ou não da lavagem da massa (delactosagem) e sua temperatura de cozimento, o tipo de coagulante, o método de salga e, finalmente, o tempo de maturação. Como procedimento geral de fabricação, pode-se afirmar que o Prato é um queijo de massa lavada e semi-cozida, obtido através da coagulação enzimática do leite, salgado em salmoura (OLIVEIRA, 1986; FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994) e maturado por pelo menos 25 dias, conforme estabelecido pela legislação (BRASIL, 1997). Após a coagulação e o corte do coágulo, a massa é mexida por um período não superior a 20 minutos para evitar sua desmineralização excessiva. Após esse tempo, é feita uma delactosagem por meio da retirada de um volume de soro e adição de água quente com a finalidade de lavagem da massa, com proporção que varia segundo as intensidades de sabor e textura desejados ao produto. Utiliza-se água a 75 - 80°C e sua adição deve ser feita visando à elevação gradual de temperatura, de 1° C a cada 2 a 3 minuto. Após o aquecimento, que pode chegar a 45°C, a massa é agitada de forma vigorosa até atingir o ponto. A massa é pré-prensada sob o soro, enformada e prensada, onde sofre uma compactação para retirada do soro intersticial. Ao final da prensagem os queijos são encaminhados para a salga em salmoura (FURTADO, 1983).

Para exemplificar como este procedimento padrão pode ser variável, Cichoski *et al.* (2002) e Gorostiza *et al.* (2004) publicaram a caracterização e acompanhamento da maturação de queijo Prato artesanal produzido, segundo os autores, pelo método tradicional na região do Alto Uruguai, no Rio Grande do Sul, que envolve oito municípios. De acordo com esses trabalhos, o queijo Prato foi fabricado com leite de vaca não pasteurizado, sem adição de cultura láctica comercial, sem delactogagem e com salga na massa. Esse protocolo de fabricação é completamente diferente do procedimento geral de fabricação (OLIVEIRA, 1986; FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

Segundo Furtado e Lourenço Neto (1994) a composição média esperada para o queijo Prato obtido segundo o procedimento geral de fabricação é 42-44% de umidade, 26-29% de gordura, pH entre 5,2-5,4 e teor sal de 1,6 a 1,9%. Composição semelhante foi reportada por Mazal *et al.* (2007) e Nonogaki, Monteiro e Gigante (2007), enquanto Spadoti *et al.* (2003b) obtiveram queijo controle com maior teor de umidade (48,2%). No que diz respeito ao teor de proteína, os queijos apresentaram 18,4 (SPADOTI *et al.*, 2003b), 22,2 (NONOGAKI; MONTEIRO; GIGANTE, 2007) e 22,6% (MAZAL *et al.*, 2007).

Segundo Furtado (1990), a relação Caseína/Gordura (C/G) tem sido recomendada como um dos recursos para padronizar o queijo Prato, considerando as diferenças de composição do leite entre as raças, as estações do ano. Considerando que a caseína é o componente do leite que mais afeta a retenção dos demais, a padronização do leite com base na relação C/G oferece resultados bastante exatos, sendo muito usada nos Estados Unidos na fabricação de queijo Cheddar. Costa Junior e Pinheiro (1998) estudaram a influência da relação caseína/gordura nas características físico-químicas do queijo Prato. Os autores determinaram uma equação experimental que correlaciona a gordura no extrato seco do queijo com a relação caseína/gordura do leite no intervalo entre 0,68 a 0,8. Para o GES mínimo legal de 45% mais uma margem de segurança de 2% os autores determinaram que a relação C/G do leite deve ser de 0,76.

Atualmente, existe disponível no mercado brasileiro o queijo Prato com teor de gordura reduzido. Barros, Cardelo e Viotto (2004) avaliaram a composição de três marcas comercializadas na região de Campinas e verificaram que não existe diferença significativa em relação à composição dos queijos, que apresentaram, em média, $49 \pm 2\%$ de umidade, $19 \pm 1\%$ de gordura, $25 \pm 1\%$ de proteína, $1,5 \pm 0,2\%$ de sal e pH de $5,44 \pm 0,07$. A obtenção de queijo Prato com reduzido teor de gordura com a utilização do processo de ultrafiltração com baixo fator de concentração ($F_c = 1,5$ e $2,0$) foi avaliada por Barros, Ribeiro e Viotto (2006b). Os autores observaram que o processo de ultrafiltração não afetou significativamente a composição dos queijos e o produto controle apresentou 53,43% de umidade, 6,10% de gordura, 32,31% de proteína total, 1,56% de sal e pH de 5,40.

A acidificação necessária à fabricação de queijos pode ser obtida pelo emprego de culturas lácticas. O fermento láctico normalmente utilizado no processamento de queijo Prato é o tipo LD, composto de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp.

cremoris, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. As culturas homofermentativas mesofílicas, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, são as principais responsáveis pela acidificação durante a etapa de fabricação do queijo e nos estágios iniciais da maturação. Ao fermentarem a glicose, produzem exclusivamente ácido láctico L (+). O *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, bactéria heterofermentativa, produz elevada quantidade de acetoína e diacetil a partir de citrato, compostos que proporcionam o aroma do queijo Prato. O *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* apresenta um metabolismo heterofermentativo, produzindo, a partir da glicose os ácidos láctico e acético, etanol e CO₂, que confere ao queijo Prato a pequena formação de olhaduras características de algumas variedades. É também capaz de produzir compostos aromáticos (diacetil e acetoína) a partir do metabolismo do citrato (FURTADO, 1990; McSWEENEY, 2004). Nos produtos disponíveis no mercado observa-se que os queijos Prato Cobocó e Esférico apresentam olhaduras, enquanto o Prato tipo Lanche é normalmente um queijo de massa fechada.

A utilização de culturas adjuntas tem sido proposta para a fabricação de queijo Prato com baixo teor de gordura com a finalidade de corrigir problemas de sabor e textura. Barros *et al.* (2006a) compararam a fabricação de queijo com baixo teor de gordura fabricado com e sem (queijo controle) adição de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*). Os autores observaram o maior aprofundamento da maturação do queijo fabricado com cultura adjunta quando comparado ao queijo controle. O queijo adicionado de cultura adjunta apresentou melhor qualidade sensorial, quer pela redução do sabor amargo, aumento da concentração de peptídeos de sabor desejável, precursores de sabor, aroma e textura, do queijo Prato com baixo teor de gordura.

A determinação do rendimento de fabricação é importante para controlar a eficiência do processo e para estudar o resultado de experimentos que comparam alterações de processos e de condições de processamento. O rendimento industrial pode ser expresso de diferentes formas, sendo usual expressá-lo em kg de queijo/100 kg de leite (ou em porcentagem). Outra forma de expressão é o rendimento ajustado, que considera a correção em função dos teores de sal e umidades desejados (FOX *et al.*, 2000). Segundo Furtado e Lourenço Neto (1994), o rendimento de fabricação do queijo Prato é de 9,0 – 9,5 litros de leite por kg de queijo, o que corresponde a 10,2 - 10,7 kg de queijo/100 kg de leite (cálculo

baseado em densidade 1,032 kg/litro). Mazal *et al.* (2007) não observaram diferença significativa no rendimento ajustado (1,6% de sal e 42% de umidade) de queijo Prato obtido a partir de leite com alta e baixa contagem de células somáticas, que foi 10,1 e 9,3 kg de queijo/100 kg de leite, respectivamente. Spadoti *et al.* (2003b) compararam o rendimento ajustado (1,7% de sal e 43% de umidade) do queijo Prato tradicional e fabricado pelo processo de ultrafiltração. Os tratamentos não afetaram o rendimento ajustado dos queijos, que foi, em média, de 9,68 kg de queijo/100 kg de leite.

3.2. A maturação do queijo Prato

A qualidade e a composição do leite, bem como os procedimentos de fabricação definem a composição dos queijos, porém, é durante a maturação que ocorrem as transformações típicas necessárias ao desenvolvimento das características de cada queijo. Os três eventos que ocorrem durante a maturação dos queijos são glicólise, proteólise e lipólise. Estas reações são responsáveis pela mudança de textura que ocorre na massa do queijo durante a maturação e são também as principais responsáveis pelo sabor e aroma do queijo, embora numerosas mudanças secundárias ocorram concomitantemente (FOX, 1993).

A proteólise de queijos envolve uma série de dinâmicos e complexos eventos, onde uma determinação exata do estado de degradação da estrutura protéica se torna uma árdua tarefa. O acompanhamento das variações das frações nitrogenadas é utilizado para demonstrar a evolução desse fenômeno. Os dois índices mais comumente utilizados são as porcentagens das frações de nitrogênio solúveis em pH 4,6 e em ácido tricloroacético (TCA) 12%, ambas expressas como porcentagem do nitrogênio total (WALSTRA *et al.*, 1999 e FOX, 1993). Estes índices são comumente designados na maturação de queijo Prato como extensão e profundidade de maturação, respectivamente.

Gorostiza *et al.* (2004) analisaram a proteólise em queijo Prato artesanal, fabricado com leite cru e adição de coalho bovino. Os autores observaram que a hidrólise da α_{s1} e β -caseína foram similares em todos os processamentos e que a α_{s1} -caseína foi hidrolisada mais extensivamente (65%) que a β -caseína (20%). Do 1º ao 60º dia de maturação, os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,4 e em TCA 12%, expressos em relação ao nitrogênio total, aumentaram de 7,23 para 21,4% e de 2,80 para 12,53%, respectivamente. Narimatsu *et al.* (2003) observaram o aumento dos índices de extensão e profundidade de maturação

do queijo Prato durante o período de 45 dias de 70% e 117,4%, respectivamente. Por outro lado, Barros *et al.* (2006a) observaram que no mesmo período de maturação, os índices de extensão e profundidade de maturação do queijo Prato aumentaram em 180% e 185%, respectivamente.

Silva, Van Dender e Baldini (1999) determinaram o perfil eletroforético de queijo Prato obtido com incorporação da enzima proteolítica Neutrasea em diferentes concentrações (10, 15 e 25mg de enzima . kg⁻¹ de leite), com o intuito de acelerar a maturação. A análise eletroforética demonstrou claramente que a incorporação de enzimas levou a diferenças quantitativas nas frações protéicas dos queijos adicionados de enzimas quando comparados aos tradicionais. Houve uma maior degradação das frações α_{s1} - e β -caseínas, com acúmulo maior de alguns produtos de degradação destas duas frações nos queijos modificados.

No tocante às propriedades funcionais do queijo Prato, a fatiabilidade é uma característica importante, visto que é hábito do brasileiro a compra deste queijo fatiado (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). Entretanto, considerando o atual uso do produto para sanduíche, a boa capacidade de derretimento também passou a ser um quesito de qualidade. Segundo Lucey, Johnson e Horne (2003), as propriedades físicas dos queijos dependem das interações da caseína e da extensão da proteólise.

A consistência macia e o sabor suave do queijo Prato são resultados dos processos de semi-cozimento e da lavagem da massa. Essa lavagem faz com que o abaixamento de pH seja menor, favorecendo a formação de uma estrutura firme e elástica, condizente com a propriedade de fatiabilidade desejada para o queijo. A maturação do queijo Prato deve ser controlada, já que um aprofundamento da maturação pode hidrolisar as cadeias protéicas, deixando-as assim mais curtas. Tal estado de degradação da matriz protéica pode gerar excessivo amolecimento no queijo, a qual dificulta o fatiamento do produto (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

O princípio da avaliação da capacidade de derretimento baseia-se na modificação sofrida pela amostra quando esta é submetida a uma fonte de calor, a uma dada temperatura, por um determinado tempo. Nonogaki, Monteiro e Gigante (2007) padronizaram uma condição de tempo/temperatura para avaliar o derretimento do queijo Prato, durante todo o período de maturação. Os queijos foram fabricados segundo

metodologia tradicional e avaliados em relação à capacidade de derretimento após 1, 15, 30 e 45 dias de maturação, utilizando-se o método de Schreiber e diferentes combinações de tempo e temperatura através da análise de superfície de resposta. Os resultados demonstraram que a melhor condição para avaliar o derretimento do queijo Prato durante todo o período de maturação foi 130 °C/10 min.

Spadoti *et al.* (2003a) acompanharam a evolução da capacidade de derretimento (aquecimento a 107°C/7 minutos) durante a maturação do queijo Prato fabricado leite concentrado por ultrafiltração (FC = 4:1) variando-se a porcentagem de retentado a ser pré-maturado (10 e 20 % do volume total), além de diferentes cozimentos da massa (direto e indereto). Os tratamentos não afetaram a capacidade de derretimento dos queijos que aumentou significativamente ao longo da maturação. No queijo fabricado pelo processo tradicional observou-se um aumento na capacidade de derretimento de 140 para 290% entre o 10º e 45º dia de maturação.

A análise instrumental do perfil de textura ou Texture Profile Analysis (TPA) é um método empírico, o qual simula a mordida durante a mastigação de um material viscoelástico. Como resultado, é obtido um gráfico força-deformação, característico para cada tipo de produto. Através deste gráfico, são obtidos parâmetros reológicos como fraturabilidade, dureza, coesividade, adesividade e elasticidade (FOX *et al.*, 2000 e SZCZESNIAK, 2002). Katsuda *et al.* (1999) compararam o perfil de textura do queijo Prato tradicional e o fabricado com teor reduzido de gordura. Os tratamentos afetaram significativamente a firmeza e o queijo controle apresentou uma redução da firmeza de 7,3 até 4,64 N até o 45º dia de maturação. Já Baldini *et. al* (1998) avaliaram as mudanças na textura do queijo Prato ao longo da maturação. Os autores observaram um aumento da firmeza de 2921,2 g para 4568,7 g entre o 1º e o 7º dia de maturação, seguido da redução desse parâmetro, ocasionada pela degradação protéica. Ao final de 40 dias a firmeza alcançava o valor de 3541,4 g. Segundo os autores, o aumento da dureza nos primeiros dias de cura deveu-se à perda de umidade do queijo para o ambiente, a qual é muito comum em queijos com casca, já que nesse trabalho em questão o queijo foi maturado fora da embalagem.

3.3. A ação do coalho na maturação e a fabricação de queijo a partir de leite pré-acidificado

A proteólise em queijos é afetada por inúmeros fatores como: tipo e a atividade residual do coagulante, proteases naturais do leite (como plasmina, catepsina D e outras proteases de células somáticas), proteinases e peptidases liberadas pelos microrganismos do fermento láctico, fermento secundário e bactérias lácticas não adicionadas. Fatores intrínsecos ao queijo também afetam a proteólise como a taxa de sal na umidade, temperatura de maturação, mudanças no pH durante a cura, além do potencial redox e o teor de cálcio (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987; SOUSA; ARDÖ; MCSWEENEY, 2001).

Em queijos de massa lavada, a proteólise ocorre inicialmente pela ação da atividade residual do coalho, especialmente a quimosina, responsável pela formação da maior parte das substâncias nitrogenadas solúveis, com a liberação de peptídeos de alto e médio peso molecular e baixa quantidade de aminoácidos. A α_{s1} -caseína é a fração caseína degradada mais rapidamente durante a maturação. Sua degradação é favorecida pelo pH do queijo e pela proximidade do pH ótimo de atuação do coalho, bem como pelo conteúdo de sal. A β -caseína é hidrolisada mais lentamente e aproximadamente 50% desta fração caseína permanece intacta após 6 meses de maturação (WALSTRA *et al.*, 1999). Lawrence, Creamer e Gilles (1987), ao discutir a maturação do queijo Gouda, queijo que se aproxima ao Prato por semelhanças de processo e composição, comenta sobre a pouca contribuição da plasmina na degradação da α_{s1} e β -caseínas em relação à renina e as proteases do fermento.

A maioria dos coalhos utilizados na indústria queijeira brasileira são produzidos a partir do abomaso de bovinos adultos e apresentam em média 80% de pepsina bovina e 20% de quimosina (ROSSI *et al.*, 1998). Segundo Fox (1993), apenas 3 a 6% do coalho adicionado ao leite fica retido na massa do queijo. Porém essa pequena quantidade residual contribui significativamente para as reações de proteólise da maturação do queijo.

Folegati, Antunes e Roig (1997) estudaram a influência do tipo de coalho na maturação de queijo Prato. Os autores utilizaram coalho de abomaso bovino adulto (20% de quimosina e 80% pepsina), de abomaso de bezerro (80% quimosina e 20% pepsina) e quimosina pura obtida por fermentação de microrganismos geneticamente modificados. A

proteólise foi evidente em todas as frações protéicas, sendo que α_{s1} -CN foi prontamente degradada, no sexto dia de maturação, à α_{s1} -I-CN. A degradação aumentou durante o período de maturação (66 dias), sendo mais intensa no queijo fabricado com coalho extraído de abomaso de bovino adulto.

Augusto e Viotto (2008) estudaram a influência do tipo de coagulante (de origem microbiana extraído de *Rhizomucor miehi*, de abomaso bovino adulto e de quimosina pura obtido por fermentação) e do tipo de aquecimento da massa (direto e indireto) sobre a composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo Prato. O tipo de coagulante não afetou significativamente a recuperação de gordura, proteínas e rendimento dos queijos. Observou-se sabor amargo mais intenso no queijo fabricado com coalho microbiano, com aquecimento indireto na massa, seguido do queijo fabricado com o mesmo coagulante e aquecimento direto da massa. Os demais tratamentos apresentaram sabor amargo menos acentuado e não deferiram entre si.

A tecnologia de pré-acidificação do leite ou acidificação direta, termo mais empregado quando o abaixamento de pH é feito através da adição de ácidos orgânicos, é amplamente conhecida e utilizada em vários queijos, como os queijos de massa filada, frescos e o cheddar. A pré-acidificação do leite para a fabricação de queijo Mussarela tem como finalidade a filagem imediata da massa após a sua obtenção, reduzindo, com isso, o tempo de processo. Este procedimento resulta em um queijo com menos ou nenhum fermento láctico e maior teor de umidade final (VIOTTO; OLIVEIRA, 1998; DAVE *et al.*, 2003; MCMAHON; PAULSON; OBERG, 2005). Queijos frescos, como o Minas Frescal, também lançam mão da acidificação direta para a substituição do fermento láctico e conseguir maior retenção de umidade, sabor e durabilidade (CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007). O queijo Cheddar fabricado a partir de leite pré-acidificado tem como objetivo a redução do tempo de processo por encurtamento do tempo de cheddarização (CREAMER; LAWEWNCE; GILLES, 1985; ST-GELAIS; CHAMPAGNE; BÉLANGER, 1997; NELSON; LYNCH; BARBANO, 2004 a).

A pré-acidificação por meio da adição de ácidos convencionais (láctico, cítrico, acético ou clorídrico) tem como inconveniente a obtenção de um soro de leite com menor pH, que pode impedir o aproveitamento do soro como matéria-prima para outros produtos. A utilização do CO₂ como acidificante é uma forma de se fazer a pré-acidificação do leite

sem que haja resíduos no soro, já que a remoção do dióxido de carbono pode ser feita pela passagem do produto em câmara de vácuo (AMIGO; OLANO; CALVO, 1995; RUAS–MADIEDO *et al.*; 1996) ou com a agitação seguida do aquecimento pelo efeito da redução da solubilidade de CO₂ em água, levando o ácido carbônico para a fase gasosa e o seu posterior desprendimento (CHAMPAGNE; ST-GELAIS; DE CANDOLLE, 1998; HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006), sem acarretar perda de estrutura das proteínas soro, açúcares e minerais (RUAS–MADIEDO *et al.*, 1996).

A capacidade acidificante do CO₂ tem sido explorada na fabricação de queijos (ST-GELAIS; CHAMPAGNE; BÉLANGER, 1997; NELSON; LYNCH; BARBANO, 2004 a, b; MONTILLA; CALVO; OLANO, 1995), pela possibilidade de redução do tempo de processamento e na quantidade de coalho, o que pode resultar em alterações das propriedades funcionais do produto (NELSON; LYNCH; BARBANO, 2004a).

Calvo, Montilla e Olano (1993) compararam o efeito da acidificação do leite com CO₂ ou ácido láctico sobre a atividade do fermento láctico e as propriedades de coagulação por renina. Estes autores observaram que o pH final mais alto encontrado para as amostras tratadas com CO₂ pode ser atribuído à menor atividade metabólica do fermento. A acidificação resultou num decréscimo no tempo de coagulação, o qual foi mais pronunciado nas amostras tratadas com ácido láctico do que com CO₂.

Este mesmo grupo de pesquisadores (MONTILLA; CALVO; OLANO, 1995) fabricaram queijo Ibérico a partir de leite submetido a três diferentes tratamentos: a) leite pasteurizado (controle); b) leite pasteurizado e acidificado a pH 6,0 com adição de CO₂; c) leite acidificado a pH 6,0 com adição de CO₂ e pasteurizado. Os autores observaram que a produção de queijos com leite tratado com CO₂ e pH 6,0 reduziu a quantidade necessária para a coagulação em 75%. Embora a acidificação tenha reduzido a quantidade de ácido láctico produzido pela cultura durante a incubação do leite, não se observou diferença significativa entre os queijos fabricados de leite não acidificado ou acidificado com CO₂. Os queijos fabricados com leite tratado com CO₂ apresentaram menor proteólise que o queijo controle, entretanto não se observou diferenças significativas entre as características sensoriais dos queijos.

St-Gelais, Champagne e Bélanger (1997) compararam a fabricação, composição e rendimento do queijo Cheddar, fabricado com leite não acidificado (controle, pH 6,67) e

com leite pré-acidificado com adição de ácido láctico e CO₂, ambos para pH 6,55. Para obtenção do mesmo tempo de coagulação em todos os queijos utilizou-se 30% menos de renina nos leite acidificados quando comparado ao leite controle. Os tratamentos não afetaram significativamente a composição e o rendimento dos queijos, entretanto, os queijos obtidos a partir de leite acidificado apresentaram menor tempo de cheddarização.

Nelson, Lynch e Barbano (2004a) avaliaram o efeito da pré-acidificação do leite com CO₂ sobre a composição, a recuperação dos constituintes do leite e o rendimento. O leite foi adicionado de CO₂ na concentração de 1600 ppm, o que resultou num pH de 5,9 a 31°C. Utilizou-se a mesma cultura e a mesma quantidade de coagulante para ambos os tratamentos. Em relação ao queijo controle, os fabricados com leite acidificado a pH de 5,9 retiveram menor teor de cálcio e gordura e não apresentaram diferença na recuperação de proteína.

Nelson, Lynch e Barbano (2004b) avaliaram a proteólise do queijo Cheddar fabricado a partir de leite com e sem adição de CO₂ (1600 ppm, pH 5,9 a 31°C). As dosagens de cultura láctea e coagulante foram mantidas constantes para ambos os tratamentos. Os autores observaram que o queijo fabricado com leite adicionado de CO₂ apresentou uma maior proteólise do que o queijo controle.

A pré-acidificação do leite para a fabricação de queijo pode favorecer o aumento da proteólise quando é mantida a concentração de coalho. Este efeito pode estar associado a três possibilidades: ao aumento da atividade do coalho com a aproximação do pH ótimo de atuação que é de 3,5 unidades de pH (FOLTMANN, 1993); à passagem da caseína para a fase aquosa do queijo, o que aumenta a susceptibilidade de ataque por enzimas proteolíticas presentes, principalmente a quimosina; ou ainda pelo aumento da retenção de enzimas do coalho na massa do queijo, que tende a ser maior quanto menor o pH de dessoragem, com exceção do coagulante de origem microbiana extraído de *Rhizomucor miehi* (CREAMER; LAWEWNCE; GILLES, 1985; METZGER *et al.*, 2001b; NELSON; LYNCH; BARBANO, 2004b).

3.4. O aproveitamento do soro da Indústria Láctea

O soro de queijo é um líquido opaco, amarelo-esverdeado, que contém cerca de 55% dos sólidos existentes no leite integral original e representa cerca de 80 a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo (KOSIKOWSKI, 1979).

O soro de queijo é um subproduto relevante para a indústria queijeira, pelo volume produzido (mais de 900.000 toneladas em 2005, somente originário da fabricação de queijo Prato, segundo a ABIQ, 2005) e por sua composição nutricional, com expressiva quantidade de proteínas de alto valor biológico.

De acordo com Juliano, Petrus e Torrano (1987), a não utilização racional do soro resultante da fabricação de queijo na indústria de laticínios constitui prática antieconômica e até mesmo anti-social, não só devido à carência mundial de alimentos, mas também pelo caráter sazonal da produção de leite e oscilações desta. Segundo Wasen (1998), a descarga de um litro de soro em cursos d'água acarreta em uma carga média de DQO/DBO₅ de 30-60 g · L⁻¹, que corresponde à quantidade de efluentes gerada por cerca de 40-50 pessoas para cada 100L de soro despejado sem tratamento.

Apesar do potencial poluidor do soro, ele pode ser considerado produto nobre pelo seu teor de proteínas solúveis, ricas em aminoácidos essenciais, pela presença de vitaminas do grupo B e pelo elevado teor de lactose e sais. As proteínas do soro possuem aminoácidos essenciais facilmente digeríveis e considerados altamente completos, tanto fisiológica quanto nutricionalmente. Além disso, apresentam características funcionais excelentes. Estas proteínas – lactoalbuminas, lactoglobulinas, imunoglobulinas e protease-peptonas – possuem, do ponto de vista nutricional, um dos mais altos PER (Protein Efficiency Ration) conhecidos – 3,1 – que supera o da caseína que é de 2,5 (FORSUM, 1974).

A pré-acidificação tem como inconveniente a obtenção de um soro de leite com menor pH, que pode impedir o aproveitamento do soro como matéria-prima para outros produtos como a produção de isolados ou concentrados protéicos e a utilização para a produção de bebidas lácteas. A remoção ou neutralização da acidez poderia restabelecer as qualidades iniciais do soro e possibilitar o aproveitamento. Contudo, a neutralização gera aumento do teor de sais (principalmente de sódio), que devem ser removidos por processos adequados, como osmose reversa ou nanofiltração.

A utilização de dióxido de carbono como acidificante é bastante conveniente, uma vez que pode ser facilmente removido pela passagem do produto em câmara de vácuo (NELSON; LYNCH; BARBANO, 2004a; AMIGO; OLANO; CALVO, 1995; RUAS-MADIEDO *et al.*, 1996) ou agitação seguida de aquecimento (CHAMPAGNE; ST-GELAIS; DE CANDOLLE, 1998; HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Metodologia para avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO₂ sobre o tempo de coagulação

4.1.1. Matéria Prima

O leite cru refrigerado utilizado como matéria-prima na primeira etapa do experimento foi obtido na fazenda Rio das Pedras (Barão Geraldo, Campinas-SP), transportado em latões até a planta piloto do laboratório de Leite e Derivados do DTA/FEA/UNICAMP e mantido sob refrigeração em câmara-fria ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). Em seguida o leite foi padronizado para 3,5% de gordura com creme de leite a 37% de gordura, pasteurizado em trocadores de calor a placas ($72-75^\circ\text{C}$ / 15- 20 segundos), resfriado a 4°C e armazenado em latões em câmara fria. O leite refrigerado foi dividido em 3 lotes que foram submetidos ao mesmo tratamento para avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO₂ sobre o tempo de coagulação, conforme esquema geral de trabalho é apresentado na Figura 1.

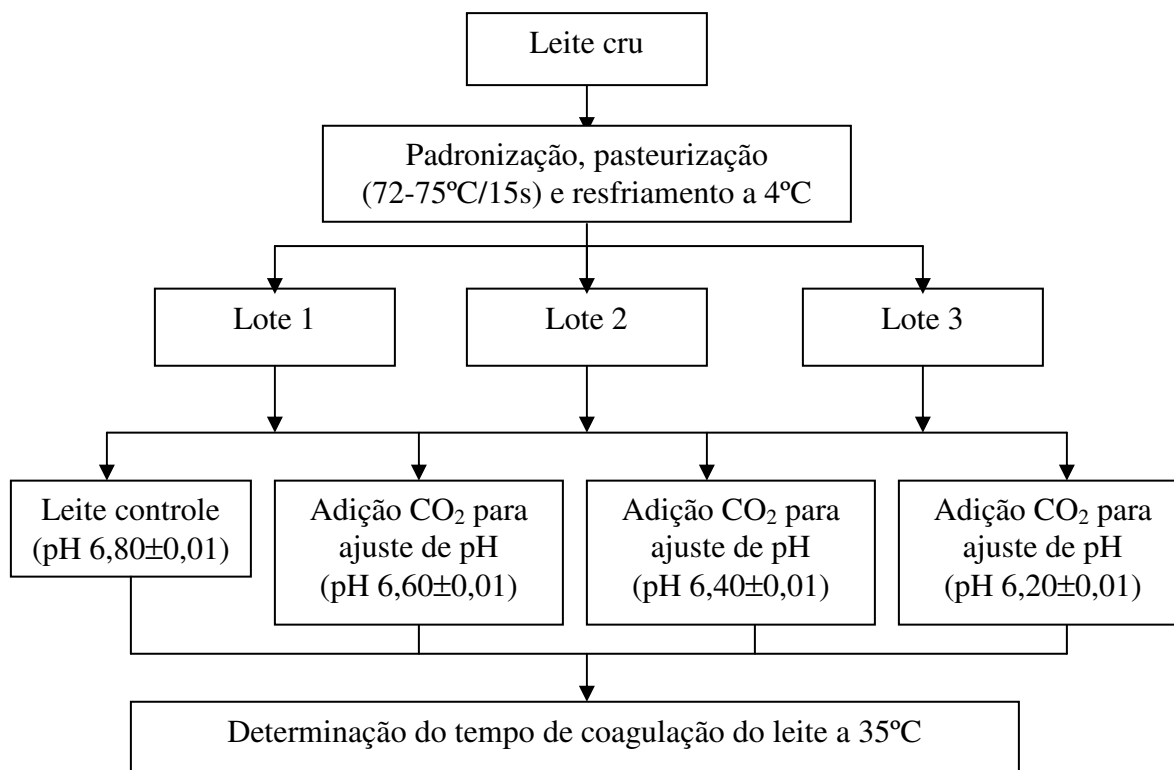


Figura 1. Fluxograma do esquema geral do trabalho para avaliar efeito da pré-acidificação do leite com CO₂ sobre o tempo de coagulação.

4.1.2. Amostragem

O leite cru foi avaliado quanto ao pH, acidez titulável, densidade, gordura e extrato seco total. O leite pasteurizado foi avaliado quanto ao pH, acidez titulável, densidade, gordura, extrato seco total, cinzas, lactose, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12% pelo método de Kjeldahl. A proteína verdadeira foi calculada pela diferença entre o nitrogênio total e o nitrogênio solúvel em TCA 12%, multiplicado por 6,38 e a porcentagem de caseína pela diferença entre o nitrogênio total e o nitrogênio solúvel em pH 4,6, multiplicado por 6,38. A eficiência de pasteurização foi avaliada através dos testes de peroxidase e fosfatase. Após a pasteurização o leite deve apresentar teste negativo para fosfatase e positivo para peroxidase.

4.1.3. Determinação do tempo de coagulação e da dosagem de coagulante

A determinação do tempo de coagulação foi feita segundo metodologia descrita no Anexo V da Instrução Normativa nº 68 (BRASIL, 2006), a qual estabelece que sejam realizadas três provas e que a média de pelo menos duas delas não apresente tempo de coagulação variando mais que 10 segundos entre si.

O ajuste do pH do leite controle ($6,80 \pm 0,01$) foi realizado através da adição de solução de ácido láctico (10%) a 35°C. Em seguida o restante do lote foi submetido a abaixamentos de pH ($6,6 \pm 0,01$; $6,4 \pm 0,01$ e $6,2 \pm 0,01$) através do borbulhamento direto de dióxido de carbono às amostras de leite a 35°C. O teste de coagulação foi realizado em balão volumétrico a partir de alíquotas de 100 ml amostras de leite submetidas aos diferentes tratamentos. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados avaliados e expressos conforme estabelecido na Instrução Normativa nº 68 (BRASIL, 2006). O tempo de coagulação foi considerado o tempo decorrido entre a adição da solução de coagulante (1 ml de solução coagulante) ao balão volumétrico e a formação dos primeiros flocos de coalhada. Durante esse período o balão foi submetido à agitação constante e para o controle do tempo utilizou-se um cronômetro.

A solução de coagulante foi preparada pela dissolução de 1% de coagulante CHY-MAX (Chr. Hansen, Dinamarca) em solução salina 7% e mantida sob refrigeração ($2\pm 1^{\circ}\text{C}$) até o momento do teste. A partir do tempo de coagulação, a dose de coagulante (g/100L) foi calculada dividindo-se o tempo de coagulação médio para cada condição de pH por 240, que representa o tempo de coagulação (40 minutos = 2400 segundo) a 35°C com ajuste para 100 litros de leite. A porcentagem de redução de coagulante para todos os pH estudados foi calculada pela seguinte formula:

$$\% \text{ RC} = 100 - 100 \times \left(\frac{\text{dose de coagulante num dado pH}}{\text{dose de coagulante num pH controle}} \right)$$

4.1.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o Split-plot e o experimento completo foi repetido três vezes. A análise estatística foi realizada através do Statistica for Windows (Versão 8.0; StatSoft Inc., 2007). O efeito da pré-acidificação do leite, através da adição de CO_2 (4 níveis de variação) sobre o tempo de coagulação foi avaliado por análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey, com nível de significância de 5%.

4.2. Metodologia para avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO_2 e da redução da quantidade de coagulante sobre as características do queijo Prato

O esquema geral de trabalho para avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO_2 e da redução da quantidade de coagulante sobre as características do queijo Prato é apresentado na Figura 2.

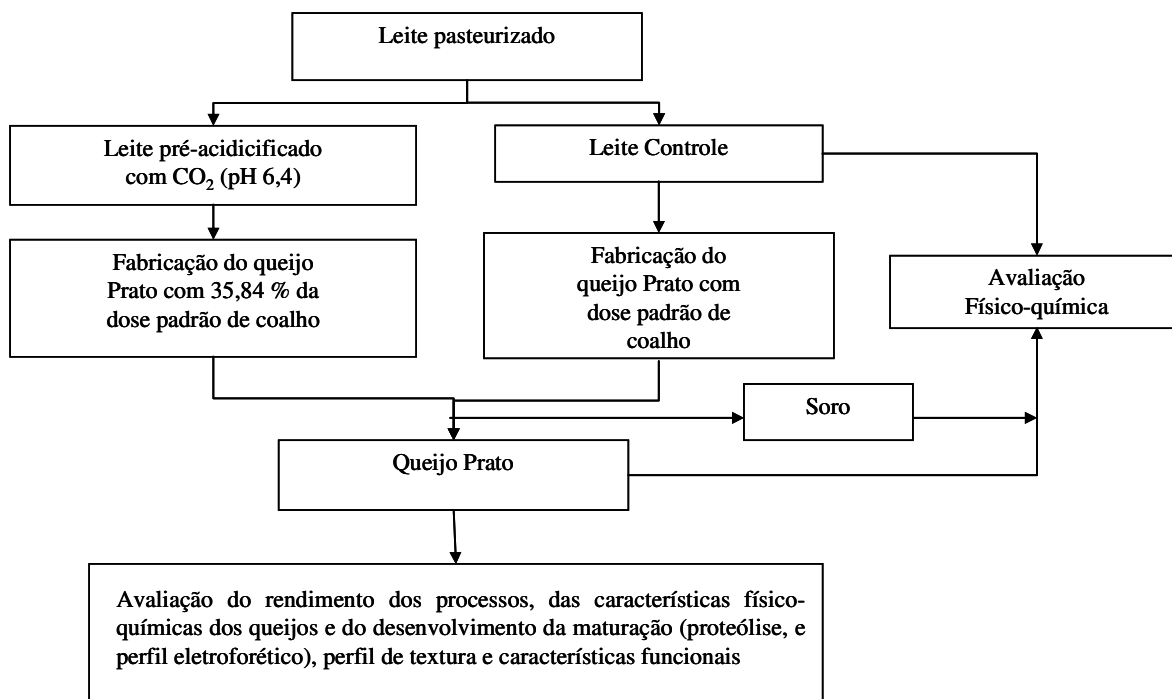


Figura 2. Esquema geral do trabalho para avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO₂ e da redução da quantidade de coagulante sobre as características do queijo Prato.

4.2.1. Matéria prima

O leite cru resfriado utilizado no 2º objetivo foi obtido no Laticínio Ati latte (Itatiba – SP), transportado em latões até a planta piloto do laboratório de Leite e Derivados do DTA/FEA/UNICAMP e mantido sob refrigeração ($8 \pm 2^\circ\text{C}$) em câmara-fria para posterior análise e processamento. O leite cru foi pasteurizado em trocador de calor a placas (72°C / 15 segundos), resfriado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, acondicionado e armazenado em câmara-fria ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) até o dia seguinte para a fabricação dos queijos.

4.2.2. Coadjuvantes tecnológicos

- Corante de urucum 10% da Chr. Hansen na proporção de 0,02% sobre a massa de leite no tanque;
- Solução de cloreto de cálcio 50% preparada com o reagente p.a. e adicionada na proporção de 0,04% sob a massa de leite;

- Fermento láctico mesofílico liofilizado R-704 composto por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* fornecido pela Chr Hansen e adicionado na proporção de 1% sob a massa de leite;
- Coagulante microbiano em pó, obtido pelo processo FPC por fermentação de microrganismo transgênico *Aspergillus niger* var. *awamori*, com nome comercial CHY-MAX (NEVES-SOUZA, SILVA, 2005), fornecido pela Chr. Hansen, na quantidade previamente determinada pelo teste de coagulação para o processo controle e 34,95% desta dose para o processamento com redução de coagulante. Ambas as dosagens coagularam o leite em 45 minutos.

4.2.3. Fabricação do queijo Prato

Os queijos foram fabricados pelo método tradicional, conforme descrito por Furtado e Lourenço Neto (1994), em tanque tipo “Queijomat”, dotado de lira para agitação e controle de agitação. O leite pasteurizado foi dividido em dois lotes, para a fabricação de dois queijos. O primeiro lote seguiu o processamento tradicional e o segundo foi adicionado de dióxido de carbono até pH 6,4 antes do processamento.

Para fabricação dos queijos, o leite foi aquecido a 35°C através da injeção de vapor na camisa do tanque. Em seguida foram adicionados cloreto de cálcio, corante urucum, fermento láctico mesofílico e coagulante na quantidade previamente determinada para coagular o leite em 45 minutos. Após a coagulação, o gel foi cortado através de liras de aço inox em cubos de 1 cm de aresta e seguida da 1ª mexedura por 15 min sob agitação lenta. Após descanso de 5 minutos foi retirado 30% do volume total em soro. A agitação foi reiniciada com a lenta adição de 20% de água (em relação ao volume inicial de leite) a 80°C, para a etapa de semi-cozimento da massa até a temperatura de 42°C, na proporção de 1°C a cada 2 – 3 minutos. O ponto da massa foi obtido com 1 hora de agitação após o início do aquecimento. O soro foi drenado e a massa enformada em formas retangulares de 1 kg que foram encaminhadas para a prensagem (20psi / 15 min, 40psi / 30 min e 50psi por 90 minutos). Os queijos seguiram para a etapa de fermentação (5 horas) e salga em salmoura

(5°C e 20% sal) por 24 horas. Ao final da salga, os queijos foram encaminhados à secagem por 24 horas (12°C) e depois embalados a vácuo e armazenados a 12°C para a maturação.

4.2.4. Procedimento de amostragem e análises realizadas

O leite cru foi avaliado quanto ao pH, acidez titulável, extrato seco total através do disco de Ackermman, densidade e gordura. O leite pasteurizado foi avaliado quanto ao pH, acidez, extrato seco total, gordura, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 12%, cinzas e lactose. A eficiência da pasteurização foi avaliada através da atividade das enzimas lactoperoxidase e fosfatase alcalina.

A evolução do pH durante o processamento foi avaliada antes da adição do fermento, após o corte, após a primeira dessoragem, no momento da drenagem do soro, ao final da prensagem, ao final da fermentação e um dia após a secagem.

O soro foi avaliado quanto à gordura, extrato seco total, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 12%, lactose e cinzas.

Um dia após o início da maturação, os queijos foram avaliados quanto a pH, gordura, umidade, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6; nitrogênio solúvel em TCA 12%, lactose, cinzas e sal. As taxas de recuperação dos constituintes e o rendimento de fabricação também foram calculados.

Para o acompanhamento da maturação, as amostras foram randomicamente escolhidas e avaliadas quanto ao pH, proteólise (percentual do nitrogênio solúvel em pH 4,6 sobre nitrogênio total e do nitrogênio solúvel em TCA 12% sobre nitrogênio total), perfil de textura e derretimento, após 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 40 dias de armazenamento.

O perfil eletroforético do queijo foi feito para o segundo processamento, onde as amostras foram preparadas e congeladas após 5, 15, 25 e 40 dias de maturação. Ao final da maturação, as amostras foram descongeladas e preparadas para corrida no UREA-PAGE (ANDREWS, 1983)

4.2.5. Determinação da recuperação dos constituintes do leite e do rendimento dos processos

A recuperação dos constituintes do leite e o rendimento do processo de fabricação foram calculados conforme descrito por Mazal *et al.* (2007). A porcentagem de recuperação (%R) dos constituintes foi calculada conforme equação abaixo:

$$\%R = \frac{100 \cdot m_{ij} \cdot c_{ij}}{m_{\text{leite}} \cdot c_{i\text{leite}}}$$

Onde:

i é o componente do queijo, j é a amostra (queijo ou soro) e m é a peso da amostra (g), cij é a porcentagem de i na amostra j, m_{leite} é o peso do leite(g), ci_{leite} é a porcentagem do componente i no leite.

O rendimento queijeiro ou real (R_{real}) e o rendimento ajustado, (R_{ajust}) foram calculados de acordo com as equações abaixo. Para o cálculo de rendimento ajustado foi considerado o teor de sal de 1,6% e umidade de 42%. O rendimento em base seca é a relação entre os componentes de base seca do queijo e sobre os do leite.

$$R_{\text{real}} = \frac{100 \cdot \text{peso do queijo(kg)}}{\text{peso do leite(kg)}}$$

$$R_{\text{ajustado}} = R_{\text{real}} \cdot 100 \cdot \left(\frac{100 - (\% \text{ umid real} + \% \text{ sal real})}{100 - (\% \text{ umid ajustada} + \% \text{ sal ajustada})} \right)$$

$$\%R_{\text{base seca}} = 100 \cdot \frac{m_{\text{queijo}} \cdot EST_{\text{queijo}}}{m_{\text{leite}} \cdot EST_{\text{leite}}}$$

4.2.6. Avaliação das propriedades funcionais

4.2.6.1. Avaliação do perfil de textura dos queijos

Para a avaliação da textura, cilindros de 2 cm de diâmetro e 2,4 cm de altura foram retirados do queijo com o auxílio de uma sonda de alumínio, acondicionados em sacos impermeáveis e mantidos em banho de água a 10°C por no mínimo 4 horas para estabilização da temperatura. A determinação do perfil de textura foi realizada em texturômetro TA-XT2, com probe de alumínio e 35 mm de diâmetro. A velocidade do teste foi de 100 mm. min⁻¹ e com compressão de 40% da altura inicial do cilindro de queijo, com repetição em 5 segundos. O teste foi feito em triplicata (FOX *et al.*, 2000; SZCZESNIAK, 2002).

4.2.6.2. Capacidade de Derretimento

A amostra foi cortada em discos de 36 mm de diâmetro e submetida a 130 °C por 10 minutos, como descrito em Nonogaki, Monteiro, Gigante (2007). A porcentagem da variação do diâmetro do disco indica a capacidade de derretimento do queijo.

4.2.7. Delineamento experimental e análise estatística

O efeito da dosagem de coagulante (dois níveis de variação) sobre as cifras de transição dos constituintes do leite para o queijo, os rendimentos e a composição dos queijos foram avaliados por análise de variância (ANOVA), ao nível de 5% de significância, utilizado o Statistica for Windows (Versão 8.0; StatSoft Inc., 2007)

O efeito da dosagem de coagulante (dois níveis de variação), do tempo de maturação (7 níveis de variação), bem como da interação destes fatores sobre a proteólise e as características funcionais foram avaliados por análise de variância (ANOVA) em delineamento fatorial. Teste de Tukey foi utilizado para detectar diferenças entre as médias. Regressão linear (Microsoft Excel 2003) foi utilizada para avaliar o efeito das interações entre os tratamentos e o tempo de armazenamento sobre a proteólise a firmeza dos queijos. Foi considerado o nível de significância de 5%.

4.3. Metodologias para as determinações analíticas

4.3.1. Determinações físico-químicas do leite cru

Os testes realizados para o leite cru foram:

pH: Foi utilizado potenciômetro devidamente calibrado, com o eletrodo introduzido diretamente na amostra.

Acidez titulável: Determinada através da titulação com hidróxido de sódio N/9 e solução indicadora fenolftaleína, de acordo com AOAC 947.05 (1995).

Densidade a 15°C: Determinada através do lactodensímetro, com correção de temperatura para 15°C.

Gordura: Determinada pelo método de Gerber de acordo com British Standart Institution (1989);

Extrato seco total (EST): Estimado através do Disco de Ackermman com base na densidade e no teor de gordura do leite.

4.3.2. Determinações físico-químicas do leite pasteurizado e soros

pH: Foi determinado utilizando-se potenciômetro calibrado e eletrodo introduzido diretamente nas amostras de leite e soro.

Acidez titulável: Foi determinada através da titulação com hidróxido de sódio N/9 e solução indicadora fenolftaleína, de acordo com AOAC 947.05 (1995).

Extrato seco total (EST): Determinação por secagem em estufa a 105°C de acordo com AOAC 925.23 (1995).

Gordura: Foi determinada pelo método de Mojonnier, de acordo com AOAC 33.7.17 (1995).

Nitrogênio total (NT): Foi determinado através do método semi-micro- Kjeldahl, de acordo com AOAC 991.20 (1995).

Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NNC): Foi determinado através do nitrogênio solúvel do filtrado após a precipitação em pH 4,6; pelo método macro-Kjeldahl, de acordo com AOAC 33.2.18 (1995).

Nitrogênio solúvel em TCA 12% (NNP): Foi determinado através do nitrogênio solúvel do filtrado, após a precipitação com TCA 12%, pelo método micro-Kjeldahl, de acordo com AOAC 33.2.12 (1995).

Proteína: Foi calculada da diferença entre nitrogênio total e o nitrogênio solúvel em TCA 12%, multiplicado por 6,38.

Soro-proteína: Calculada pela diferença entre o nitrogênio não caséico e o nitrogênio não protéico, multiplicado pelo fator 6,38.

Caseína: Foi calculada da diferença entre nitrogênio total e o nitrogênio solúvel em pH 4,6, multiplicado por 6,38.

Cinzas: Foi determinada por incineração em mufla a 550°C, de acordo com AOAC 935.42 (1995).

Lactose: Determinado segundo LANARA (1981)

Peroxidase: Foi avaliada segundo metodologia descrita no LANARA (1981), baseada no potencial da enzima, se ainda em atividade, hidrolisar o peróxido de hidrogênio e liberar oxigênio nascente. Este reage com o guaiacol formando composto corado.

Fosfatase: Foi avaliada segundo metodologia descrita na AOAC 33.2.50 (1995), baseado no potencial da enzima, se ainda em atividade, hidrolisar os ésteres fosfóricos, com liberação de fenol. Este condensa com a 2,6 dibromo ou 2,6 dicloroquinona cloroimida gerando um indofenol que em meio alcalino apresenta coloração azul.

4.3.3. Determinações físico-químicas do queijo

pH: Utilizou-se potenciômetro calibrado e eletrodo introduzido diretamente nas amostras de leite, soro e queijo.

Umidade: Determinação por secagem em estufa a 105°C de acordo com AOAC 925.23 (1995). O teor de umidade do queijo foi calculado pela formula: Umidade = 100-EST.

Gordura: Foi determinada pelo método de Mojonnier, de acordo com AOAC 33.7.17 (1995).

Gordura no extrato seco (GES): Indica o percentual de gordura no extrato seco do queijo, calculado pela formula $GES = 100 \times \text{Gordura} / (100 - \text{Umidade})$

Nitrogênio total (NT): Foi determinado através do método macro-Kjeldahl, de acordo com AOAC 920.123 (1995) utilizado o fator de conversão 6,38.

Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NNC): Determinado através do nitrogênio solúvel do sobrenadante após a precipitação no ponto isoelétrico, pelo método macro-Kjeldahl, de acordo com AOAC 920.123 (1995).

Nitrogênio solúvel em TCA 12% (NNP): Determinado através do nitrogênio solúvel no sobrenadante após a precipitação com TCA 12%, pelo método macro-Kjeldahl, de acordo com AOAC 991.21 (1995).

Proteína: Calculada da diferença entre nitrogênio total e o nitrogênio solúvel em TCA 12%, multiplicado por 6,38.

Caseína: Calculada pela diferença entre nitrogênio total e o nitrogênio solúvel em pH 4,6, multiplicado por 6,38.

Proteólise: foi expresso pelo percentual do nitrogênio solúvel em pH 4,6 em relação ao nitrogênio total e também pelo percentual do nitrogênio solúvel em TCA 12% em relação ao nitrogênio total.

Cinzas: Foi determinada por incineração em mufla a 550°C, de acordo com AOAC 935.42 (1995).

Sal: Foi determinado pelo método Volhard (RICHARDSON,1985).

Perfil eletroforético: Amostras de queijo foram digeridas em solução tampão e β -mercaptanol e em seguida congeladas em tubo Eppendorf até o momento da análise. As amostras foram analisadas em gel polimerizado de Uréia de acordo com

o método de Andrews (1983), com 4% e 12,5% de poliacrilamida no gel de cobertura e de corrida respectivamente. A separação das bandas ocorreu na voltagem constante de 90V por 15 minutos e depois à 120V até a linha da banda chegar ao final do gel. As bandas foram reveladas por imersão do gel em Brilliant Blue Coloidal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito da pré-acidificação com CO₂ sobre o tempo de coagulação do leite

A composição físico-química do leite cru e pasteurizado utilizado na primeira etapa do trabalho é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Médias das determinações físico-químicas do leite cru e pasteurizado.

Propriedades	Leite cru	Leite padronizado e pasteurizado
pH	6,82 ± 0,01	6,89 ± 0,01
Acidez (° D)	13,7 ± 0,2	14,6 ± 0,3
Densidade a 15°C (g · L ⁻¹)	1030,1	1028,2
Extrato seco total (%)	10,4	12,07 ± 0,02
Gordura (%)	2,2 ± 0,1	3,66 ± 0,01
Proteína (%)	-	3,25 ± 0,05
Caseína (%)	-	2,67 ± 0,04
Cinzas (%)	-	0,741 ± 0,003
Lactose (%)	-	4,25 ± 0,01
Fosfatase alcalina	-	Negativa
Peroxidase	-	Positiva

Segundo a Instrução Normativa n° 51 (BRASIL, 2002) o teor de gordura do leite cru refrigerado integral deve ser de no mínimo 3,0g · 100g⁻¹. Como o teor de gordura do leite cru utilizado neste processamento encontrava-se abaixo deste valor (2,2%), o leite foi padronizado para 3,5% de gordura por meio da adição de creme de leite a 37% de gordura. Como a gordura é um constituinte de matéria seca de baixo peso específico em relação aos demais, a padronização levou a um aumento no extrato seco e redução da densidade do leite pasteurizado (SHERBON, 1999).

A composição centesimal para o leite pasteurizado atende as exigências estabelecidas pela Instrução Normativa nº 51 (BRASIL 2002). O leite pasteurizado apresentou uma pequena elevação do pH que, possivelmente, pode ser atribuída à desgaseificação que ocorreu durante a padronização do teor de gordura, onde o leite permaneceu a temperatura de 45°C sob agitação para a incorporação do creme de leite, causando a retirada de CO₂ in natura do leite.

A Tabela 2 apresenta o efeito dos processamentos (3 lotes), dos tratamentos (quatro níveis de pH) bem como da interação desses fatores sobre o tempo de coagulação do leite.

Tabela 2. Efeito dos processamentos, dos tratamentos (leite controle pH 6,8 e pré-acidificado até pH 6,6, 6,4 e 6,2) assim como da interação entre eles sobre o tempo de coagulação do leite.

Fatores	GL	QM	p
Processamentos	2	12,5	0,7273
Tratamentos	3	246594,2	<0,0001
Processo * Tratamentos	6	92,1	0,0582
Erro total	32	44,8601	

GL (Graus de Liberdade); QM (Quadrado Médio); p (Probabilidade de significância em $p < 0,05$)

Observa-se na Tabela 2 que os tratamentos afetaram significativamente o tempo de coagulação do leite, enquanto os processamentos, bem como a interação entre eles e os tratamentos não afetaram o tempo de coagulação do leite. Considerando-se que os processamentos não apresentaram diferenças significativas, eles podem ser agrupados e avaliados como um único processamento, equivalente a um delineamento inteiramente casualizado, possibilitando uma melhor avaliação do efeito da pré-acidificação do leite através da adição de CO₂ no tempo de coagulação. A Figura 3 apresenta o efeito do pH sobre o tempo de coagulação do leite pré-acidificado através da adição de CO₂.

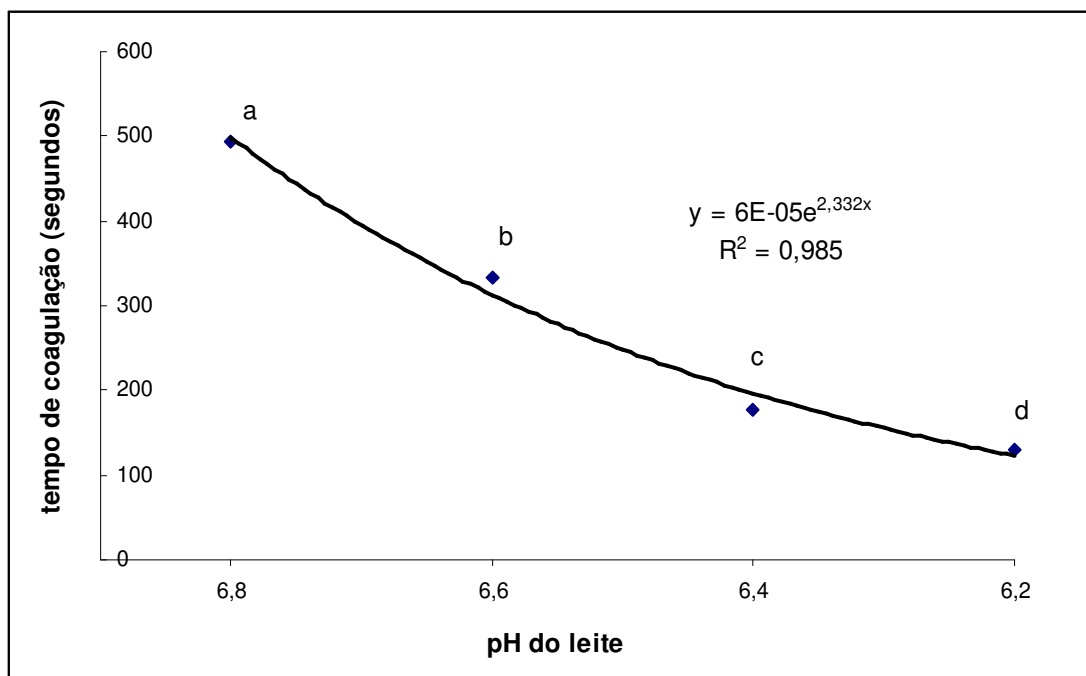


Figura 3. Efeito do pH sobre o tempo de coagulação do leite pré-acidificado através da adição de CO₂.

A Tabela 3 apresenta a dose de coagulante para cada pH e porcentagem de redução de coagulante em relação ao pH do leite controle. Os resultados convertidos de tempo de coagulação para a dosagem de coagulante para coagulação de 100L de leite em 40 minutos estão descritos na Tabela 3. A porcentagem de redução de coagulante (% RC), equivale ao percentual necessário de redução da dosagem de coagulante para coagular o leite no mesmo tempo que o pH padrão de 6,8. Observa-se na Tabela 3 que o abaixamento do pH foi acompanhado da redução da dose de coagulante necessária para coagulação do leite, mantidas as mesmas condições de temperatura e tempo de coagulação (35°C e 40 minutos), viabilizando, no mais baixo pH (6,2), a redução de aproximadamente 74% na dose de coagulante em relação ao leite controle. O efeito do pH sobre o tempo de coagulação deve-se, possivelmente, ao aumento da atividade coagulante com a aproximação do pH ótimo da quimosina, que é de 3,5 (FOLTMANN, 1993).

Tabela 3. Dose de coagulante para cada pH e redução da porcentagem de coagulante em relação ao pH controle.

pH	Dose de coagulante (g/100L)	% RC*
6,8	2,06	0,00
6,6	1,39	32,65
6,4	0,72	65,04
6,2	0,54	73,93

* Porcentagem de redução de coagulante

Em estudos realizados por Metzger *et al.* (2001a), que trabalharam com pré-acidificação de leite com ácido cítrico e acético até pH de 5,8 para fabricação de mussarela com baixo teor de lipídios, mostraram uma redução de 50% do tempo de coagulação frente a um controle não acidificado para a coagulação. Estudos de Calvo, Montilla e Olano (1993) demonstraram também efeito semelhante, utilizando o CO₂ como acidificante.

Trabalhos de Montilla, Calvo e Olano (1995) com adição de CO₂ até pH de 6,0 para a coagulação de leite, foi determinada uma redução de 75% no coalho para as mesmas condições de coagulação em relação a um queijo controle. Já McCarney, Mullan e Rowe (1995) reduziram o coalho em 50% para fabricação de queijo Cheddar fabricado com leite adicionado de CO₂, enquanto St-Gelais, Champagne e Bélanger (1997) reduziram a dosagem de coalho em apenas 30% em queijo Cheddar nas mesmas condições.

Para a continuação desse trabalho, onde se pretende avaliar o efeito da pré-acidificação do leite com CO₂ e da redução da quantidade de coagulante sobre as características do queijo Prato, escolheu-se a condição de pH 6,4 e redução de 65% na dosagem do coagulante. Essa condição possibilitou uma redução significativa do coagulante utilizado no queijo, quando comparado ao queijo controle, sem promover um excessivo abaixamento do pH, o que evita a desmineralização e conseqüentemente o prejuízo nos atributos de qualidade funcionais do queijo (FOX, 1993).

5.2 Processamento e maturação do queijo Prato

5.2.1 Composição físico-química do leite cru e pasteurizado.

A Tabela 4 apresenta a composição físico-química média do leite cru e pasteurizado utilizado nos processamentos.

Tabela 4. Características físico-químicas do leite cru e pasteurizado (n=3).

Constituintes	Leite cru	Leite pasteurizado
pH	6,86 ± 0,03	6,72 ± 0,04
Acidez (°D)	15,4 ± 0,5	15,66 ± 0,04
Densidade 15°C (g · L ⁻¹)	1031,1 ± 0,9	-
Extrato seco total (%)	12,0 ± 0,2	11,9 ± 0,2
Gordura (%)	3,3 ± 0,1	3,33 ± 0,09
Proteína verdadeira (%)	-	2,82 ± 0,04
Caseína (%)	-	2,38 ± 0,03
Cinzas (%)	-	0,67 ± 0,03
Lactose (%)	-	5,0 ± 0,2
Fosfatase alcalina	-	positiva
Peroxidase	-	negativa

Observa-se na Tabela 4 que o leite cru e pasteurizado atendem aos padrões exigidos pela IN 51 (BRASIL, 2002) quanto aos parâmetros físico-químicos. Além disso, segundo Furtado e Lourenço Neto (1994), apresentam teores de gordura e proteína apropriados para a fabricação do queijo Prato.

5.2.2 Efeito dos tratamentos sobre os parâmetros de processo e as características do queijo Prato e do soro.

A Tabela 5 apresenta o efeito dos tratamentos, do tempo de processamento, bem como da interação desses fatores sobre o comportamento do pH durante a fabricação do

queijo Prato. Observa-se na Tabela 5 que o pH foi significativamente afetado pelos tratamentos e pelas etapas do processo, e não afetado pela interação desses fatores.

Tabela 5. Efeito dos tratamentos, das etapas do processo, bem como da interação desses fatores sobre o comportamento do pH durante a fabricação do queijo Prato. (n=3).

Fator	GL	QM	P
Tratamentos*	1	0,204	< 0,01
Tempo de processamento**	6	2,594	< 0,01
Tratamento x Tempo de processamento	6	0,014	0,3280
Erro	28	0,011	

GL (Graus de Liberdade); QM (Quadrado Médio); p (Probabilidade de significância em $p < 0,05$)

* tratamentos representam o queijo controle e o queijo obtido a partir de leite pré-acidificação (CO_2) a pH 6,4, seguido da redução de 65% de coagulante.

** contempla o comportamento do pH da matéria prima e da massa já coagulada, durante as etapas de corte, delactosagem, enformagem, final da prensagem, final da fermentação, 24 h após-fabricação.

Como era de se esperar, o pH durante o processo de fabricação do queijo controle foi significativamente maior (6,05) do que o pH durante a fabricação do queijo fabricado a partir de leite pré-acidificado (CO_2) com redução de 65% de coagulante, cujo pH foi, em média, 5,91.

As Figuras 4 e 5 apresentam o comportamento do pH durante o processo de fabricação do queijo Prato e a comparação do pH dos dois tratamentos em cada etapa do processo de fabricação, respectivamente. Observa-se na Figura 4 que o pH diminuiu durante o processo para ambos os tratamentos, e não apresentou variação significativa até o momento da enformagem. A partir deste ponto, o pH apresentou queda significativa até o final da fermentação. Quando se compara o pH dos queijos obtidos pelos diferentes tratamentos em cada etapa da fabricação (Figura 5) observa-se que a partir da etapa de delactosagem não há mais diferença significativa de pH entre os dois tratamentos. A diferença do pH observada no início do processo era esperada e deveu-se à pré-acidificação do leite através da adição de CO_2 .

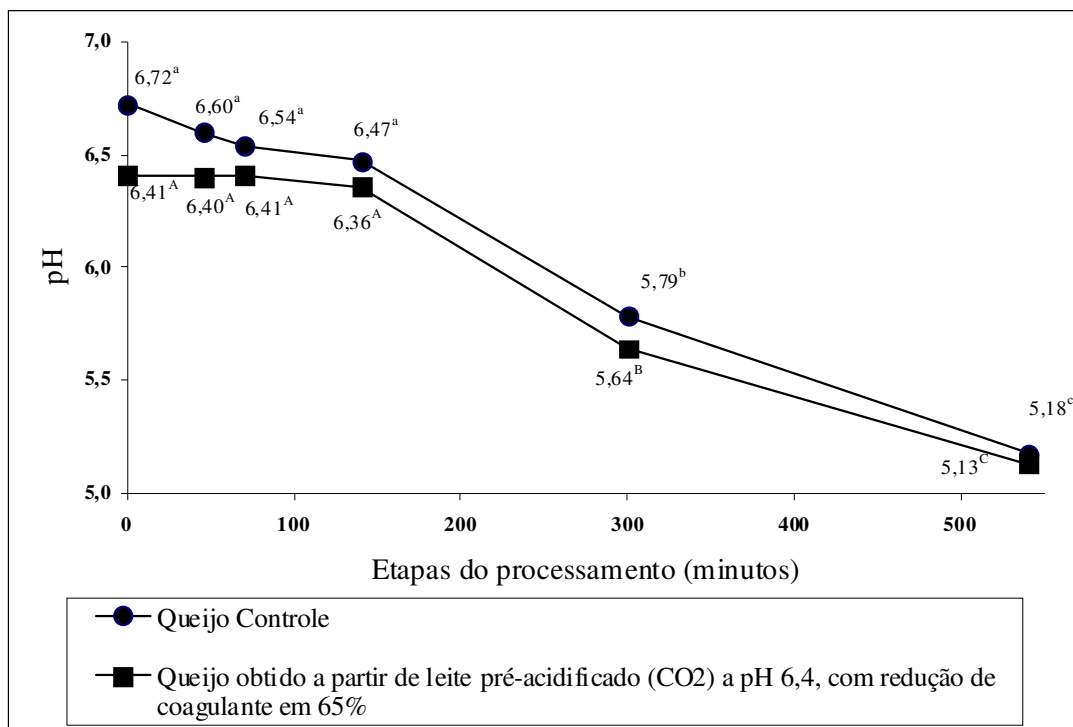


Figura 4. Comportamento do pH durante o processo de fabricação do queijo Prato. Letras minúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente ($p < 0,05$) para o tratamento controle, assim como letras maiúsculas iguais não se diferenciam estatisticamente ($p < 0,05$) para o tratamento com teor de coagulante reduzido em 65%.

Observa-se na Figura 4 que do início da fabricação até a etapa de enformagem houve uma queda de 0,25 e 0,05 unidades de pH para o queijo controle e para o fabricado a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante, respectivamente. Este comportamento sugere uma inibição da produção de ácido por parte da cultura láctica no leite adicionado de CO₂, uma vez que a cultura láctea foi adicionada nos dois tratamentos. No entanto, nas etapas subseqüentes, entre a enformagem e o final da fermentação, observou-se uma redução semelhante do pH, que variou de 1,29 e 1,23 unidades para os queijos controle e obtido a partir de leite pré-acidificado, respectivamente.

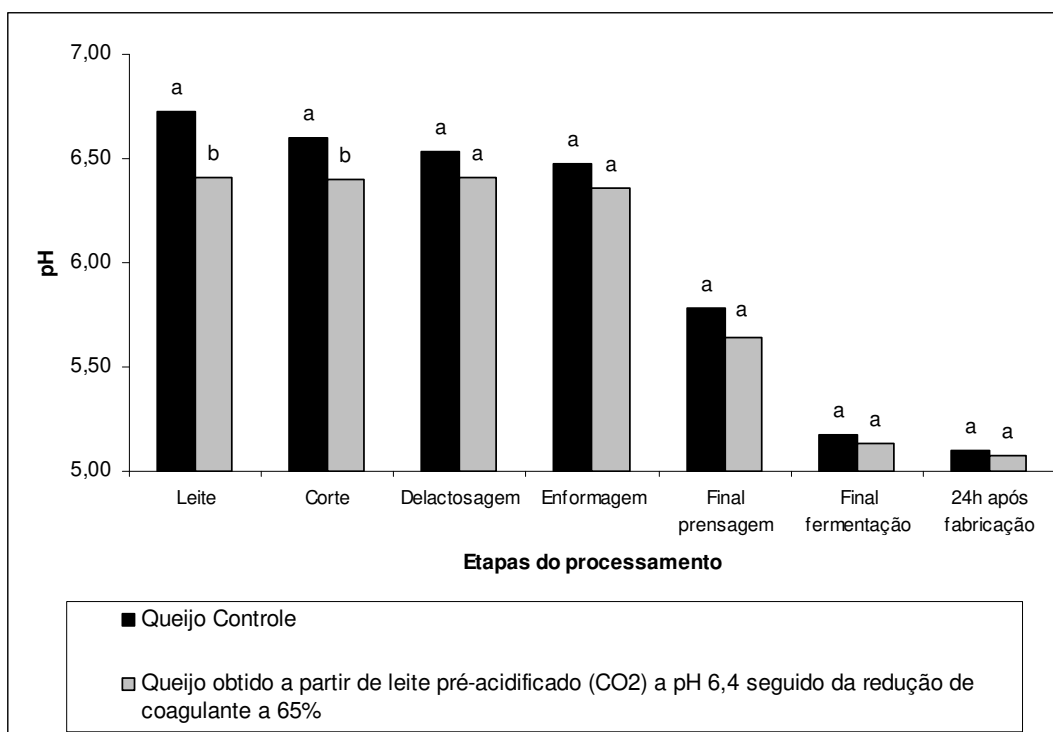


Figura 5. Comportamento do pH entre as etapas do processo de fabricação do queijo Prato. Letras iguais para uma mesma etapa do processo não se diferenciam entre si ($p < 0,05$).

Esses dados sugerem que a presença do CO₂ reduziu inicialmente a atividade da cultura láctica, conforme foi também observado por Calvo, Montilla e Olano (1993) que avaliaram fermentação do leite por cultura tipo “O”, como a utilizada neste trabalho. Por outro lado, conforme observado por outros autores (CHAMPAGNE; ST-GELAIS; CANDOLLE, 1998; RUAS-MADIEDO *et al.*, 1998; MONTILLA; CALVO; OLANO, 1995), após uma fase inicial de adaptação, as bactérias lácticas demonstraram capacidade de produção de ácido láctico semelhante, conforme demonstrado pela redução do pH em 1,29 e 1,23 unidades, para os queijos controle e obtido a partir de leite pré-acidificado (com CO₂), respectivamente, entre as etapas de enformagem e o final da fermentação.

No que diz respeito à comparação do pH em cada etapa do processo (Figura 5) verifica-se que as diferenças de pH apresentadas nas etapas iniciais desapareceram a partir da delactosagem, a qual foi efetuada 70 minutos após o início da fabricação. A partir deste ponto não se observou diferença significativa de pH entre os tratamentos até o final do

processo de fabricação dos produtos e 24 horas após a fabricação (Figura 5). Comportamento semelhante foi observado por St-Gelais, Champagne e Bélanger (1997) para a fabricação de queijo Cheddar. Esses autores iniciaram o processo de fabricação com leite controle (pH 6,67) e com leite pré-acidificado através da adição de CO₂ (pH 6,55) e após 65 minutos, na etapa de corte da massa, não observaram diferença significativa de pH entre os tratamentos, que foram 6,48 e 6,50 para os queijos controle e obtidos a partir de leite pré-acidificado (CO₂), respectivamente.

No que diz respeito à recuperação dos constituintes do leite observa-se na Figura 6 que os tratamentos não afetaram significativamente a recuperação de proteínas, caseína, gordura e cinzas do leite para os queijos e os soros controle e obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% de coagulante.

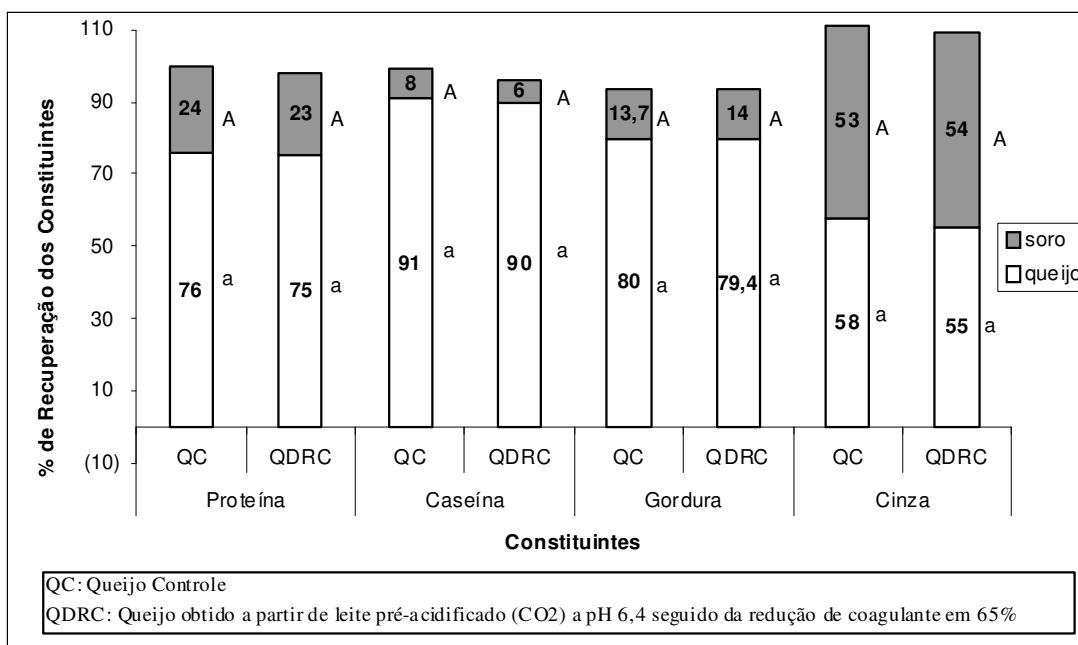


Figura 6. Efeito dos tratamentos na recuperação dos constituintes no queijo e no soro. Letras maiúsculas e minúsculas iguais não diferem significativamente ($p < 0,05$) para um mesmo constituinte do soro e queijo, respectivamente. Tratamentos: queijo controle (QC) e queijo com teor de coagulante reduzido após pré-acidificação do leite com CO₂ a pH 6,4 (QDRC).

A recuperação de proteínas, gordura e cinzas deste trabalho são menores que as médias indicadas por Furtado e Wolfschoon Pombo (1979) para queijo Prato, que é de 80,39% para proteína, 83,80% para gordura e 36,81% para cinzas. No entanto, esses autores avaliaram a recuperação dos constituintes antes da salga do produto, e desta forma desconsideraram as perdas decorrentes dessa etapa do processo. Valores semelhantes para recuperação de proteína e gordura foram observados por Mazal *et al.* (2007), que encontraram 73% e 78% de recuperação de proteína e gordura do leite para o queijo Prato, respectivamente.

Assim como neste trabalho, a recuperação de proteínas não foi significativamente afetada pela pré-acidificação do leite com CO₂ quando da fabricação de queijo Cheddar (ST-GELAIS; CHAMPAGNE; BÉLANGER, 1997; NELSON; LYNCH; BARBANO, 2004a). Entretanto, McCarney, Mullan e Rowe (1995) observaram diferença significativa na recuperação de caseína, o que também não foi observado neste trabalho (Figura 6). Segundo os autores a maior recuperação de caseína (88,8%) na fabricação de queijo Cheddar quando o leite cru foi previamente tratado com CO₂, quando comparado a leite controle (86,6%), deveu-se a melhor qualidade microbiológica do leite tratado, especialmente devido à inibição do desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos. Cabe ressaltar que no nosso trabalho o CO₂ foi adicionado ao leite pasteurizado, agindo como um coadjuvante tecnológico e não com a finalidade de preservar a qualidade microbiológica do leite cru.

Observa-se na figura 6 que os tratamentos não afetaram significativamente a recuperação de gordura que foi de 80 e 79,4% para os queijos controle e fabricado a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante, respectivamente. Na literatura, os dados de recuperação de gordura do leite para o queijo são conflitantes. Na fabricação do queijo Cheddar a partir de leite adicionado de CO₂, McCarney, Mullan e Rowe (1995) não observaram diferença significativa na recuperação de gordura, enquanto St-Gelais, Champagne e Bélanger (1997) e Nelson, Lynch e Barbano (2004a) observaram maior e menor recuperação de gordura para o queijo Cheddar tratado com CO₂, respectivamente.

Segundo St-Gelais, Champagne e Bélanger (1997), que pré-acidificaram o leite e reduziram em 30% a dose de coalho, a maior recuperação de gordura no queijo adicionado de CO₂ foi resultado da melhor formação da rede protéica devido ao menor pH no momento da coagulação. Por outro lado, Nelson, Lynch e Barbano (2004a), que pré-acidificaram o leite e não reduziram a dosagem de coagulante, consideraram que a maior recuperação de gordura para o queijo controle deveu-se ao menor pH do leite tratado com CO₂ (5,9). Segundo esses autores, o pH mais próximo do pH ótimo de atuação da quimosina possivelmente favoreceu uma proteólise não específica da caseína, diminuindo a habilidade da rede protéica de reter a gordura. Quando se compara condições de processamento deste trabalho às utilizadas por Nelson, Lynch e Barbano (2004a), é possível especular que no mais alto pH (6,4 neste trabalho comparado 5,9 no estudo citado) não se aproximou suficientemente do pH ótimo de atuação da quimosina para favorecer a hidrólise não específica da caseína, a qual foi supostamente responsável pela maior perda de gordura observada pelos autores para o queijo adicionado de CO₂. Por outro lado a menor quantidade de coagulante utilizada (redução de 65% em relação aos 30% de St-Gelais, Champagne e Bélanger, 1997) pode não ter sido suficiente para favorecer a formação de rede protéica com maior capacidade de retenção de gordura, a despeito da redução do pH.

Em consonância com os dados de recuperação dos constituintes do leite para o queijo, observa-se na Tabela 6 que os tratamentos não afetaram significativamente o rendimento dos processos.

Tabela 6. Efeito dos tratamentos sobre o rendimento dos processos de fabricação.

	Queijo Controle	Queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO ₂) a pH 6,4 e redução de coagulante em 65%	P***
Rend. Queijeiro *	9,5 ± 0,2	9,3 ± 0,1	0,219806
Rend. Ajustado **	9,3 ± 0,3	9,26 ± 0,09	0,919231
Rend. base seca (%)	45,5 ± 0,9	45,4 ± 0,3	0,812288

* Expresso em: kg queijo/100 kg de leite

** Expresso em: kg queijo/100 kg de leite e ajustado para 42% umidade e 1,6% sal .

*** p (Probabilidade de significância em p < 0,05)

Assim como neste trabalho, St-Gelais, Champagne e Bélange (1997) não observaram diferença de rendimento de fabricação de queijo Cheddar a partir de leite controle e pré-acidificado com CO₂. Por outro lado, diferente deste trabalho, Nelson, Lynch e Barbano (2004a) obtiveram menor rendimento ajustado para os queijos fabricados a partir de leite pré-acidificado com CO₂, que foi de 8,26 kg de queijo/100 kg de leite pré-acidificado comparado a 9,29 kg de queijo/100 kg de leite controle.

Observa-se na Tabela 6 que o rendimento queijeiro médio (9,4 kg de queijo para 100 kg de leite) foi menor que o rendimento considerado médio para queijo Prato por Furtado e Lourenço Neto (1994), que gira em torno de 10,5 a 11,2 kg de queijo para 100 kg de leite. Por outro lado o rendimento ajustado foi igual ao observado por Mazal *et al.* (2007) para os mesmos ajustes de umidade (42%) e sal (1,6%).

As Tabelas 7 e 8 apresentam o efeito dos tratamentos sobre a composição físico-química do queijo Prato e do soro, respectivamente.

Tabela 7. Composição físico-química do queijo e efeito dos tratamentos sobre a composição dos queijos (p < 0,05).

Constituinte (%)	Queijo controle	Queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO ₂) a pH 6,4 e redução de coagulante em 65%	p
Umidade	43 ± 1	42,2 ± 0,9	0,002934
Gordura	28,0 ± 0,4	28,3 ± 0,3	0,376046
GES*	49 ± 1	49 ± 1	0,815410
Proteína bruta	24,1 ± 0,3	24,2 ± 0,5	0,766715
Proteína	23,5 ± 0,2	23,6 ± 0,3	0,850223
Caseína	22,8 ± 0,9	23,1 ± 0,9	0,763839
Cinzas	4,0 ± 0,3	3,9 ± 0,3	0,635186
Sal	1,89 ± 0,08	1,9 ± 0,1	0,754557
pH	5,10 ± 0,05	5,07 ± 0,04	0,470863

* Gordura no extrato seco; p (Probabilidade de significância)

Tabela 8. Composição físico-química do soro e valor p ($p < 0,05$) para diferenças significativas entre os tratamentos.

Constituinte (%)	Queijo Controle	Queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO_2) a pH 6,4 e redução de coagulante em 65%	p
EST *	$6,0 \pm 0,1$	$5,98 \pm 0,01$	0,849184
Gordura	$0,52 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,08$	0,878226
Proteína verdadeira	$0,62 \pm 0,06$	$0,6 \pm 0,1$	0,726688
Caseína	$0,21 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,06$	0,270571
Soro-proteína	$0,41 \pm 0,09$	$0,4 \pm 0,1$	0,834161
Lactose	$4,6 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,1$	0,705272
Cinzas	$0,40 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,07$	0,871104
pH	$6,47 \pm 0,08$	$6,49 \pm 0,08$	0,576274

* Extrato Seco Total; p (Probabilidade de significância)

Observa-se na Tabela 7 que os queijos obtidos por ambos os processamentos atenderam aos parâmetros exigidos pela legislação (BRASIL, 1997) que regulamenta a identidade e qualidade do queijo Prato, que é classificado como um queijo gordo (45-59,9% de gordura no extrato seco) e de média umidade (36-45,9%). Além disso, os queijos apresentaram entre 42 - 44% de umidade, 26 - 29% de gordura e 1,6 - 1,9% de sal, que é considerada a composição típica para o queijo Prato segundo Furtado e Lourenço-Neto, (1994). Outros autores fabricaram queijo Prato com composição semelhante, exceto pelo teor de sal mais baixo, que foi de 1,59 %, 1,4% e 0,97% em queijos obtidos por Mazal, *et al.* (2007), Nonogaki, Monteiro e Gigante (2007) e Cichoski *et al* (2002), respectivamente.

Os tratamentos afetaram o teor de umidade dos queijos, que foi significativamente menor para o queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO_2) com redução de 65% do coagulante. Os demais constituintes não foram significativamente afetados pelos diferentes tratamentos. Observa-se na Tabela 8 que os constituintes do soro não foram significativamente afetados pelos tratamentos.

Considerando que o protocolo de processamento (ponto de corte, tamanho dos grãos, agitação e temperatura) foi o mesmo para ambos os tratamentos, a menor umidade do queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante deveu-se, possivelmente, ao menor pH durante o processo de fabricação (Tabela 5). O menor pH favorece as interações protéicas do coágulo e promove maior contração da malha protéica favorecendo a expulsão de soro (FOX, 1993), o que resultou na diferença de umidade dos queijos. Diferente do observado neste trabalho, a pré-acidificação do leite com CO₂ não afetou significativamente a umidade do queijo Cheddar. St-Gelais, Champagne e Bélanger (1997) fabricaram o queijo a partir de leite controle (pH 6,67) e pré-acidificado até pH 6,55 e obtiveram queijos com 36,21 e 35,84% de umidade, respectivamente; enquanto Nelson, Lynch e Barbano (2004a) partiram de leite com pH 6,65 (controle) e 5,90 (pré-acidificado) e obtiveram queijos com 36,84 e 37,67%, respectivamente. Assim como neste trabalho, St-Gelais, Champagne e Bélanger (1997), que produziram queijo Cheddar a partir de leite pré-acidificação com CO₂ seguido da redução de 30% no teor de coalho, também não observaram diferença significativa nos teores de gordura, proteínas, cinzas e sal, entretanto obtiveram menor tempo de cheddarização a partir da pré-acidificação do leite.

A diferença do pH durante a fabricação dos queijos (Tabela 5) não implicou, como era de se esperar em diferença no teor de cinzas dos queijos. No entanto, o teor de cinzas contempla além da fração dos minerais provenientes do leite, o sal presente no queijo. Neste trabalho não foi possível avaliar o teor de cálcio, porém diferenças no pH durante o processo de fabricação de queijos está associada à maior desmineralização do coágulo e à obtenção de produtos com menores teores de cálcio (NELSON; LYNCH; BARBANO, 2004a; CREAMER; LAWRENCE; GILLES, 1985; METZGER *et al.*, 2001a).

Quanto ao pH do soro, a Tabela 8 mostra que não há diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). O valor médio do soro controle foi de 6,47 enquanto o soro obtido a partir de leite pré-acidificado com CO₂ foi de 6,49. A não diferenciação dos pH's permite o posterior aproveitamento do soro como matéria-prima para outros processos, como a fabricação de bebidas lácteas, separação de soro-proteínas e lactose.

5.2.3. Efeito dos tratamentos e do tempo sobre as características de maturação do queijo Prato.

A Tabela 9 apresenta o efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento (n = 7), assim como da interação desses dois fatores sobre o comportamento da umidade, pH, e proteólise dos queijos, expressa como nitrogênio solúvel em pH 4,6 (% do NT) e nitrogênio solúvel em TCA 12% (% do NT).

Tabela 9. Resumo da análise de variância (ANOVA). Efeito do tratamento, tempo e da interação tratamento x tempo sobre umidade, pH, % do nitrogênio solúvel em pH 4,6 (%NT) e % do nitrogênio solúvel em TCA 12% (%NT).

Fator de Variação	GL	Valores de p			
		Umidade	pH	NS-pH 4,6 (%NT)	NS-TCA 12% (%NT)
Tratamento*	1	<0,0001	0,0042	<0,0001	<0,0001
Tempo	6	0,1361	<0,0001	<0,0001	<0,0001
TratamentoxTempo	6	0,8838	0,9001	<0,0001	<0,0001

* tratamentos representam o queijo controle e o queijo obtido a partir de leite pré-acidificação (CO₂) a pH 6,4, seguido da redução de coagulante em 65%.

Observa-se na Tabela 9 que os tratamentos afetaram a umidade dos queijos e foi, em média, 43,0% para o Queijo Controle e 42,2% para o queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante. O tempo de armazenamento, assim como a sua interação com o tratamento não afetaram a umidade dos queijos. A manutenção da umidade era esperada uma vez que a maturação do queijo ocorreu dentro de embalagens plásticas a vácuo, as quais limitam a perda de umidade para o ambiente.

Os tratamentos e o tempo de armazenamento afetaram significativamente o pH dos queijos, entretanto, a interação entre os tratamentos e o tempo de armazenamento não foi significativa (Tabela 9). O queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante apresentou menor pH médio (5,10) do que o queijo controle (5,12). Valores médios de pH foram semelhantes ao encontrados por Vianna *et al.* (2008) que foi

de 5,17 e menores que os observados por Mazal *et al.* (2007) onde o pH médio foi de 5,35. O pH aumentou ligeiramente ao longo do tempo (Figura 7) e diferiu significativamente entre o pH final (5,14 unidades de pH) até os pH's iniciais (tempo 1, 5, 10 e 15). O aumento do pH do queijo Prato no decorrer da maturação foi também observado por GUTIERREZ *et al.* (2004) e deve-se à liberação de compostos alcalinos resultantes da degradação protéica (FOX, 1993), apesar do efeito nem sempre ser significativo, como descrito por Spadoti *et al.* (2003a) e Spadoti, Dornellas e Roig (2005).

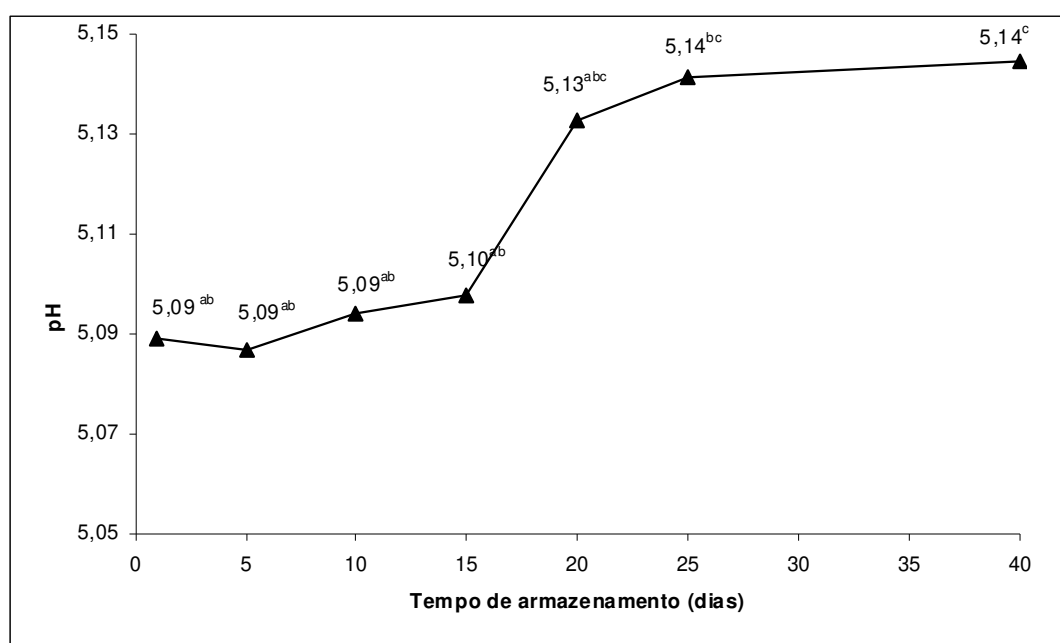


Figura 7. Efeito do tempo de armazenamento sobre o pH dos queijos. Valores seguidos de letras iguais não se diferenciam significativamente ($p < 0,05$).

Observa-se na Tabela 9 que os tratamentos, o tempo de maturação, bem como a interação desses fatores, afetaram significativamente a proteólise dos queijos, expressa pelo NS-pH 4,6 (%NT) e NS-TCA 12% (%NT). Os queijos controles e obtido a partir de leite pré-acidificado (CO_2) com redução de 65% do coagulante apresentaram, em média, 8,09 e 6,98% de NS pH 4,6 (%NT) e 3,39 e 3,15% de NS-TCA 12% (%NT), respectivamente. Além disso, a proteólise aumentou significativamente ao longo do tempo. Entretanto,

considerando que a interação entre dois fatores foi significativa, pode-se afirmar que o comportamento da proteólise foi diferente para os dois tratamentos ao longo do tempo.

As Figuras 8 e 9 apresentam o comportamento do NS-pH 4,6 (%NT) e NS-TCA 12% (%NT) para os dois tratamentos durante a maturação dos queijos. O NS-pH 4,6 variou de 4,08% a 11,75% entre o primeiro e o 40º dia de maturação para o queijo controle e de 3,56% a 10,23% no mesmo período para o queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante. O NS-TCA 12% variou do primeiro ao 40º dia de maturação de 1,47 a 5,37% para o queijo controle e de 1,33 a 4,68% para o queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante.

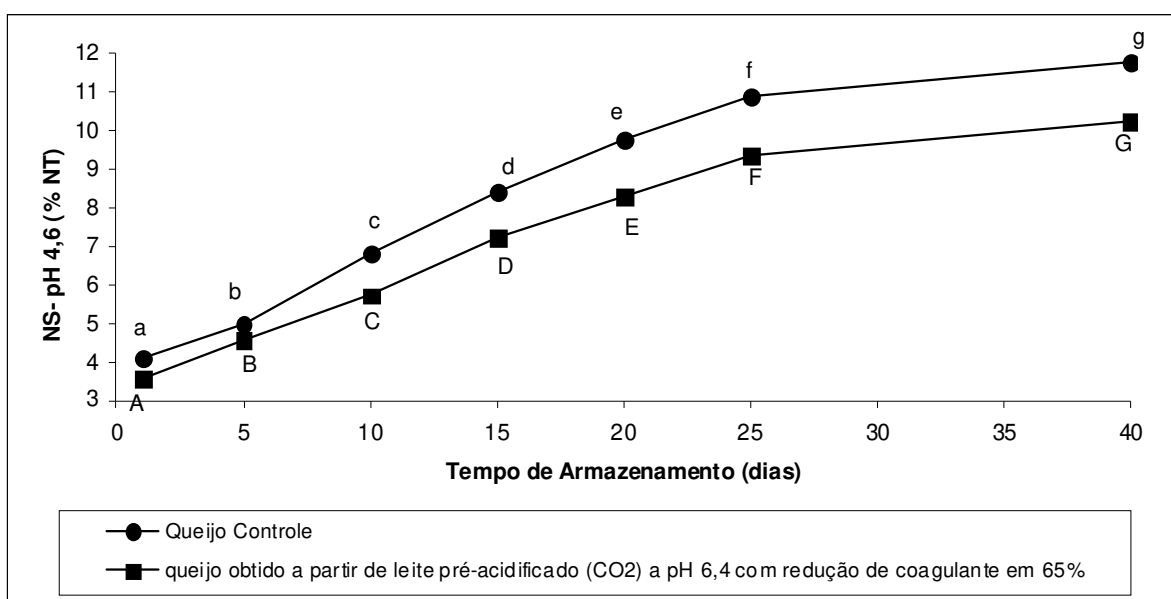


Figura 8. Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre o NS-pH 4,6 (%NT). Letras iguais não se diferenciam significativamente ($p < 0,05$) num mesmo tratamento.

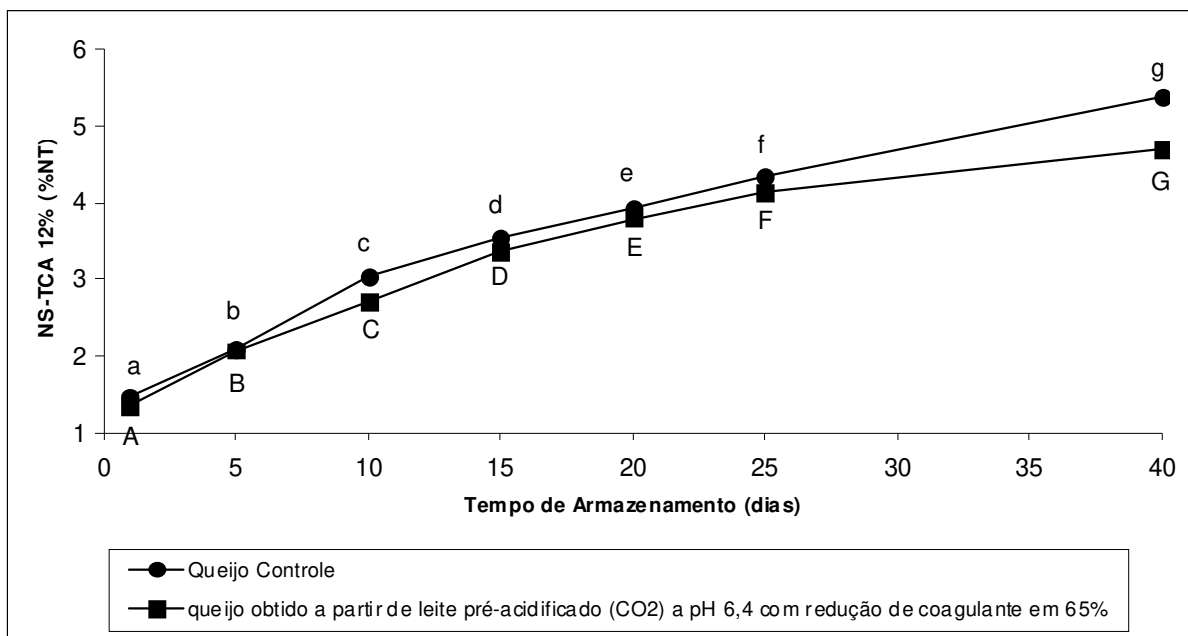


Figura 9. Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre o NS-TCA 12% (%NT). Letras iguais não se diferenciam significativamente ($p < 0,05$) num mesmo tratamento.

Considerando a semelhança dos comportamentos do NS-pH 4,6 (%NT) e NS-TCA 12% (%NT) para ambos os tratamentos ao longo do tempo (Figuras 8 e 9) e o fato da interação entre os tratamentos e o tempo de armazenamento ter afetado significativamente o comportamento da proteólise, recorreu-se a avaliação do tipo de cinética de reação de formação dos compostos avaliados para expressar a interação. Inicialmente avaliou-se a ordem da reação de formação de NS-pH 4,6 (%NT) e NS-TCA 12% (%NT). Foram testadas reações de ordem 0, 1/2, 1, 3/2, 2 e Michaelis-Menten e os gráficos são apresentados no Anexo I. A avaliação dos dados indicou que ambos os compostos foram melhor ajustados (maior r^2) para o modelo de ordem zero. Para NS-pH 4,6 (%NT), $r^2 = 0,9039$ para queijo controle e $r^2 = 0,9224$ para queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO_2) com redução de 65% de coagulante. Para NS-TCA 12% (%NT), $r^2 = 0,9512$ para queijo controle e $r^2 = 0,9072$ para queijo obtido com redução de 65% de coagulante. No modelo de ordem zero a velocidade de formação de NS-pH 4,6 (%NT) e NS-TCA 12% (%NT) não depende da concentração dos mesmos.

Desta forma, através de regressão linear pode-se avaliar a velocidade de formação dos compostos através da inclinação da reta obtida. Com base nesses dados, as Figuras 10 e 11 apresentam a regressão linear do efeito do tempo de armazenamento sobre formação de NS-pH 4,6 (%NT) e NS-TCA12% (%NT) para os queijos controle e o obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante, respectivamente. O Anexo II apresenta os resultados completos da avaliação da regressão linear. A velocidade de formação de NS-pH 4,6 (%NT) e NS-TCA12% (%NT) é significativamente ($p < 0,05$) menor no queijo com reduzido teor de coalho quando comparado ao queijo controle. Através das equações apresentadas nas Figuras 10 e 11 pode-se calcular que a formação NS-pH 4,6 (%NT) e NS-TCA 12% (%NT) são aproximadamente 14 e 13% menor no queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante do que no queijo controle, respectivamente. Ou seja, a velocidade de proteólise do queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante é menor que do queijo controle.

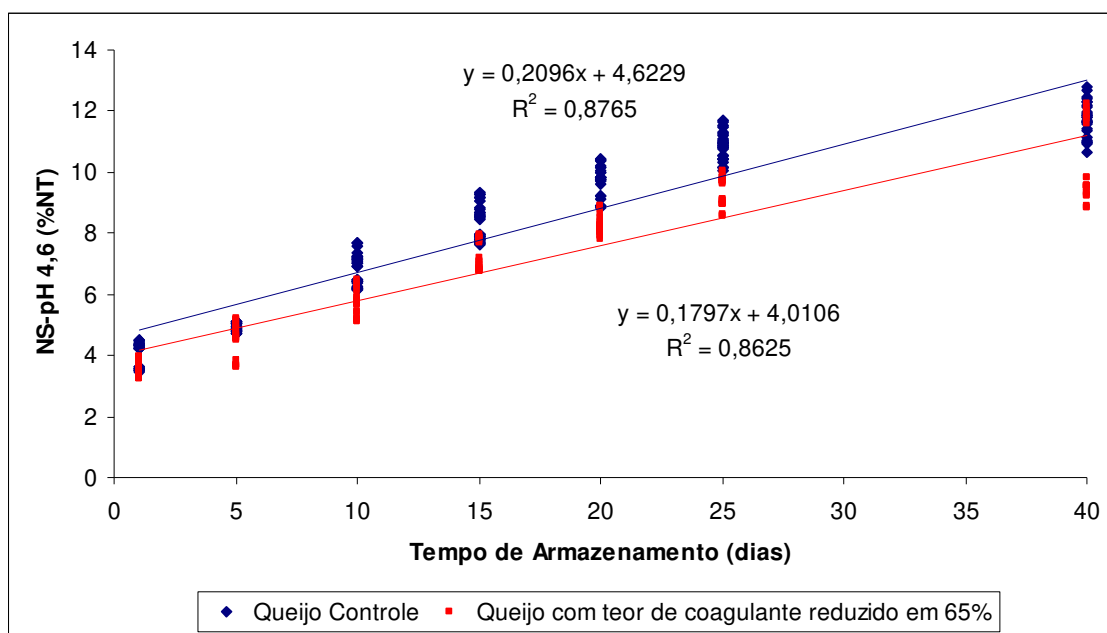


Figura 10. Regressão linear para avaliar efeito dos tratamentos (queijo controle e queijo com teor de coagulante reduzido após pré-acidificação do leite com CO₂ a pH 6,4, seguida da redução de coagulante em 65%) e do tempo de armazenamentos sobre a formação de NS-pH 4,6 (%NT).

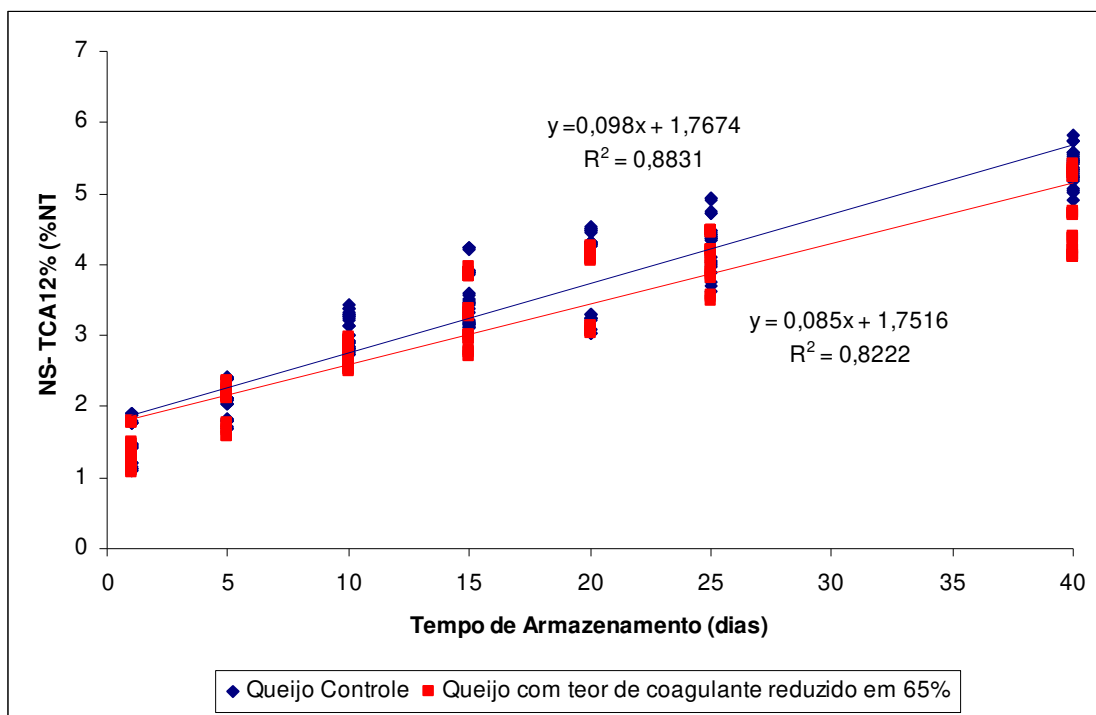


Figura 11. Regressão linear para avaliar efeito dos tratamentos (queijo controle e queijo com teor de coagulante reduzido após pré-acidificação do leite com CO₂ até pH 6,4, seguida da redução de coagulante em 65%) e do tempo de armazenamentos sobre a formação de NS-TCA 12% (%NT).

A Figura 12 mostra o perfil eletroforético dos queijos controle e obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante após 5, 15, 25 e 40 dias de maturação. Em consonância com os dados da avaliação da proteólise através das frações nitrogenadas, observa-se na Figura 12 a hidrólise das frações α_{S1} - e β - da caseína durante a maturação para ambos os tratamentos, entretanto, menor hidrólise da fração α_{S1} -caseína foi observada para o queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante. Já no primeiro ponto de avaliação, após cinco dias de fabricação, observa-se a menor formação de α_{S1} -I-caseína para o queijo fabricado com teor reduzido de coagulante (Banda 2) e, após 40 dias de maturação, observa-se claramente a maior degradação da fração α_{S1} - caseína para o queijo controle (Banda 7). Embora a degradação da β -caseína tenha ocorrido de forma mais lenta, observa-se claramente que após 40 dias de maturação houve maior degradação da β -caseína do queijo controle (Banda 7) do que do queijo

fabricado com redução de coagulante (Banda 8). O sítio primário de ação da quimosina na α_{S1} -caseína é a ligação Phe₂₃–Phe₂₄, o que resulta na produção de pequenos peptídeos (α_{S1} -cn f₁₋₂₃) que são rapidamente hidrolisados pelas proteases do fermento (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987; McSWEENEY, 2004) e o fragmento f₂₄₋₁₉₉, conhecido com α_{S1} -I-cn que é acumulado no primeiro momento da maturação do queijo Prato (GOROSTIZA *et al.*, 2004), sendo também posteriormente degradado dependendo do período de maturação. A menor proteólise observada nos queijo fabricado a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante pode ser atribuída à menor quantidade de coagulante utilizada na fabricação desse queijo, a qual foi viabilizada pela pré-acidificação do leite.

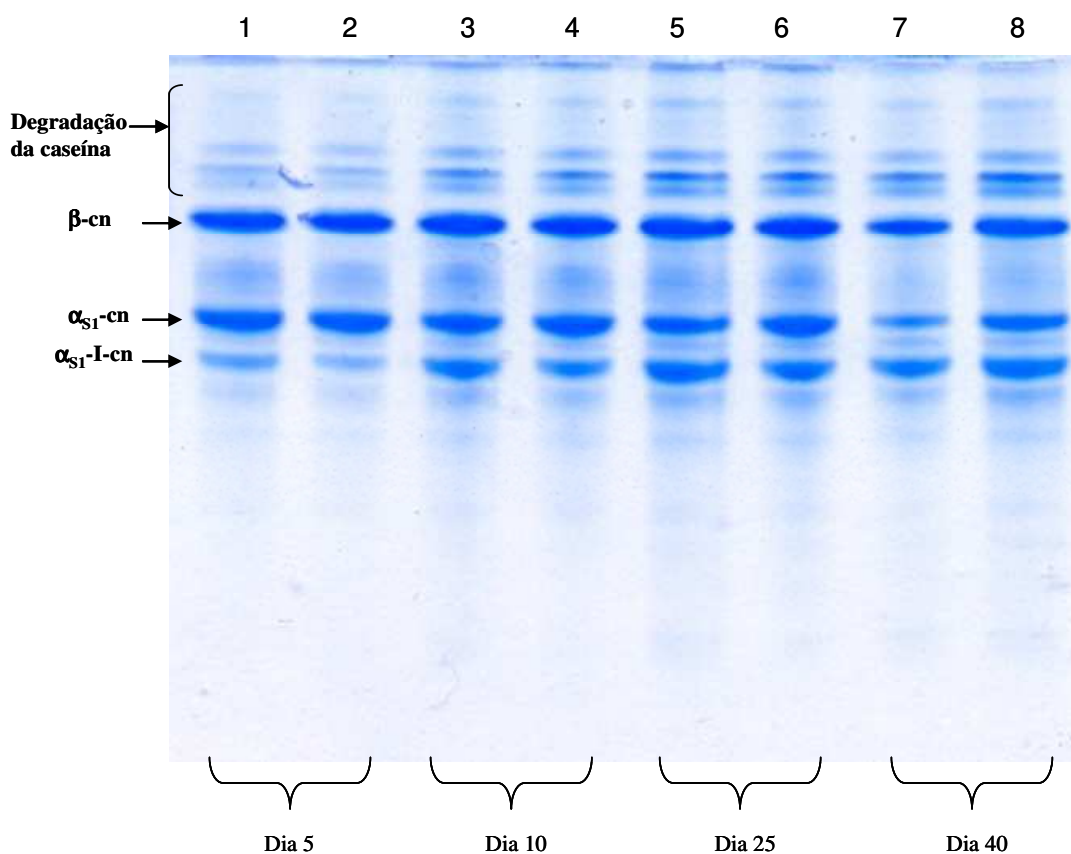


Figura 12. Perfil eletroforético do queijo Prato durante a maturação. Bandas 1, 3, 5 e 7: queijo controle com 5, 15, 25 e 40 dias de maturação, respectivamente. Bandas 2, 4, 6 e 8: queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) até pH 6,4 e com redução de 65% do coagulante após 5, 15, 25 e 40 dias de maturação, respectivamente.

Maior degradação de α_{S1} - e β -caseínas também foi observada por Montilla, Calvo e Olano (1995) após 1 dia de fabricação do queijo Ibérico a partir de leite pré-acidificado (pH 6,0) com redução de 75% do coalho, quando comparado ao queijo controle. St-Gelais, Champagne e Bélanger (1997) também observaram menor teor de nitrogênio solúvel em TCA 12% após 14 dias de maturação do queijo Cheddar fabricado a partir de leite pré-acidificado (pH 6,55) e redução de 30% do coalho. Estes autores atribuíram a menor proteólise à redução do coalho na fabricação do produto. McCarney, Mullan e Rowe (1995) processaram queijo cheddar com teor de coalho reduzido em 50% a partir de leite previamente adicionado de CO_2 e armazenado (0, 2 e 4 dias) e observaram uma menor proteólise frente a um queijo controle, e o efeito foi atribuído, além da menor quantidade de enzimas proteolíticas provenientes do desenvolvimento de bactérias psicotróficas, à redução do coalho.

Os valores médios de NS-pH4,6 (%NT) encontrados neste trabalho foram inferiores aos reportados por Mazal *et al.* (2007) onde foi encontrado o percentual de 10,8% durante o período de 5 a 40 de armazenamento. As variações descritas na literatura podem ser maiores dos que os observados neste trabalho, como por exemplo, variação de 7,23 a 17,9% entre 1 e 45 dias de maturação (GOROSTIZA *et al.*, 2004) ou de 5 a 13% entre 5 e 45 dias de maturação conforme observado por Barros *et al.* (2006a). Já os valores médios encontrados neste trabalho de NS-TCA 12% (%NT) foram inferiores aos descritos na literatura, como os valores de 5,7% apresentado por Mazal *et al.* (2007) e 5,17% por Vianna *et al.* (2008) após 40 dias de maturação. Variações semelhantes foram descritas, como a apresentada por Barros *et al.* (2006a), onde o NS-TCA 12% (%NT) variou de 2 a 5,5% entre 5 e 45 dias de armazenamento; ou Narimatsu *et al.* (2003), cujos valores variaram de 2,4 a 5% de 10 a 45 dias de armazenamento e Spadoti, Dornellas e Roig (2005), que após maturação do queijo Prato por 45 dias observaram variação de 2,25 até 5% no NS-TCA 12% (%NT). Essas variações são naturais e esperadas, pois a proteólise é um fenômeno bioquímico dependente, dentre outros fatores, do tipo, quantidade e atividade de enzimas proteolíticas naturais de leite e adicionadas durante o processo de fabricação, da temperatura, umidade, e pH do queijo (FOX, 1993).

5.2.4 Efeito da redução do coagulante sobre a firmeza e o derretimento do queijo Prato.

A Tabela 10 apresenta o efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento ($n = 7$), assim como da interação desses dois fatores sobre o comportamento da firmeza e do derretimento do queijo Prato.

Tabela 10. Resumo da análise de variância (ANOVA). Efeito do tratamento (queijo controle e queijo obtido a partir de leite pré-acidificado com CO_2 a pH 6,4 seguido da redução de coagulante em 65%), tempo de armazenamento e da interação tratamento x tempo sobre a firmeza e o derretimento do queijo Prato.

Fator de Variação	GL	Valores de p	
		Firmeza	Derretimento
Tratamento	1	<0,0001	<0,0001
Tempo	7	<0,0001	<0,0001
Tratamento * Tempo	7	0,0005	0,3500

GL (Graus de liberdade); p (probabilidade de significância < 0,05)

Observa-se na Tabela 10 que os tratamentos, o tempo de armazenamento, bem como a interação desses dois fatores, afetaram significativamente a firmeza dos queijos. O queijo controle apresentou, em média, menor firmeza (4080g) em relação ao queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO_2) e com redução de 65% do coagulante (4538g). Além disso, a firmeza do queijo controle diminuiu significativamente durante o tempo de armazenamento tendo apresentado diferença significativa entre o 10º e o 15º dia de armazenamento (Figura 13), diferente do queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO_2) e com redução de 65% do coagulante, que não apresentou diferença significativa durante o tempo de armazenamento. Considerando que a interação entre os dois fatores foi significativa, pode-se afirmar que o desenvolvimento da firmeza foi diferente para os dois tratamentos ao longo do tempo. Para a avaliação da variação da firmeza em relação ao tempo, foi feita a análise estatística de regressão linear para avaliar se há diferenças significativas entre as inclinações das regressões, o que representa a variação da firmeza em

relação ao tempo, ou a velocidade de amaciamento do queijo. A Figura 14 apresenta a regressão linear do efeito do tempo de armazenamento sobre a firmeza dos queijos controle e do obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante e o Anexo III apresenta os resultados completos da avaliação da regressão linear. A velocidade de amaciamento é significativamente ($p < 0,05$) menor no queijo com reduzido teor de coalho quando comparado ao queijo controle. Através das equações apresentadas na Figura 14 pode-se calcular que o amolecimento, dado em gramas por dia, é aproximadamente 2,8 vezes mais intensa no queijo controle do que no queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) com redução de 65% do coagulante.

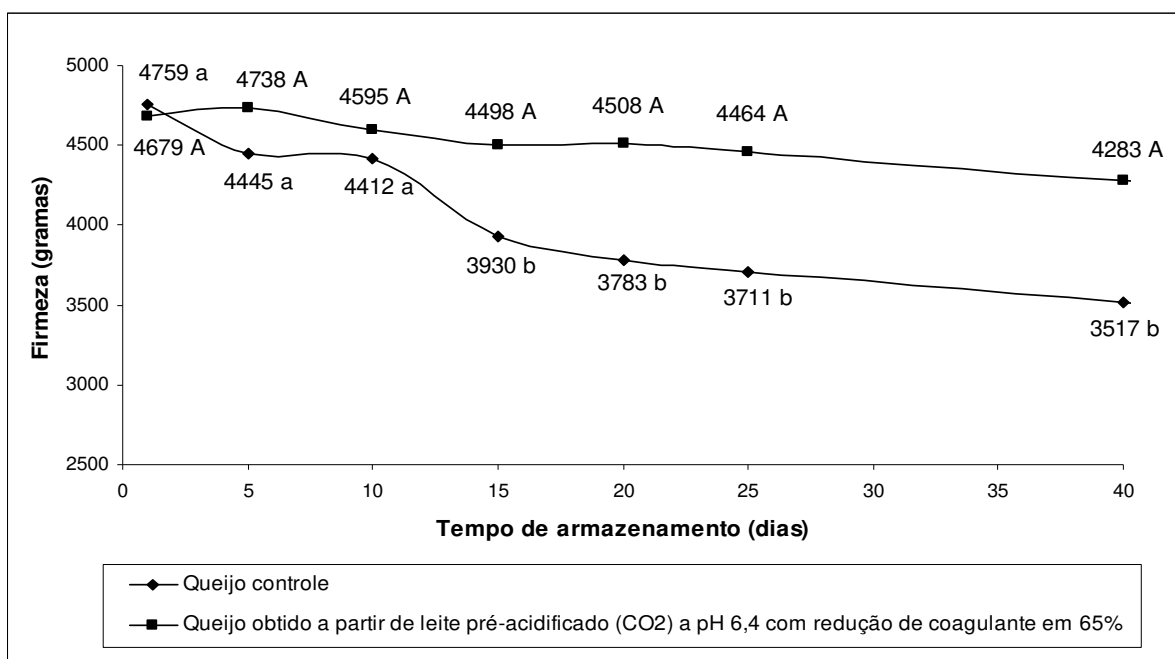


Figura 13. Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre a firmeza dos queijos. Valores seguidos de letras iguais não se diferenciam significativamente ($p < 0,05$).

No que diz respeito à capacidade de derretimento, observa-se na Tabela 10 que os tratamentos e o tempo de armazenamento afetaram significativamente o derretimento dos queijos, entretanto, não se observou um efeito significativo da interação desses fatores nessa característica do produto. O queijo controle apresentou maior capacidade de derretimento do que o queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) e com redução

de 65% do coagulante. Esses valores foram de 56% e 52% para os queijos controle e com redução de coagulante, respectivamente. Observa-se na Figura 15 que a capacidade de derretimento aumentou ao longo do tempo para ambos os tratamentos, sendo que diferenças significativas foram observadas entre o 1º, o 5º e o 10º dia de armazenamento. Após esse tempo, não há aumento significativo da capacidade de derretimento até o 40º dia de armazenamento.

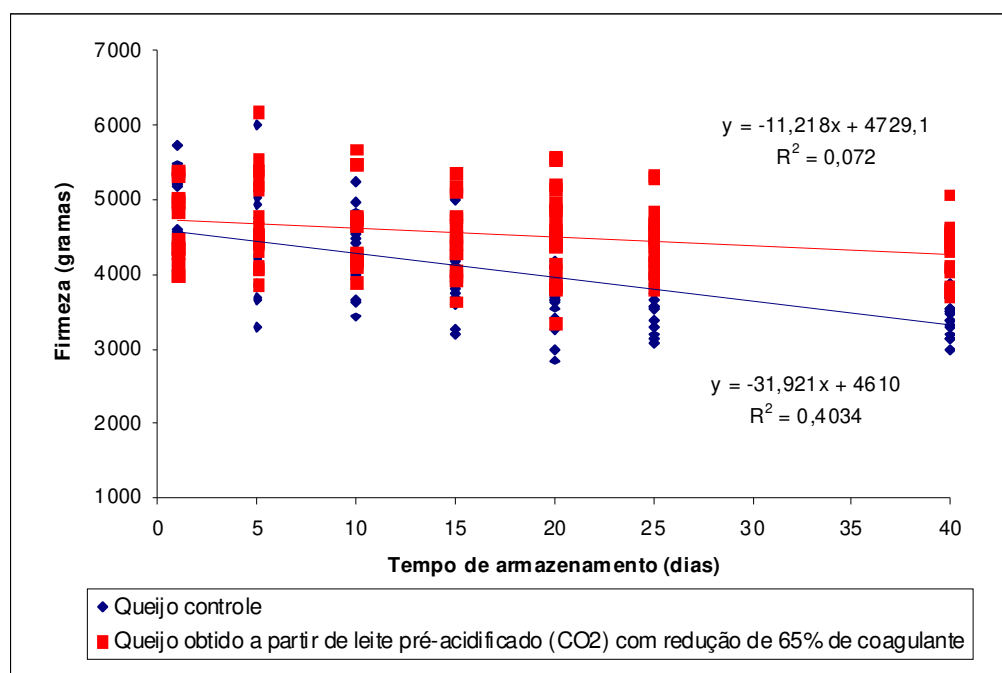


Figura 14. Regressão linear para avaliar efeito dos tratamentos (queijo controle e o com teor de coagulante reduzido após pré-acidificação do leite com CO₂ a pH 6,4, seguida da redução de coagulante em 65%) e do tempo de armazenamentos sobre a firmeza do queijo Prato.

Tanto o amaciamento do queijo, traduzido pela redução da firmeza do produto, como o aumento da capacidade de derretimento são parâmetros relacionados à proteólise, ou seja, à hidrólise da rede protéica do queijo. O amaciamento do queijo está intimamente associado à degradação da α_{S1} -caseína, especialmente no sítio Ph₂₃-Ph₂₄. O pequeno peptídeo formado (α_{S1} -CN f1-23) é rapidamente hidrolisado por proteinases provenientes

da cultura láctica (FOX, 1993). Essa degradação também contribui para o aumento da capacidade de derretimento dos queijos devido à hidratação da matriz protéica (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987). Neste trabalho observou-se que o queijo obtido a partir de leite pré-acidificado (CO₂) e com redução de 65% do coagulante apresentou menor proteólise, maior firmeza e menor capacidade de derretimento quando comparado ao queijo controle.

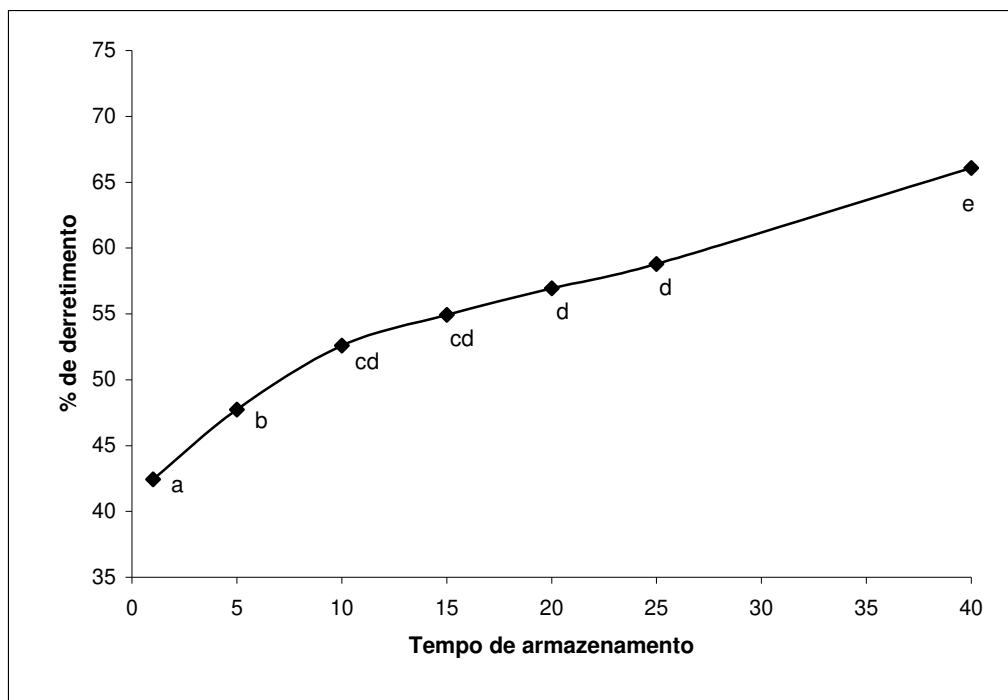


Figura 15. Efeito do tempo de armazenamento sobre o derretimento médio dos queijos. Valores seguidos de letras iguais não se diferenciam significativamente ($p < 0,05$).

A redução da firmeza e o aumento da capacidade de derretimento do queijo Prato durante a maturação foi observada por diferentes autores (BALDINI *et al.*, 1998; KATSUDA *et al.*, 1999, SPADOTTI *et al.*, 2003a; NONOGAKI; MONTEIRO; GIGANTE, 2007). Não se encontrou dados na literatura sobre desenvolvimento de firmeza ou capacidade de derretimento de queijos obtidos a partir de leite pré-acidificado ou com redução de coagulante.

5. CONCLUSÕES

- A adição de CO₂ ao leite até pH de 6,4 possibilitou a redução de aproximadamente 65% da dosagem de coagulante utilizada para fabricação do queijo Prato nas mesmas condições de tempo e temperatura de coagulação (40 minutos, 35°C) do queijo controle;
- A pré-acidificação do leite com CO₂ e a redução do coagulante em 65% afetou significativamente o pH nas etapas iniciais da fabricação dos queijos, entretanto, o pH final dos queijos não diferiram entre si;
- A pré-acidificação do leite com CO₂ e a redução do coagulante em 65% não alterou a recuperação de proteína, caseína, gordura e cinzas, assim como a composição físico-química do soro e do queijo, exceto a umidade final do queijo, que foi significativamente menor no queijo obtido a partir de leite pré-acidificado e com redução de 65% de coagulante.
- A redução de 65% de coagulante tornou a proteólise do queijo obtido de leite pré-acidificado (CO₂) e com redução de 65% de coagulante significativamente mais lenta. Essa redução da velocidade de proteólise proporcionou maior firmeza e menor suscetibilidade ao derretimento.

Resumidamente, a partir da pré-acidificação do leite (pH 6,4), através da adição de CO₂ seguida da redução de 65% na dosagem do coagulante, obteve-se um queijo Prato com composição semelhante ao queijo controle, gerando um soro cuja composição e pH não diferiu do soro controle. Além disso, a menor velocidade de proteólise do queijo obtido através da redução do coagulante, especialmente após a primeira fase da maturação, permitiu a manutenção das características físicas do queijo por maior tempo.

REFERÊNCIAS

ABIQ – **Associação Brasileira das Indústrias de Queijo**. Dados de produção de queijos no Brasil de 1991 a 2005. Divulgado em 28 de nov. de 2005, São Paulo.

ABIQ – **Associação Brasileira das Indústrias de Queijo**. Dados de produção de queijos no Brasil de 1991 a 2007. Ano de divulgação, 2007, São Paulo.

ANDREWS, A.T.. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **Journal of Dairy Research**, vol. 50, 45–55, 1983

AMIGO, L.; OLANO, A., CALVO, M.M.. Preservation of raw milk with CO₂: Sensory evaluation of heat-processed milks. **Zetschrift für Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung**. Vol 200: 193-296, 1995.

AOAC, **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16th edition Volume 1-2, 1995.

AUGUSTO, M.M.M.; VIOTTO, W.H.. Efeito do tipo de coagulante e do cozimento da massa no rendimento de queijo Prato, fabricado em escala industrial. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 360, vol 63 p. 38-46, 2008.

BALDINI, V.L.S.; CAMPOS, S.D.S.; SILVA, A.T.; VAN DENDER, A.G.F.; LAJOLO, F.M.. Alterações das características químicas e de textura do queijo tipo Prato ao longo do processo de maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. n 304 vol 53, p53 – 59, jul 1998.

BARROS, C.M.V.; CARDELLO, H.M.A.B.; VIOTTO, W.H.. Perfil sensorial de queijos Prato de baixo teor de gordura comercializados na cidade de Campinas. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife. **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 1. p. 1-4. 2004

BARROS, C.M.V.; CUNHA, R.C.; GALLINA, D.A.; VIOTTO, L.A.; VIOTTO, W.H.. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo prato light. **Ciência Tecnologia Alimentos**. Vol.26, no.1, p.11-18, Mar 2006a.

BARROS, C.M.V.; RIBEIRO, A.C.O.; VIOTTO, W.H.. Impact of low concentration factor ultrafiltration on the composition and yield of reduced fat Prato cheese. **Desalination**. 200 (1-3): 555-556, 20 de Nov. de 2006b.

BRASIL, Ministério da Agricultura da Pecuária e do Abastecimento. Portaria n.º 358, de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União** de 08/09/1997, Seção 1, Página 19690

BRASIL, Ministério da Agricultura da Pecuária e do Abastecimento Instrução Normativa nº 51, de 18 de Setembro de 2002. **Diário Oficial da União** de 20/09/2002, seção 1, página 13.

BRASIL, Ministério da Agricultura da Pecuária e do Abastecimento Instrução Normativa nº 68, de 12 de Dezembro de 2006. **Diário Oficial da União** de 14/12/2006, seção 1, página 8

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). Methods**. London: British Standards Institution, 1989. 12p.

CALVO, M.M.; MONTILLA, M.A.; OLANO, A.. Rennet – Clotting properties and starter activity on milk acidified with carbon dioxide. **Journal of Food Protection**. Vol 53 (12): 1073-1076, 1993.

CARVALHO, J.D.G; VIOTTO, W.H.; KUAYE, A.Y., The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**. n18 262–267, 2007

CHAMPAGNE, C.P.; ST-GELAIS, D.; DE CANDOLLE, A.. Acidification rates and population ratios of lactic starters in carbonated milk. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**. 31 (2): 100-106 1998

CICHOSCKI, A.J.; VALDUGA, E.; VALDUGA, A.T.; TORNADIJO, M.E.; FRESNO, J.M.. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**. 13 (4-5): 329-336, jun-jul. 2002

COSTA JÚNIOR, L.C.G.; PINHEIRO, A.J.R.. Influência da Relação Caseína/Gordura nas Características Físico-Químicas do Queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 305, p. 29-49, 1998.

CREAMER, L.K.; LAWRENCE, R.C.; GILLES, J.. Effect of acidification of Cheese Milk on the Resultant Cheddar Cheese. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**. 20, 185-203. 1985

DAVE, R.I.; MCMAHON, D.J.; OBERG, C.J.; E BROADBENT, J.R.. Influence of Coagulant Level on Proteolysis and Functionality of Mozzarella Cheeses Made Using Direct Acidification. **Journal of Dairy Science**. Vol. 86, n. 1, p.:114-126 – 2003.

EMBRAPA GADO DE LEITE – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Dados de Leite adquirido por estabelecimentos de laticínios sob inspeção no Brasil – 1998/2007. Disponível em <<http://www.cnpgl.embrapa.br/>>. Acessado em 7 de abril de 2009.

FOLEGATTI, M.I.S.; ANTUNES, A.J.; ROIG, S.M.. Influence of three rennet types on the ripening process of the Brazilian Prato cheese. **Milchwissenschaft-Milk Science International**. 52 (6): 318-322 1997

FOLTMANN, B.. General and Molecular Aspects of Rennets. In **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. Ed by FOX, P. F.. Vol 2 second edition. Ed Chapman & Hall, p 37 – 68. 1993.

FOSUM, E. Nutritional evaluation of whey protein concentrates and their fractions. **Journal of Dairy Science**, v.57, n.6, p.665-670, 1974.

FOX, P. F.; **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. Vol 2 second edition. Ed Chapman & Hall, 1993.

FOX, P.F; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H.. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: An Aspen Publication, 2000. 587 p.

FURTADO, M.M.; WOLFSCHOON POMBO, A.F.W.. Fabricação de Queijo Prato e Minas: Estudos do Rendimento. Parete I – Determinação das Cifras de Transição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 34, n.205, p. 3-19, 1979.

FURTADO, M.M.. **Princípios básicos da fabricação de queijo Prato e similares dinamarqueses**. Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 1983.

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

FURTADO, M. M. & LOURENÇO NETO, J. P. de M.; **Tecnologia de queijos** – Manual técnico para a produção industrial de queijos. Editora Dipemar LTDA, 1994.

GOROSTIZA, A.; CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, A. T.; VALDUGA, E.; BERNARDO, A.; FRESNO, J. M. Changes in soluble nitrogenous compound, 21 caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. **Food Chemistry**, v. 85, n.3 p. 407-414, 2004.

GUTIERREZ, E.M.R.; DOMARCO, R.E.; SPOTO, M.H.F.; BLUMER, L.; MATRAIA, C.. Efeito da Radiação Gama nas Características Físico-Químicas e Microbiológicas do Queijo Prato Durante a Maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24(4): 596-601, out.-dez. 2004

HOTCHKISS, J. H.; WERNER, B. G.; LEE, E. Y. C.. Addition of carbon dioxide to dairy products to improve quality: A comprehensive review. **Comprehensive review in food science and food safety**. Vol. 5, 2006.

JULIANO, A.M.M.; PETRUS, J.C.C.; TORRANO, A.D.M. Recuperação por ultrafiltração das proteínas do soro para produção de queijos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.42, n.251, p.3-6, 1987.

KATSUDA, M.M.S.; MIGLIORANZA, L.H.S.; FERREIRA, S.H.P.; FONSECA, I.C.B.. Caracterização química, sensorial e de textura, de queijo tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.54, n.309, p.128-133, 1999.

KOSIKOWSKI, F.V. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.1149-1160, 1979.

LANARA-Secretaria de Defesa Agropecuária. M.A. **Métodos Analíticos Oficiais de Controle de Produtos de origem animal e seus Ingredientes**. II - Metodos Físicos e Químicos. Brasília-DF: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1981.

LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.K.; GILLES, J.. Symposium - Cheese Ripening Technology - Texture Development During Cheese Ripening. **Journal of Dairy Science**. Vol 70 (8): 1748-1760, 1987.

LUCEY, J.A.; JOHNSON, M.E.; HORNE, D.S.. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. **Journal of Dairy Science**. vol. 86:2725-2743, 2003.

MAZAL, G.; VIANNA, P.C.B.; SANTO, S.M.V.; GIGANTE, M. L.. Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. **Journal of Dairy Science**. 90 (2): 630-636 feb. 2007

MCCARNEY, T.; MULLAN, W.M.A.; ROWE, M.T.. Effect of carbonation of milk on Cheddar cheese yield and quality. **Milchwissenschaft-Milk Science International**. N 50 (12): 670-674 1995

MCMAHON, D.J.; PAULSON, B.; OBERG, C.J.. Influence of Calcium, pH, and Moisture on Protein Matrix Structure and Functionality in Direct-Acidified Nonfat Mozzarella Cheese. **Journal of Dairy Science**. 88: 3754-3763 – 2005.

McSWEENEY, P.L.H.. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**. Vol 57, No 2/3 May/August 2004

METZGER, L.E.; BARBANO, D.M.; RUDAN, M.A.; KINDSTEDT, P.S.. Effect of Milk Preacidification on Low Mozzarella Cheese: I. Composition and Yield. **Journal of Dairy Science**. Vol 83 n 4: 648-658. 2001a

METZGER, L.E.; BARBANO, D.M.; KINDSTEDT, P.S.; and GUO, M.R.. Effect of Milk Preacidification on Low Mozzarella Cheese: II. Chemical and Functional Properties During Storage. **Journal of Dairy Science**. 84: 1348-1356. 2001b

MONTILLA, A.; CALVO, M.M.; OLANO, A.. Manufacture Of Cheese Made From CO₂-Treated Milk. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung** n 200 (4): 289-292, 1995.

NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J.R.F.; SPADOTI, L.M.; PIZAIA, P.D.; ROIG, S.M.. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. vol.23 suppl. Dec. 2003

NELSON, B. K.; LYNCH, J. M.; BARBANO, D. M.. Impact of milk preacidification with CO₂ on cheddar cheese composition and yield. **Journal of dairy science**. 87: 3581 – 3589, 2004a

NELSON, B. K.; LYNCH, J. M.; BARBANO, D. M.. Impact of milk preacidification with CO₂ on the aging and proteolysis of cheddar cheese. **Journal of dairy science**. 87: 3590 – 3600, 2004b

NEVES-SOUZA, R. D.; SILVA, R.S. S. F.. Estudo de custo-rendimento do processamento de queijos tipo minas frescal com derivado de soja e diferentes agentes coagulantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, Mar. 2005 .

NONOGAKI, C.O.; MONTEIRO, V.C.; GIGANTE, M. L.. Metodologia para Avaliar a Capacidade de Derretimento de Queijo Prato. **Brazilian Journal of food Technology**. v. 10, n. 1, p. 71-77, jan-mar 2007

OLIVEIRA, J.S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Ícone, 1986. 146 p.

PLANZER JR., S.B.; DA CRUZ, A.G.; SANT´ANA, A.S.; SILVA, R.; MOURA, M.R.L.; e DE CARVALHO, L.M.J.. Food Safety Knowledge of Cheese Consumers. **Journal Of Food Science** - Vol. 74, n.1, p.: M28-M30 - 2009

RICHARDSON, G.H.. **Standard methods for examination of dairy products**.. American Public Health Association, Washington (1985).

ROSSI, D.A.; ABREU, L.R.; FURTADO, M.M.; MOURA, J.C.. Utilização do coalho bovino e coagulantes microbiano e genético na composição e rendimento do Queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 53, n. 305, p. 85-92. 1998.

RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J.C.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; DE LLANO, D.G.; DE LOS REYES-GAVILAN, C.G.. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: A pilot-scale study. **Journal of Food Protection**. V 59 p 502–508, 1996.

RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J.C.; ALONSO, L.; DE LOS REYES-GAVILAN, C.G.. Afuega'l Pitu cheese quality: Carbon dioxide addition to refrigerated

milk in acid-coagulated cheesemaking. **International Dairy Journal**. 8 (12): 951-958, 1998

SHERBON, J.W.. Physical properties of milk. In **Fundamentals of Dairy Chemistry** (3^o ed). WONG, N.P.. Editora Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, p 419-423, 1999.

SILVA, A.; VAN DENDER. A.G.F.; BALDINI, V.L.S.. Perfil eletroforético do queijo tipo Prato obtido com incorporação de enzimas proteolíticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. n 309 vol 54, agosto de 1999.

SOUSA, M.J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P.L.H.. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**. Vol. 11, P 327–345, 2001.

SPADOTI, L. M. ; DORNELLAS, J.R.F. ; PETENATE, J. A. ; ROIG, S.M. . Evaluation of the melting capacity of Prato cheese obtained by modification of the traditional manufacturing process. **Le Lait**, INRA, v. 83, p. 397-408, 2003a.

SPADOTI, L.M.; DORNELLAS, J.R.; PETENATE, A.J.;ROIG, S.M.. Avaliação do rendimento do queijo tipo prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. vol. 23, no.3, p.492-499. Dez 2003b.

SPADOTI, L.M.; DORNELLAS, J.R.F.; ROIG, S.M.. Proteolysis of Prato type cheese produced using ultrafiltration. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 3, p. 235-239, 2005.

ST-GELAIS, D.; CHAMPAGNE, C.P.; BELANGER, G.. Production of cheddar cheese using milk acidified with carbon dioxide. **Milchwissenschaft-Milk - Science International**. 52 (11): 614-618 1997

SZCZESNIAK, A.S.. Texture is a sensory proper. **Food Quality and Preference** vol. 13 p 215–225, 2002.

VIANNA, P.C.B; MAZAL, G.; SANTOS, M.V.; BOLINI, H.M.A.; GIGANTE, M.L.. Microbial and sensory changes throughout the ripening of Prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. **Journal of Dairy Science**. 91:5 p.1743-1750 - 2008

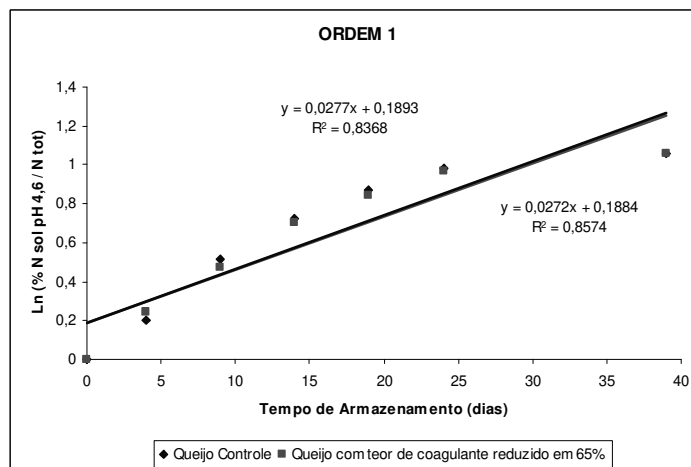
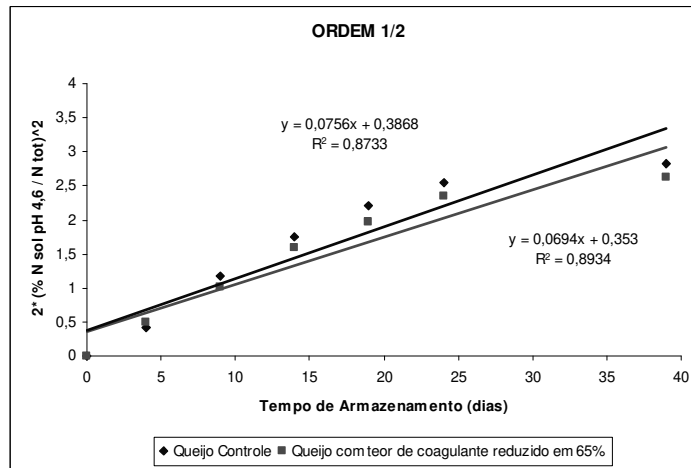
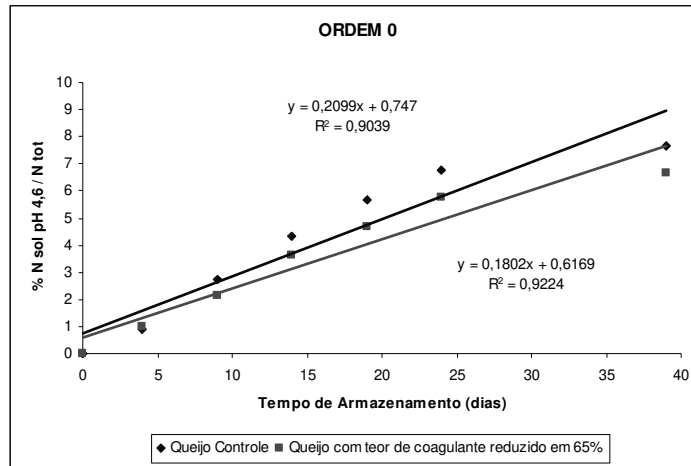
VIOTTO, W. H. ; OLIVEIRA, A. N.. Produção de mussarela por acidificação direta usando pequena quantidade de coagulante.. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 304, n. 53, p. 44-52, 1998.

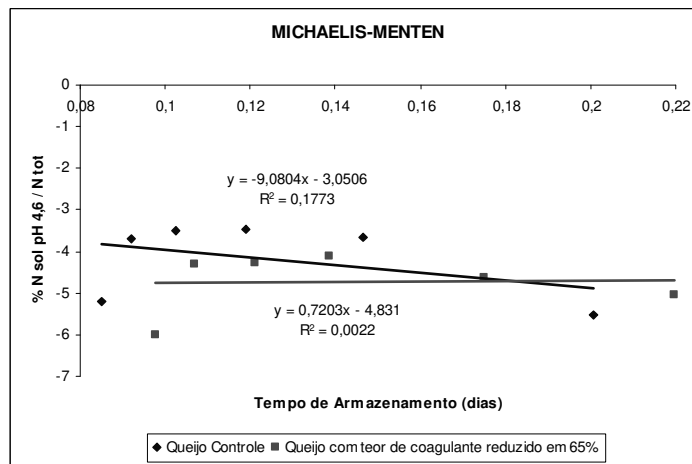
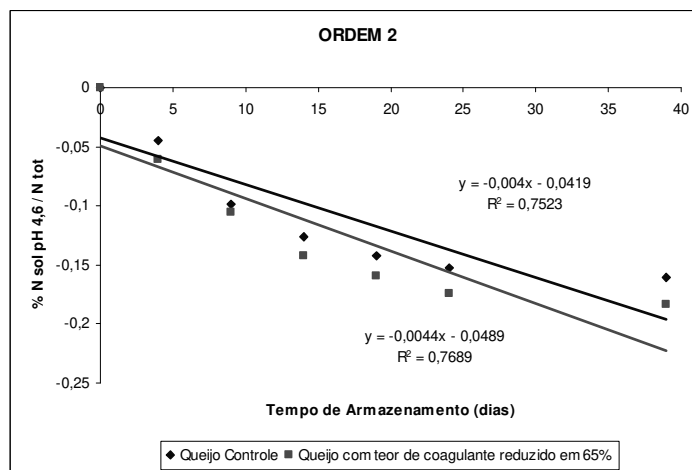
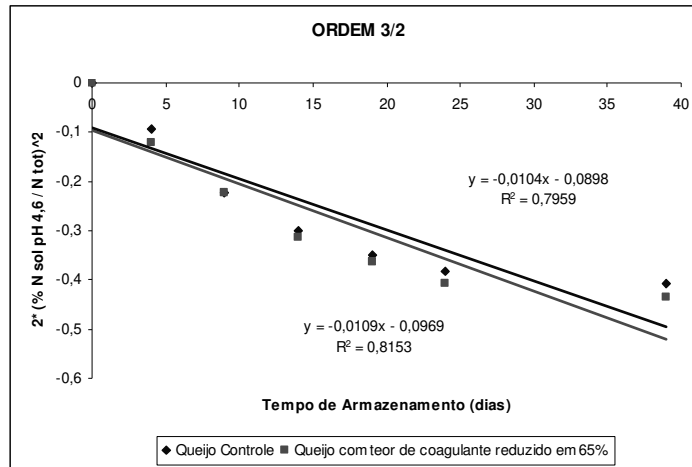
WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A. ; VAN BOEKEL, M. A.J. S. **Dairy Technology**: principles of milk properties and processes. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999, 726 p.

WASEN, I.. Soro Lácteo: Lucro para a indústria e proteção ao meio ambiente. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.53, n.304, p.283-293, 1998.

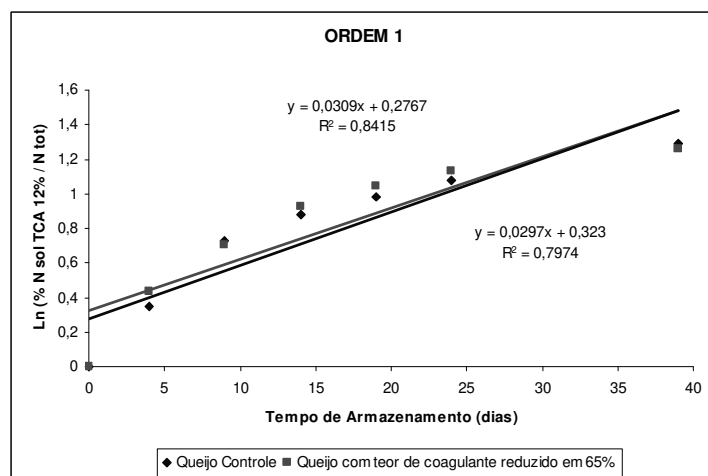
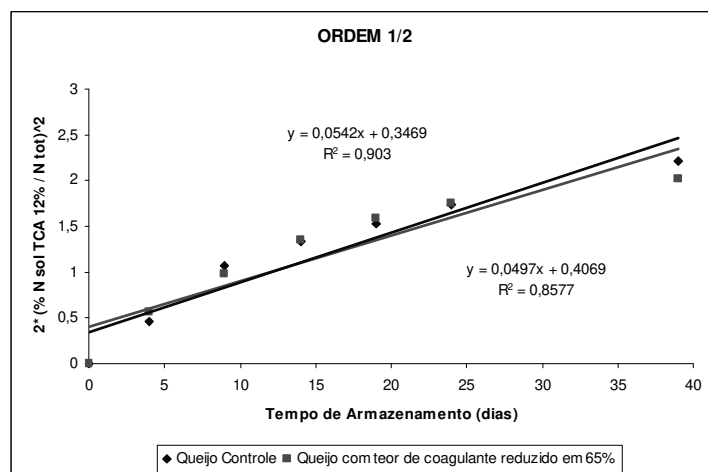
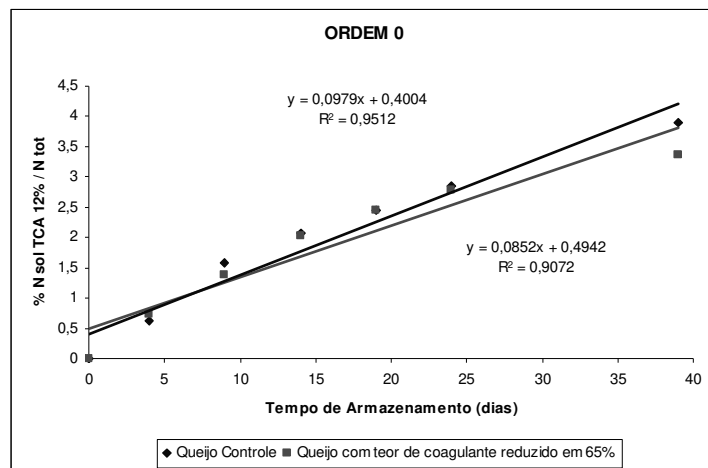
APÊNDICE A

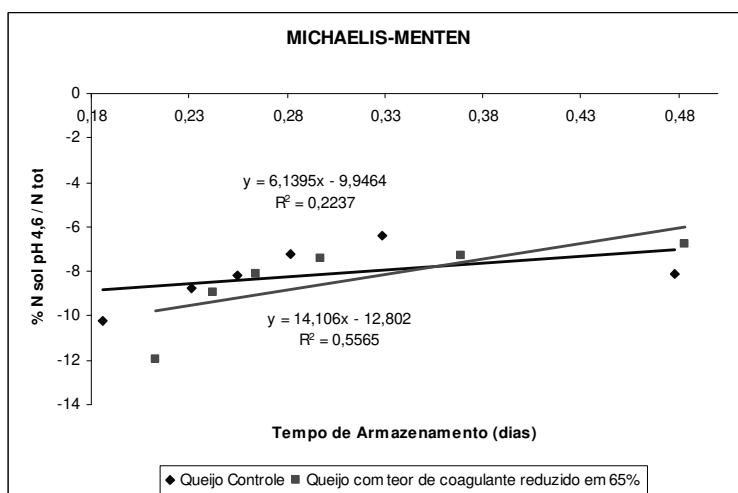
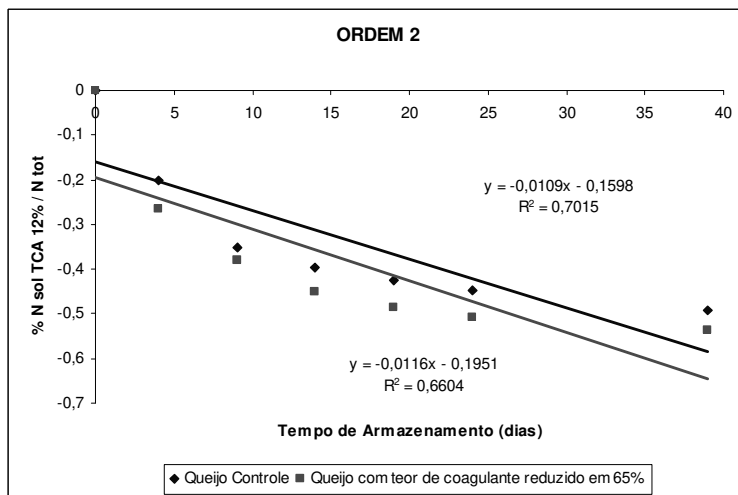
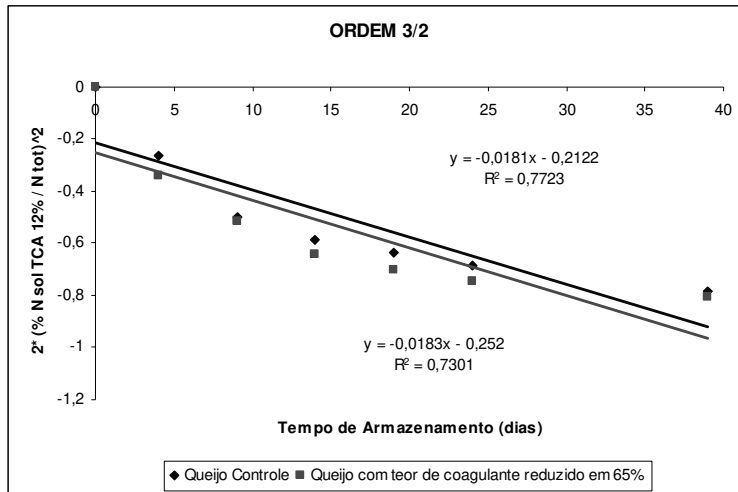
1) Verificação de Ordem de Reação para os valores de NS-pH 4,6 (%NT).





2) Verificação de Ordem de Reação para os valores de NS-TCA 12% (%NT).





APÊNDICE B

1) Resultados completos da avaliação da regressão linear para a velocidade de formação de NS-pH 4,6 (%NT).

RESUMO DOS RESULTADOS

QUEIJO CONTROLE

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,936214
R-Quadrado	0,876497
R-quadrado ajustado	0,875826
Erro padrão	0,971501
Observações	186

ANOVA

	Gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1232,471	1232,471	1305,84	1,7E-85
Resíduo	184	173,6618	0,943814		
Total	185	1406,132			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	4,622922	0,120525	38,35655	1,05E-89	4,385133	4,860711
Variável X 1	0,209644	0,005801	36,13641	1,7E-85	0,198198	0,22109

QUEIJO OBTIDO A PARTIR DE LEITE PRÉ-ACIDIFICADO (CO₂) E COM REDUÇÃO DE 65% DE COAGULANTE.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,928683
R-Quadrado	0,862453
R-quadrado ajustado	0,861705
Erro padrão	0,886103
Observações	186

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	905,8756	905,8756	1153,72	3,45E-81
Resíduo	184	144,4728	0,785178		
Total	185	1050,348			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	4,010646	0,10993	36,4835	3,64E-86	3,79376	4,227532
Variável X 1	0,179733	0,005291	33,96645	3,45E-81	0,169294	0,190173

2) Resultados completos da avaliação da regressão linear para a velocidade de formação de NS-TCA 12% (%NT).

RESUMO DOS RESULTADOS

QUEIJO CONTROLE

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,939735
R-Quadrado	0,883101
R-quadrado ajustado	0,882455
Erro padrão	0,44376
Observações	183

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	269,2623	269,2623	1367,347	2,73E-86
Resíduo	181	35,64308	0,196923		
Total	182	304,9053			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	1,76743	0,055118	32,0665	1,44E-76	1,658674	1,876186
Variável X 1	0,098046	0,002651	36,97766	2,73E-86	0,092814	0,103278

QUEIJO OBTIDO A PARTIR DE LEITE PRÉ-ACIDIFICADO (CO₂) E COM REDUÇÃO DE 65% DE COAGULANTE.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,906752
R-Quadrado	0,822199
R-quadrado ajustado	0,821216
Erro padrão	0,493039
Observações	183

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	203,4623	203,4623	836,9908	8,58E-70
Resíduo	181	43,9989	0,243088		
Total	182	247,4612			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	1,751638	0,061238	28,60356	4,66E-69	1,630805	1,872471
Variável X 1	0,085229	0,002946	28,93079	8,58E-70	0,079416	0,091041

APÊNDICE C

1) Resultados completos da avaliação da regressão linear para a variação da firmeza em relação ao tempo.

RESUMO DOS RESULTADOS

QUEIJO CONTROLE

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,635107337
R-Quadrado	0,403361329
R-quadrado ajust	0,399129849
Erro padrão	484,5486953
Observações	143

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de signif</i>
Regressão	1	22380863,08	22380863	95,323937	1,61059E-17
Resíduo	141	33105028,78	234787,4		
Total	142	55485891,86			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interseção	4610,000675	68,83804153	66,96879	9,06E-109	4473,91253	4746,08882
Variável X 1	-31,9207755	3,269433038	-9,7634	1,611E-17	-38,38422311	-25,45732786

QUEIJO OBTIDO A PARTIR DE LEITE PRÉ-ACIDIFICADO (CO₂) E COM REDUÇÃO DE 65% DE COAGULANTE.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,268346473
R-Quadrado	0,072009829
R-quadrado ajust	0,064465194
Erro padrão	504,520159
Observações	125

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de signif</i>
Regressão	1	2429464,546	2429465	9,5445074	0,002480067
Resíduo	123	31308492,67	254540,6		
Total	124	33737957,22			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interseção	4729,114204	77,85469926	60,74282	1,401E-93	4575,00566	4883,222747
Variável X 1	-11,2180835	3,63113095	-3,08942	0,0024801	-18,40568181	-4,030485284