



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



Influência da adição de CO₂ ao leite sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal

Bárbara Mesquita Dias

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante

Orientadora

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

Campinas/SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

D543i Dias, Bárbara Mesquita
Influência da adição de CO₂ ao leite sobre as
características físico-químicas e microbiológicas do queijo
Minas Frescal / Bárbara Mesquita Dias. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2009.

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

1. Queijo Minas Frescal. 2. Dióxido de carbono. 3.
Conservação. 4. Proteólise. I. Gigante, Mirna Lúcia.
II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Influence of CO₂ addition to milk on the physico-chemical and
microbiological characteristics of Minas frescal cheese

Palavras-chave em inglês (Keywords): Minas Frescal Cheese, Carbon dioxide,
Conservation, Proteolysis

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Mirna Lúcia Gigante

Salvador Massaguer Roig

Cynthia Jurkiewicz Kunigk

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante
(Orientadora)

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(Membro)

Prof. Dra. Cynthia Jurkiewicz Kunigk
(Membro)

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Suplente)

Prof. Dra. Lina Casale Aragon Alegro
(Suplente)

*“O triste da vida não é ter problemas ou derrotas.
O triste da vida é ser medíocre. É não errar pelo
simples fato de nunca ter tentado.”*

(Roberto Shinyashiki)

***Aos meus pais,
Paula e Carlos Renato,
por acreditarem em mim e
me apoiarem.***

***Aos meus amigos de república,
que marcaram a minha vida, pela
amizade sincera e fiel.***

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter guiado meu caminho, me dando forças e sabedoria para realizar este sonho;

À Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante pela oportunidade, orientação, apoio, críticas construtivas, amizade e ensinamentos dados durante a realização deste trabalho;

À minha família por todo apoio, incentivo e forças que me deram durante esta caminhada;

Aos colegas do laboratório de leite, Atílio, Priscila Vianna, Camila, Priscila Mamede, Milena e Renata pela amizade, respeito e pelos bons momentos passados no laboratório;

Aos funcionários Bete, Ana Lourdes, Diana, Adaulto, Bernadete, Ana Maria, Alice, por toda ajuda, paciência e apoio técnico dados durante a realização dos meus experimentos;

À Dirce e a todos os alunos e funcionários do Laboratório de Higiene, pela disponibilidade, amizade e ensinamentos dados;

Ao pesquisador Homero, pelo auxílio e orientação na elaboração da parte estatística deste trabalho;

Às estagiárias Kizzy, Mariana, Florência e à aluna de iniciação científica Lívia, pela grande contribuição na execução deste trabalho, pela ajuda e amizade;

Aos colegas do mestrado, Juliana, Daniela, Bruno, Thiago, Luis Henrique, Carlos, Wilon por toda amizade e companheirismo durante o meu mestrado;

Aos meus amigos de república, Bebel, Rogério, Paulo, Roberto, Cris e Lucie, que estiveram sempre presentes, me ajudando e apoiando;

Aos meus amigos de Belo Horizonte, que mesmo longe, me apoiaram e me deram forças nos momentos difíceis;

Ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida;

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta dissertação.

ÍNDICE

ÍNDICE	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Fabricação e características do queijo Minas Frescal	7
3.2. Efeito do pH na fabricação de queijos.....	12
3.3. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal.....	14
3.4. Adição de CO ₂ ao leite e ao queijo.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Leite	25
4.2. Fabricação do queijo Minas Frescal	25
4.3. Amostragem e análises realizadas.....	28
4.4. Determinações analíticas.....	33
4.4.1. Análises físico-químicas.....	33
4.4.2. Avaliação de CO ₂ no leite e nos queijos	35
4.4.3. Análises microbiológicas	38
4.5. Planejamento estatístico	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. Leite cru e pasteurizado	41

5.2. Efeito dos tratamentos sobre o processamento dos queijos.....	43
5.3. Efeito dos tratamentos sobre a composição dos queijos e soros.....	47
5.4. Efeito dos tratamentos sobre a recuperação dos constituintes do leite e o rendimento dos queijos.....	52
5.5. Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre as características físico-químicas do queijo Minas Frescal.....	56
5.6. Efeito dos tratamentos sobre as características microbiológicas do queijo Minas Frescal.....	68
5.7. Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre as características microbiológicas do queijo Minas Frescal.....	70
6. CONCLUSÕES	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1. Fluxograma geral do trabalho.....	26
Figura 4.2. Curva padrão de CO ₂ em leite ($y = 0,01x + 0,0643$).....	36
Figura 4.3. Curva padrão de CO ₂ em queijo ($y = 0,0022x + 0,1011$).....	38
Figura 5.1. pH dos leites e comportamento do pH dos queijos Minas Frescal durante a fabricação (n=3).....	44
Figura 5.2. Valores de pH durante o processo de fabricação dos queijos Minas Frescal (n=3).....	45
Figura 5.3. Recuperação de proteína para o queijo e o soro para cada tratamento (n=3).....	52
Figura 5.4. Recuperação de gordura para o queijo e o soro para cada tratamento (n=3).....	53
Figura 5.5. Efeito dos tratamentos sobre o pH dos queijos Minas Frescal	58
Figura 5.6. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre o pH dos queijos Minas Frescal (n=3).....	60
Figura 5.7. Efeito dos tratamentos sobre o índice de extensão de proteólise dos queijos Minas Frescal.....	61
Figura 5.8. Efeito dos tratamentos sobre o índice de profundidade de proteólise dos queijos Minas Frescal	62
Figura 5.9. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre o índice de extensão de proteólise dos queijos Minas Frescal (n=3).....	63
Figura 5.10. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre o índice de profundidade de proteólise dos queijos Minas Frescal (n=3).....	64
Figura 5.11. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a quantidade de CO ₂ dos queijos Minas Frescal (n=3).....	67
Figura 5.12. Efeito dos tratamentos sobre a contagem total dos queijos Minas Frescal	73
Figura 5.13. Efeito do tempo de armazenamento sobre a contagem total dos queijos Minas Frescal (n=3).....	74
Figura 5.14. Efeito dos tratamentos sobre a contagem de bactérias lácticas dos queijos Minas Frescal.....	75
Figura 5.15. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem de	

bactérias lácticas dos queijos Minas Frescal (n=3).....	76
Figura 5.16. Efeito dos tratamentos sobre a contagem de bolores e leveduras dos queijos Minas Frescal.....	78
Figura 5.17. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem de bolores e leveduras dos queijos Minas Frescal (n=3).....	79
Figura 5.18. Efeito dos tratamentos sobre a contagem de psicotróficos dos queijos Minas Frescal.....	80
Figura 5.19. Efeito dos tratamentos sobre a contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. dos queijos Minas Frescal.....	81
Figura 5.20. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem de psicotróficos dos queijos Minas Frescal (n=3).....	83
Figura 5.21. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. dos queijos Minas Frescal (n=3).....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Análises realizadas no leite cru, leite pasteurizado, soros e queijos.....	31
Tabela 4.2. Quantidade de solução padrão de bicarbonato de sódio e água ultra-pura degaseificada para a construção da curva padrão de CO ₂ em leite.....	36
Tabela 4.3. Quantidade de solução padrão de bicarbonato de sódio e água ultra-pura degaseificada para a construção da curva padrão de CO ₂ em queijo.....	37
Tabela 5.1. Composição físico-química média, característica microbiológica e desvio padrão (n=3) do leite cru e pasteurizado.....	42
Tabela 5.2. Efeito dos tratamentos sobre o tempo de coagulação dos leites.....	46
Tabela 5.3. Composição físico-química, desvio padrão e valor de <i>p</i> dos queijos (n=3).....	47
Tabela 5.4. Composição físico-química, desvio padrão e valor de <i>p</i> dos soros dos queijos controle, com adição de ácido láctico e com adição de CO ₂ (n=3).....	48
Tabela 5.5. Rendimento queijeiro e desvio padrão dos processos (n=3).....	55
Tabela 5.6. Valores de <i>p</i> -valor demonstrando o efeito dos tratamentos, do tempo e da interação tratamento X tempo sobre pH, % CO ₂ , índices de extensão e profundidade de proteólise dos queijos (n=3).....	57
Tabela 5.7. Características microbiológicas dos queijos.....	68
Tabela 5.8. Valores de <i>p</i> -valor demonstrando o efeito dos tratamentos, do tempo e da interação tratamento X tempo sobre a contagem de microrganismos dos queijos (n=3).....	71
Tabela 5.9. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem de coliformes a 30-35°C e coliformes a 45°C dos queijos Minas Frescal (n=3).....	87

RESUMO

O queijo Minas Frescal é o quarto queijo mais consumido no Brasil, porém este produto possui vida de prateleira pequena, devido às suas características intrínsecas e à sua tecnologia de fabricação. Assim, algumas modificações têm sido feitas no processo de fabricação deste queijo com o intuito de aumentar sua vida de prateleira e rendimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de CO₂ ao leite pasteurizado sobre o rendimento, a composição e a vida de prateleira do queijo Minas Frescal. Utilizou-se leite pasteurizado (72-75°C/15-20 seg) que foi dividido em três porções submetidas aos seguintes tratamentos: queijo adicionado de cultura láctica, queijo obtido a partir de leite acidificado com ácido láctico e queijo obtido a partir de leite acidificado com CO₂. Avaliaram-se a composição dos leites, dos soros e queijos e calculou-se o rendimento dos queijos. Os queijos foram avaliados após 1, 7, 13, 19 e 25 dias de tempo de armazenamento refrigerado quanto ao pH, frações protéicas e porcentagem de CO₂. Calcularam-se os índices de extensão e de profundidade de proteólise dos queijos, para avaliação da intensidade da proteólise. Em relação à qualidade microbiológica, foram realizadas análises de contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios, bactérias lácticas, bolores e leveduras, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., e coliformes a 30-35°C e a 45°C, em 1, 7, 13, 19 e 25 dias de armazenamento refrigerado. O experimento completo foi repetido três vezes e o delineamento experimental utilizado foi o Split-plot, em um planejamento do tipo fatorial 3 x 5 em blocos completamente aleatorizados. O efeito do tratamento (3 níveis de variação) e do tempo de armazenamento (5 níveis de variação) sobre as variáveis estudadas foi avaliado por ANOVA aplicando-se o teste de Tukey para comparação entre as médias, ao nível de 5% de significância. Os queijos fabricados com adição de ácido láctico ou CO₂ ao leite apresentaram menores valores de pH durante o processo de fabricação e maiores valores durante a vida de prateleira em relação ao queijo adicionado de cultura láctica. O queijo adicionado de cultura láctica apresentou maior umidade, cinzas e menor porcentagem de gordura do que os outros queijos. O tempo de coagulação dos queijos obtidos a partir de leite acidificado com ácido láctico ou CO₂ foram menores do que do queijo adicionado de cultura láctica. Não se observou diferença significativa no rendimento de fabricação para as

diferentes tecnologias de fabricação. Entretanto, os tratamentos e o tempo de armazenamento afetaram o pH, a porcentagem de CO₂ e os índices de extensão e profundidade de proteólise dos queijos. O queijo fabricado com adição CO₂ ao leite apresentou menores contagens de *Pseudomonas* spp. e bolores e leveduras, e o queijo com cultura láctica menores contagens de coliformes. As contagens de mesófilos aeróbios e bactérias lácticas apresentaram comportamentos semelhantes durante a vida de prateleira de cada queijo, diminuindo no queijo com cultura láctica e aumentando nos queijos obtidos a partir de leite acidificado com ácido láctico ou CO₂.

Palavras-chave: Queijo Minas Frescal; dióxido de carbono; conservação; proteólise

ABSTRACT

Minas Frescal cheese is the fourth cheese most consumed in Brazil, but this product has smaller shelf life, due to its intrinsic characteristics and its technology for manufacturing. So some changes have been made in the process of making this cheese in order to increase its shelf life and yield. The purpose of this study was to evaluate the effect of adding CO₂ to the pasteurized milk on yield, composition and shelf life of Minas Frescal cheese. It was used pasteurized milk (72-75°C/15-20 seg) that has been divided into three portions subjected to the following treatments: cheese added of lactic culture, cheese made from milk acidified with lactic acid and cheese made from milk acidified with CO₂. It was evaluated milk, whey and cheese composition and it was estimated the cheese yield. The cheeses were evaluated after 1, 7, 13, 19 and 25 days of storage time for pH, protein fractions and percentages of CO₂. Proteolysis was evaluated by determining the amount of total nitrogen soluble at pH 4.6 and in 12% trichloroacetic acid. Regarding microbiological quality, tests were carried out on the total count of mesophiles aerobic microorganisms, acid lactic bacteria, yeasts and molds, psychrotrophics, *Pseudomonas* spp., and coliforms at 30-35°C and 45°C, on 1, 7, 13, 19 and 25 days of refrigerated storage. The complete experiment was repeated three times and the experimental design was a Split-Plot in a factorial design of the type 3 x 5, in blocks completely randomized. The effect of treatment (3 levels of variation) and storage time (5 levels of variation) on the variables studied were evaluated by ANOVA according to the Tukey test for comparison between the averages, in 5% of significance level. The cheeses made with addition of lactic acid or CO₂ to milk showed lower values of pH during the manufacturing process and higher values during the shelf life with respect to the lactic culture cheese. The cheese added with lactic culture had higher moisture, ash and lower percentage of fat than other cheeses. The coagulation times of cheeses made from milk acidified with lactic acid or with CO₂ were smaller than the cheese added lactic culture. There was no significant difference in yields for different manufacturing technologies. However, the treatments and storage time affected the pH, percentage of CO₂ and the levels of proteolysis of the cheeses. The cheese with addition of CO₂ to milk had lower counts of *Pseudomonas* spp. and yeasts and molds, and the lactic culture cheese minor counts of coliforms. The total count of mesophiles aerobics and lactic acid bacterias

showed similar behaviors during the shelf life of each cheese, reducing in lactic culture cheese and increasing in the cheeses made with addition of lactic acid or CO₂ to milk.

Keywords: Minas Frescal cheese; carbon dioxide; conservation; proteolysis

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas Frescal é um dos produtos lácteos mais difundidos no Brasil e ocupa o quarto lugar na produção nacional de queijos (ABIQ, 2005). A produção de queijo Minas Frescal, industrial e artesanal, se difundiu principalmente devido à simplicidade da tecnologia empregada na fabricação, e à ausência de maturação. Estas características possibilitaram um retorno rápido do investimento aos produtores e, conseqüentemente, custos menores para os consumidores (OLIVEIRA et al., 1998). Entretanto, o produto apresenta vida de prateleira reduzida, normalmente de duas semanas, mesmo em temperaturas adequadas de refrigeração (ISEPON, SANTOS e SILVA, 2003).

A reduzida vida de prateleira deste queijo deve-se ao seu alto teor de umidade, aproximadamente 60%, e está possivelmente relacionada à qualidade da matéria-prima e às características do processo de fabricação. As práticas de fabricação industrial e artesanal deste queijo são basicamente de três tipos: o processo tradicional, com adição de cultura láctica ao leite; o queijo fabricado sem a adição de cultura láctica e, o processo alternativo, onde se faz a acidificação direta do leite antes da fabricação do queijo. Estes diferentes processos afetam o rendimento industrial, a composição e as características de segurança e qualidade do produto.

Quando o produto é fabricado com a adição de cultura láctica, utilizam-se culturas tipo O, constituídas normalmente de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Estes microrganismos fermentam a lactose, produzindo ácido láctico, o que favorece a redução do pH durante o processamento do queijo e afeta positivamente a coagulação do leite, a sinérese do coágulo e a segurança do produto, pois o queijo final apresenta pH na faixa de 5,1-5,2 (FURTADO, 2005). No entanto, a ação continuada da cultura durante o armazenamento refrigerado do produto favorece sua proteólise, o que altera rapidamente a característica típica da textura do queijo, provocando sua rejeição pelo consumidor.

1. INTRODUÇÃO

Por outro lado, quando a cultura não é adicionada, não se observa a redução do pH durante o processamento, o que resulta na obtenção de produtos de mais alto pH (~6,7) e, portanto, menos seguros. Além de evitar alterações de textura, esta prática favorece a menor sinérese da massa durante o processamento e, possivelmente, maior rendimento industrial. A forma alternativa de processamento é a acidificação direta do leite, antes da fabricação do queijo. Neste processo, o queijo não apresenta a ação da cultura láctica durante a sua vida de prateleira, e a redução do pH, no tanque de fabricação, favorece a segurança do produto. Esta é uma prática bastante utilizada pela indústria, especialmente associada ao aumento de temperatura de coagulação e tratamento da massa, para contribuir para a sinérese. Este aumento da temperatura, quando não devidamente controlado, pode levar a uma descaracterização do queijo Minas Frescal.

Uma forma alternativa para a redução do pH do leite antes da fabricação do queijo é a adição de dióxido de carbono (CO_2). O CO_2 , ao se dissolver no leite, forma ácido carbônico, o qual se dissocia para formar o ânion bicarbonato e H^+ . É atualmente bem estabelecido na literatura (LOSS e HOTCHKISS, 2000; HOTCHKISS, WERNER e LEE; 2006) que o CO_2 afeta a multiplicação e o metabolismo de uma ampla variedade de bactérias, particularmente as encontradas no meio ambiente de processamento de produtos lácteos, e tem sido utilizado para aumentar a vida de prateleira de produtos lácteos. A ação antimicrobiana do CO_2 é proporcional à sua concentração, e seu efeito inibitório sobre os microrganismos depende da temperatura, acidez, atividade de água, tipo e fase de desenvolvimento do microrganismo (SARANTÓPOULOS et al., 1998). Existem pelo menos três mecanismos gerais pelo qual o CO_2 inibe o desenvolvimento microbiano. O primeiro, e mais simples, é a substituição do O_2 . O segundo é a redução do pH devido à dissolução de CO_2 e a formação de ácido carbônico na fase aquosa do alimento, e, o terceiro, é o efeito direto sobre o metabolismo dos microrganismos (BUTLER, 1982; DANIELS, KRISHNAMURTHI e RIZVI, 1985).

O poder acidificante do dióxido de carbono, associado à sua capacidade de afetar o metabolismo dos microrganismos, particularmente os encontrados no meio ambiente de processamento de produtos lácteos, sugerem que ele pode ser utilizado

1. INTRODUÇÃO

como um recurso tecnológico na fabricação de queijo Minas Frescal. Sua utilização pode favorecer simultaneamente a redução do pH durante a produção e a inibição de bactérias presentes no ambiente do processamento, aumentando, possivelmente, a qualidade e a vida de prateleira do produto.

Com base nessa hipótese, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência da adição de CO₂ ao leite pasteurizado sobre o rendimento, a composição e as características microbiológicas do queijo Minas Frescal.

2. OBJETIVOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Comparar o processamento, as características físico-químicas e microbiológicas e o rendimento do queijo Minas Frescal fabricado a partir de leite adicionado de cultura láctica (queijo controle) e de leite acidificado pela adição de ácido láctico ou dióxido de carbono.
- Comparar o desenvolvimento da proteólise e as características microbiológicas do queijo Minas Frescal fabricado a partir de leite adicionado de cultura láctica e leite acidificado pela adição de ácido láctico ou dióxido de carbono, durante o período de armazenamento refrigerado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fabricação e características do queijo Minas Frescal

O queijo Minas Frescal é um dos produtos de laticínios mais difundidos no Brasil, e ocupa o quarto lugar na produção nacional de queijos. O produto possui ampla aceitação no mercado e pode ser encontrado em todo o país, notadamente no estado de Minas Gerais (ABIQ, 2005; ALMEIDA FILHO e NADER FILHO, 2002).

De acordo com Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, a produção de queijos no Brasil cresceu de aproximadamente 190 mil toneladas em 1991 para 554 mil em 2005 (ABIQ, 2005). A maior parte desta produção (95%) é considerada de consumo popular, destacando-se os queijos Prato, Mussarela, Parmesão, Minas Frescal e Minas Padrão (FURTADO et al., 2003).

O queijo Minas Frescal é obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco. Quando é fabricado com cultura láctica, utiliza-se cultura mesofílica tipo O, que consiste de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (BRASIL, 2004).

Quando comercializado em embalagens plásticas convencionais, o queijo Minas Frescal apresenta vida de prateleira pequena, normalmente duas semanas, mesmo em temperaturas adequadas de refrigeração. Um dos grandes problemas na sua comercialização é a liberação do soro, que afeta não só a aparência, como também a qualidade do produto. O produto apresenta grande susceptibilidade às contaminações microbianas, que podem ocorrer a partir do leite utilizado como matéria-prima, ou por recontaminações durante ou após o processamento. As contaminações, aliadas às alterações químicas e sensoriais decorrentes da atividade enzimática de origem microbiana, podem, em poucos dias, tornar o queijo inaceitável ou até mesmo impróprio para o consumo (ISEPON, SANTOS e SILVA, 2003).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo Oliveira (1986), o queijo Minas Frescal é fabricado com leite de vaca, padronizado para 3,0-3,2% de matéria gorda e acidez entre 15 e 18ºD. O leite deve ser pasteurizado (72°C/15 segundos ou 65°C/30 minutos), adicionado de CaCl₂ (20 g/100 L de leite), cultura láctica (1,0-1,5%) e coalho de renina para se obter a coagulação em cerca de 30-40 min., a 32°C. Ele apresenta coloração interna esbranquiçada, consistência mole, textura fechada, com algumas olhaduras irregulares e sabor variando de levemente ácido a suave. A composição média esperada do queijo Minas Frescal é de 55-58% de umidade, 17-19% de gordura, 1,4-1,6% de sal e pH de 5,0-5,3. No caso de queijos fabricados com ácido láctico em substituição ao fermento, o pH se situa na faixa de 6,1-6,3 (FURTADO e LOURENÇO NETO, 1994).

A fabricação tradicional do queijo Minas Frescal sofreu modificações ao longo do tempo, visando melhorias na qualidade do produto final, aumento de rendimento de fabricação, maior vida útil, padronização e segurança de consumo. Por ser um queijo de tecnologia simples, facilmente elaborado e de fabricação artesanal, diferentes procedimentos de produção são adotados pelos fabricantes. Assim, há queijos feitos por adição somente de coalho, outros feitos pelo método tradicional, com adição de cultura láctica, queijos fabricados com adição de ácido láctico em substituição à cultura e, ainda, queijos obtidos pelo processo de ultrafiltração.

A coagulação do leite é dividida em duas fases, sendo a primeira enzimática e a segunda não enzimática. A primeira fase consiste na ação específica da renina ao clivar a ligação peptídica Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da fração κ-caseína. Esta fica fragmentada em duas cadeias polipeptídicas: o segmento 1-105, denominado para-κ-caseína e o 106-169, que corresponde ao chamado glicomacropéptido. A para-κ-caseína integra-se com as demais caseínas e o glicomacropéptido, muito solúvel, separa-se da estrutura micelar e passa para soro. A segunda fase de coagulação se inicia quando 85 a 90% da κ-caseína foi hidrolisada e resulta na agregação das micelas de caseína. A precipitação requer disponibilidade de cálcio iônico no leite, que se liga por ligações hidrofóbicas com as proteínas. A ligação da para-κ-caseína ao cálcio resultará na formação de um coágulo firme, o paracaseinato de cálcio (FOX et al., 2000).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para a fabricação do queijo Minas, após a coagulação, a massa é cortada em cubos de 1,5-2,0 cm utilizando-se liras verticais e horizontais, o que favorece a sinérese do coágulo. Inicia-se, então, a agitação da massa com movimentos lentos devido à fragilidade dos grãos. Neste queijo, a agitação e o repouso se alternam até que se atinja o ponto da massa. Em seguida, a massa é separada do soro e enformada. O queijo é autoprensado através de viragens sucessivas a cada 20-30 min., o que favorece melhor acabamento ao produto, e conduzido à câmara fria (5°C) para completar a dessoragem, onde permanece até o dia seguinte, quando pode ser embalado e comercializado (OLIVEIRA, 1986).

O processo de salga deste queijo pode ocorrer de várias maneiras. Uma delas é a salga a seco, que é realizada na proporção de 0,7% do peso do queijo, em cada face do produto. É feita durante as viragens sucessivas dos queijos. A outra maneira é a salga em salmoura (20% de sal) a 10-12°C, por períodos proporcionais ao peso e formato do queijo. A salga na massa também é possível, entretanto menos comum, pois ocorre a perda de sal para o soro, dificultando sua utilização posterior (FOX et al., 2000).

A coagulação do leite é a etapa fundamental para a elaboração de queijos. O agente coagulante tradicional utilizado é o coalho de bezerro, que é extraído do quarto estômago de bezerros em lactação. Este coalho é composto pelas enzimas quimosina e pepsina, em proporção de cerca de 85-95% de quimosina e 5-15% de pepsina (YOUSIF, McMAHON e SHAMMET, 1996). Um importante fator a ser considerado com relação ao coagulante utilizado diz respeito ao seu efeito sobre o rendimento e sobre as características sensoriais do queijo, como sabor e textura, sendo a atividade proteolítica das enzimas quem exerce grande influência nesses fatores. Além da ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -caseína, cuja hidrólise determina a coagulação enzimática do leite, outras ligações peptídicas são hidrolisadas a taxas que variam de acordo com a enzima utilizada (atividade proteolítica não específica). Em decorrência desta proteólise em níveis elevados, pode ocorrer diminuição do rendimento do queijo, bem como alteração em suas propriedades reológicas e sensoriais. A diminuição do rendimento é consequência da perda de substâncias nitrogenadas e gordura para o

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

soro. A maior taxa de proteólise é responsável também pelo desenvolvimento de amargor durante a maturação, além de modificações indesejáveis na textura do queijo (USTUNOL e HICKS, 1990; EMMONS, 1990; LÓPEZ et al., 1997).

Quando o queijo Minas Frescal é elaborado pelo método tradicional, o fermento láctico tem a função de melhorar a atividade coagulante, auxiliar na expulsão do soro da coalhada e promover a prevenção da multiplicação de bactérias indesejáveis (FOX et al., 2000). A ação continuada de bactérias lácticas do fermento no queijo Minas Frescal provoca alterações físico-químicas que acabam por reduzir a vida de prateleira do queijo. O aumento de acidez diminui a retenção de soro, formando uma crosta amarelada e amolecendo a textura do queijo com o passar do tempo (FURTADO, SOUZA e MUNCK, 1980a).

De modo geral, a indústria brasileira tem dado preferência à produção de queijo Minas Frescal com adição de ácido láctico em substituição ao fermento. Semelhante ao processamento tradicional, este tipo de fabricação é obtido por coagulação enzimática, porém, a acidificação é promovida pelo uso direto de ácido láctico, no lugar de fermento láctico. Essa alteração na tecnologia de fabricação resulta em um queijo com maior rendimento, maior umidade, maior pH final, menor acidez e maior perda de sólidos solúveis no soro, quando comparado a um queijo fabricado com adição de fermento (FURTADO, SOUZA e MUNCK, 1980a). A perda de sólidos solúveis no soro ocorre devido ao coágulo menos rígido formado pela fabricação de queijo com ácido láctico, que retêm menos sólidos. O queijo fabricado com cultura láctica possui maior quantidade de bactérias lácticas, sofre maior hidrólise da lactose e, conseqüentemente, apresenta maior produção de ácido láctico durante a fabricação. Este fato favorece a atuação da quimosina que possui melhor atuação em meio ácido (VAN DENDER e MORENO, 1992; WOLFSCHOON-POMBO, FURTADO e MUNCK, 1978).

Van Dender e Moreno (1992) estudaram uma tecnologia de fabricação do queijo Minas Frescal associando a adição de ácido láctico e 0,1% de fermento mesófilico. Os autores observaram que este processo permitiu a obtenção de pH inicial propício à ação do coalho, diminuindo o tempo de coagulação e aumentando a

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

firmeza da coalhada. Além disso, concluíram que a menor proporção de fermento aumentou a durabilidade do queijo durante o seu armazenamento devido à menor intensidade de acidificação e proteólise ocorridas durante a estocagem refrigerada.

Isepon e Oliveira (1995) avaliaram o índice de proteólise do queijo Minas Frescal fabricado com leite cru e com leite pasteurizado, adicionados de cultura láctica. O leite foi submetido a três diferentes tratamentos: sem adição de cultura láctica, com adição de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* e com adição conjunta de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* e de *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*. Os autores concluíram que o emprego de 1,0% de culturas simples ou mistas de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* e *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* não afetou o rendimento dos queijos, porém, aumentou o índice de proteólise à medida em que se aumentou o tempo de armazenamento, em queijos processados com leite cru e leite pasteurizado.

Além das fabricações de queijo Minas Frescal com adição de cultura láctica e com adição de ácido láctico, alguns produtores fabricam este queijo somente com coalho. Segundo Furtado et al. (1980b), o queijo sem fermento apresenta um rendimento maior quando comparado ao queijo fabricado pelo método tradicional. Essa variação está relacionada às diferenças no pH e acidez titulável. O queijo sem fermento, por possuir uma acidez mais baixa desde o início do processo, apresenta uma coalhada menos firme e, conseqüentemente, retêm menos elementos do leite. Os queijos fabricados com adição de ácido láctico ou somente com coalho apresentam comportamentos semelhantes em relação à textura e ao sabor. Entretanto, eles não são tão seguros microbiologicamente como o queijo com adição de fermento láctico, pois as bactérias lácticas do fermento desempenham um papel importante na proteção contra alguns microrganismos, pelo consumo rápido da lactose, abaixamento do pH e competição com outros microrganismos.

O rendimento queijeiro é um parâmetro de interesse prático e econômico que está diretamente relacionado às características físico-químicas do leite, ou seja, teores de gordura, sólidos totais, proteína total e caseína (ZENG et al., 2007). Na fabricação dos queijos nem todos os elementos são retidos na coalhada: certa quantidade é arrastada com o soro e, portanto, não se obtém igual rendimento de

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

todos os componentes. O soro, sendo expelido da coalhada, carrega os componentes solúveis em água. Estes incluem lactose, proteínas do soro, sais solúveis, compostos nitrogenados não protéicos e peptídeos. As quantidades desses constituintes retidos no queijo são diretamente proporcionais à quantidade de soro no queijo, uma vez que esses constituintes são distribuídos uniformemente na fase aquosa. Os constituintes de maior interesse no rendimento são a gordura e a proteína, pois estes representam mais de 90% da porção sólida do queijo (FOX et al., 2000).

3.2. Efeito do pH na fabricação de queijos

O pH é um parâmetro importante para a identidade e qualidade de todos os queijos, pois afeta diretamente sua estrutura, propriedades reológicas e também as interações químicas entre os componentes estruturais (proteínas, água e minerais) dos queijos. Além disso, influencia as mudanças físico-químicas e microbiológicas que contribuem para o sabor e textura dos queijos (LAWRENCE, CREAMER e GILLES, 1987). O pH também afeta a coagulação enzimática, principalmente o tempo de coagulação e a consistência do gel. A reação de agregação micelar, conferida pela diminuição da estabilidade das micelas, por neutralização das cargas negativas e pela migração de fosfato de cálcio intramicelar para a fase aquosa, é favorecida por um pH mais baixo que o do leite. Este fato verifica-se devido à aproximação do pH ótimo para a atividade proteolítica do coalho sobre a κ -caseína, cerca de 5,5, apresentando um intervalo máximo de estabilidade entre pH 5,0 – 6,0. Com a diminuição do pH, observa-se um decréscimo acentuado do tempo de coagulação e um aumento da velocidade de agregação micelar, da firmeza e da consistência do gel formado, explicada em parte pelo aumento da disponibilidade de íons cálcio em solução (FOX et al., 2000; WALSTRA et al., 1999).

O pH de dessoragem também afeta a composição e textura dos queijos. Diminuindo o pH de dessoragem, há um aumento da perda de minerais da massa. Por exemplo, o queijo Cheddar, o qual é normalmente dessorado com pH 6,1, tem menor conteúdo de minerais que o queijo Emmental, o qual é dessorado com pH de 6,5 (LUCEY e FOX, 1993).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Upreti e Metzger (2006) estudaram a influência do cálcio e do fósforo na estrutura e composição do queijo Cheddar. Aumentando o conteúdo de Ca e P no queijo, o pH também aumentou no tanque de fabricação e na dessoragem (6,6 e 6,4, respectivamente), enquanto nos queijos fabricados com baixa concentração de Ca e P, observaram uma diminuição do pH do queijo (6,2 e 5,7, respectivamente). Os queijos com maior conteúdo de cálcio apresentaram textura mais firme e menos úmida em relação àqueles com baixo conteúdo de cálcio. McMahon, Paulson e Oberg (2005), observaram que o aumento do conteúdo de cálcio de 0,3% para 0,6%, no queijo Mussarela acidificado diretamente, resultou em queijos mais firmes e menos adesivos. Porém, queijos com o mesmo conteúdo de cálcio (0,6%), mesma taxa de umidade, mas com diferentes valores de pH (5,3 e 5,8), não apresentaram diferenças significativas nos seus derretimentos ou na firmeza.

Mazal et al. (2007), estudaram o efeito do leite com baixa e alta contagem de células somáticas na composição do queijo Prato. Neste trabalho, os níveis de contagem de células somáticas não afetaram o pH inicial do leite, porém, durante a manufatura, o queijo fabricado com o leite com alta contagem de células somáticas apresentou um valor de pH de 0,25 unidades maior que o queijo fabricado com leite com baixa contagem de células somáticas. Este aumento de pH afetou a ação do coalho e aumentou significativamente o tempo de coagulação do leite. Além disto, o alto pH prejudicou a sinérese, afetando o conteúdo de umidade destes queijos.

Sheehan e Guinee (2004) estudaram o efeito do pH e do teor de cálcio no processo de fabricação e nas características físico-químicas do queijo Mussarela com teor reduzido de gordura. Quatro diferentes tecnologias de fabricação de queijo Mussarela foram utilizadas: com adição de cultura láctica (queijo controle), com adição de ácido láctico, e dois queijos com adição conjunta de ácido láctico e cultura láctica em diferentes concentrações. Os queijos que sofreram acidificação direta coagularam rapidamente em relação ao queijo controle. Estes queijos apresentaram menor teor de cálcio e proteína, e menor pH (5,60) na drenagem do soro do que aquele que foi adicionado de fermento láctico (6,13). Além disto, os queijos fabricados

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

com acidificação direta apresentaram maior teor de umidade e capacidade de ligar água.

3.3. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal

A qualidade microbiológica é um parâmetro que indica tanto as condições higiênicas de produção como a segurança do produto para consumo. O queijo Minas Frescal apresenta vários pontos críticos durante a fabricação que podem conduzir a alterações no produto final, destacando-se: matéria-prima com alta contaminação microbiológica, recontaminação do leite pasteurizado e temperatura inadequada de armazenamento (SANTOS, NOGUEIRA e CUNHA, 1995). Por esses motivos, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir a contaminação ou recontaminação do produto (PEREIRA et al., 1999a).

Os microrganismos considerados mais perigosos para a segurança alimentar em queijos são *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (DE BUYSER et al., 2001). Diversos trabalhos mostraram que o queijo Minas Frescal comercializado no Brasil apresentou contaminação por estes microrganismos acima dos padrões estabelecidos para o produto (ALMEIDA FILHO e NADER FILHO, 2002; ARAÚJO et al., 1997; HOFFMAN, SILVA e VINTURIM, 2002).

De acordo com os Padrões Microbiológicos vigentes, da resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001) os queijos de muito alta umidade (>55%), como o Minas Frescal elaborado por coagulação enzimática e sem a presença de bactérias lácticas em forma viável e abundantes, devem apresentar as seguintes características microbiológicas: valores menores que $5,0 \times 10^2$ UFC/g e $5,0 \times 10^2$ NMP/g de *Staphylococcus* coagulase positiva e de coliformes a 45°C (de origem fecal), respectivamente, ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostra. Já o queijo Minas Frescal de muito alta umidade com bactérias lácticas em forma viável e abundantes, deve apresentar as seguintes características microbiológicas: valores menores que $5,0 \times 10^3$ UFC/g e $5,0 \times 10^3$ NMP/g de *Staphylococcus* coagulase positiva e de coliformes a 45°C (de origem fecal),

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

respectivamente, ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostra.

O resfriamento é a principal forma de conservação do leite cru. A refrigeração impede a multiplicação da maioria dos microrganismos e as chances de acidificação do leite, porém, aumenta as chances de crescimento de bactérias psicotróficas, que podem causar diversos problemas no leite e no queijo. Apesar de estes microrganismos serem destruídos pela pasteurização do leite, eles produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes capazes de degradar a proteína e a gordura do leite, afetando assim, sua qualidade. Dentre os problemas que estas enzimas podem causar estão a redução da vida de prateleira de produtos lácteos, alteração do sabor e odor, redução do rendimento industrial na fabricação de queijos e geleificação do leite longa vida (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; CHAMPAGNE et al., 1994).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende quase 2000 sorotipos, dos quais somente poucos são patogênicos ao homem. A família é composta por bactérias gram-negativas, com forma de bastonete curto, não esporuladas, produtoras de catalase. A temperatura considerada ótima para a multiplicação destes microrganismos é de 37°C. Esta bactéria é comumente encontrada no trato intestinal de animais, especialmente em aves e suínos. As fontes ambientais deste microrganismo incluem a água, o solo, os insetos, as superfícies de cozinhas e indústrias, as fezes animais e as carnes, aves e frutos do mar crus. Outros alimentos associados à *Salmonella* são ovos, leite e seus derivados, molhos, saladas, misturas para bolo, sobremesas recheadas com creme, gelatina em pó, manteiga de amendoim e chocolate (FDA, 1998).

O tempo de incubação da Salmonelose é de 6-48 horas, seguido pelo início dos sintomas agudos, como náusea, vômito, cãibra abdominal, diarreia, febre e dor de cabeça (ICMSF, 1998). A *Salmonella* pode se multiplicar durante a fabricação e sobreviver em vários queijos por mais de 60 dias (ICMSF, 2000).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos, mesófilos, não esporulados e agrupados irregularmente na forma de cachos. São produtores de catalase, anaeróbios facultativos e possuidores de metabolismos respiratório e fermentativo (CARVALHO, 2003). A contaminação por *Staphylococcus aureus* ocorre devido às práticas de manipulação e temperatura de refrigeração inadequadas. A manipulação do alimento pelo homem, um dos reservatórios desta bactéria, é a causa provável de contaminação (PEREIRA et al., 1999b; OLARTE et al., 2002).

Araújo et al. (2002) demonstraram a presença de espécies do gênero *Staphylococcus* em 77% das 45 amostras de queijo Minas Frescal coletadas na cidade do Rio de Janeiro, enquanto que em 17,7% das amostras encontrou-se *Staphylococcus aureus* acima do limite estabelecido pela legislação brasileira.

Peresi et al. (2001) encontraram contagens de *Staphylococcus coagulase* positiva acima do limite máximo aceitável em 60% das 30 amostras de queijo Minas Frescal artesanais comercializadas na cidade de São José do Rio Preto-SP. Pereira et al. (1991), relataram um surto de intoxicação causada por queijo Minas, ocorrido na cidade de Belo Horizonte. Os autores afirmaram que esta intoxicação foi causada por *Staphylococcus aureus*, produtor de enterotoxina B, onde 7 pessoas foram envolvidas.

Hoffman, Silva e Vinturim (2002) analisaram 10 amostras de queijo tipo Minas Frescal comercializados em feiras livres da cidade de São José do Rio Preto- SP, e verificaram que todas as amostras estavam fora dos padrões microbiológicos vigentes para *Staphylococcus aureus*.

Dados obtidos por Barros et al. (2004) e Leite et al. (2001), que analisaram queijos Minas Frescal comercializados no Rio de Janeiro-RJ e em Cuiabá-MT, respectivamente, mostraram que a maioria das contagens médias estava acima dos padrões preconizados pela Portaria nº146/96 (BRASIL, 1996), com relação à *Staphylococcus coagulase* positiva. Barros et al. (2004) obtiveram 27% (8/30) das amostras analisadas acima do limite estabelecido e Leite et al. (2001) detectaram a presença de *Staphylococcus aureus* em 86,7% (13/15) das amostras.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As bactérias psicotróficas são capazes de se multiplicar em temperaturas abaixo de 10°C, especialmente na faixa de 4 a 5°C, independente de sua condição ótima de multiplicação. Bactérias psicotróficas são, em sua maioria, gram-negativas e encontradas em ambientes onde temperaturas estão tanto abaixo de 7°C como entre 15 e 20°C (COUSIN, JAY e VASAVADA, 2001). Dentre os gêneros presentes no grupo de microrganismos aeróbios psicotróficos, estão *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. O gênero *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putrefaciens*, *P. fragi*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, etc) é o mais comum e prejudicial. O tempo de geração é de aproximadamente 8 horas a 40°C, e 14 horas a 10°C. A espécie *Pseudomonas fluorescens*, além de alterar os alimentos com a produção de enzimas termorresistentes, é a espécie mais comumente isolada da superfície dos tetos e do úbere. A presença de um grande número de espécies de microrganismos psicotróficos pode estar relacionada com a ocorrência de toxinfecções alimentares humanas ou com a deterioração e perda de qualidade sensorial dos alimentos (SANTOS e FONSECA, 2001). O gênero *Pseudomonas* spp. representa cerca de 10% da microbiota total no leite recém obtido, mas torna-se o gênero predominante em leite mantido sob refrigeração (MUIR, 1996).

Muitos autores (SANTOS e FONSECA, 2001; RUAS-MADIEDO et al., 1998b; SØRHAUG e STEPANIAK, 1997) relatam que o gênero *Pseudomonas* não sobrevive à pasteurização do leite, porém, Dogan e Boor (2003) observaram que quando a carga inicial deste microrganismo é muito elevada, parte deles pode sobreviver ao tratamento térmico de pasteurização. Segundo Furtado (2005), se o número de psicotróficos no leite refrigerado não exceder de 500.000 a 1.000.000 por mL, não há motivos para preocupação se o leite for imediatamente pasteurizado. Entretanto, quando o número exceder a 5 milhões/mL há um considerável risco de alteração das proteínas e gordura do leite.

Silva, Hofer e Tibana (1998) coletaram 47 amostras de queijos Minas Frescal e 3 amostras de queijos Ricota em 5 diferentes supermercados e 2 feiras livres da cidade do Rio de Janeiro. Das 47 amostras de queijos Minas Frescal, 30 foram fabricadas industrialmente e 17, artesanalmente. Dez amostras (58,8%) dos queijos

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Minas Frescal fabricados artesanalmente apresentaram presença de *Listeria spp.*, sendo que 41,17% foram positivas para *Listeria monocytogenes*. Dos queijos Ricota e Minas Frescal fabricados industrialmente, 10 amostras (30%) apresentaram presença de *Listeria spp.*, sendo que 3% foram positivas para *Listeria monocytogenes*.

O queijo Minas Frescal comercializado na região de Campinas – SP foi avaliado em trabalhos de Vieira (2000) e Carvalho, Viotto e Kuaye (2007). Em vinte amostras analisadas por Vieira (2000), 25% estavam contaminadas por *Listeria monocytogenes*, 40% por *Listeria innocua*, 20% por *Listeria welshimeri* e 5% por *Listeria seeligeri*. Analisando 93 amostras do produto, Carvalho, Viotto e Kuaye (2007) verificaram que 11,8% das amostras apresentavam contaminação por *Listeria spp.*, sendo 3% por *Listeria monocytogenes* e 8% por *Listeria innocua*.

Naldini (2002), através de inoculação experimental, verificou a viabilidade de *Listeria monocytogenes* inoculada em queijos Minas frescal produzidos com adição de cultura láctica (1%) e com acidificação do leite com ácido láctico (0,025%v/v), estocados por vinte e cinco dias em temperaturas de refrigeração (5 e 10°C). O autor verificou uma elevação da população do microrganismo de até três ciclos logarítmicos nos queijos produzidos com acidificação direta, em ambas as temperaturas de armazenamento, enquanto o queijo produzido com adição de cultura láctica apresentou contagens de *Listeria monocytogenes* praticamente inalteradas durante todo o período de armazenamento, a 5 e 10°C.

Além dos patógenos, existem os microrganismos indicadores, que são aqueles que quando presentes em um alimento podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação em um alimento, sobre a provável presença de patógenos ou sobre o estágio de deterioração de um alimento. Eles também são importantes, pois indicam condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A contaminação mais comum vem do grupo coliforme. Os coliformes são bactérias gram-negativas, fermentadoras de lactose e produtoras de ácido e gás. O principal gênero de coliforme encontrado no queijo é *Escherichia coli* (JAY, 2000). A

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

presença de coliformes totais e fecais indica condições higiênicas insatisfatórias, com provável contaminação pós-processamento; deficiência nos processos de limpeza, sanificação e tratamento térmico; e multiplicação durante o processo ou estocagem. Os coliformes estão relacionados com o estufamento precoce do queijo devido à produção de gases; além disso, eles acidificam o produto, ocasionando alteração no sabor (CARVALHO, 2003; MORA et al., 2007). O uso de fermento láctico mesofílico homofermentador ajuda a inibir estas contaminações, mas torna o queijo mais ácido, o que parece desagradar à maioria dos consumidores do queijo Minas Frescal (FURTADO, 2005).

Estudo realizado por Oliveira et al. (1998) relatou a detecção de coliformes totais e fecais acima dos níveis permitidos, respectivamente, em 46,9% e 9,4% das 32 amostras de queijo Minas Frescal elaboradas por seis fábricas de laticínios localizadas na região nordeste do estado de São Paulo.

Pereira et al. (1999a) observaram em Belo Horizonte que 90% das 20 amostras de queijo Minas Frescal analisadas no período de 1995-96 apresentaram coliformes fecais acima dos limites estabelecidos por lei.

Em 2002, o Programa Paulista de Análise Fiscal, instituído pelo Centro de Vigilância Sanitária em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz, analisou 123 amostras de queijo Minas Frescal. Destas amostras, 35 (28,5%) não estavam em conformidade com os padrões microbiológicos para coliformes totais, coliformes fecais e *Staphylococcus aureus*. De acordo com este programa, o queijo Minas Frescal foi inserido na categoria de produtos que apresentam maiores riscos de causarem doenças transmitidas por alimentos (SÃO PAULO, 2003).

Para prevenir a contaminação pelos coliformes é necessário haver uma matéria-prima de boa qualidade, higiene durante o processamento, tanto de equipamentos e utensílios, quanto de manipuladores e condições adequadas de conservação (BISHOP e WHITE, 1986).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Bactérias aeróbias mesófilas são um dos indicadores microbiológicos de qualidade mais comumente utilizados, mas não são aplicáveis aos alimentos que sofrem o processo de fermentação. Estes microrganismos se desenvolvem em temperaturas entre 20 e 45°C, sendo que a temperatura ótima de multiplicação é em torno de 32°C. Fermentam a lactose do leite, produzindo principalmente ácido láctico e reduzindo o valor comercial do leite. Países de clima tropical apresentam condições para o rápido desenvolvimento deste grupo microbiano (FRANCO e LANDGRAF, 1996). A importância deste grupo de bactérias se deve ao fato de compreender a maioria dos contaminantes comuns do leite, tanto deteriorantes quanto patogênicos. Desta forma, sua contagem é considerada um bom indicador da qualidade microbiológica do queijo (JAY, 2000).

As bactérias lácticas têm grande importância econômica, já que de forma natural ou adicionada intencionalmente, desempenham importante papel na fermentação de grande variedade de alimentos. Sua atividade metabólica não apenas contribui para o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis, como também permite conservar ou aumentar o valor nutritivo da matéria-prima (MAGRO et al., 2000).

Bactérias lácticas constituem um grupo de microrganismos gram-positivos e não produtores de catalase muito heterogêneo. Os gêneros tradicionais são: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Carnobacterium* (SCHLEIFER et al., 1995).

A capacidade de produzir grande quantidade de ácidos orgânicos (fundamentalmente ácido láctico), por fermentarem os carboidratos presentes nos alimentos e, conseqüentemente, reduzirem o pH, é o fator primário em que se baseia a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas (MAGRO et al., 2000). Além disso, as bactérias lácticas têm capacidade de produzir outras substâncias inibitórias, tais como: peróxido de hidrogênio, diacetil, metabólitos de oxigênio e substâncias antimicrobianas de natureza protéica denominadas bacteriocinas (PIARD e DESMAZEAUD, 1991).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Inúmeras indústrias sob inspeção de órgãos competentes produzem o queijo Minas Frescal respeitando as normas vigentes, inclusive as de boas práticas de fabricação, buscando a obtenção de um produto compatível com o padrão de qualidade estabelecido. Entretanto, devido à simplicidade de sua produção, muitos destes queijos são de fabricação caseira, onde o controle é menos eficiente, inclusive por falta de conhecimentos adequados ao processamento. Para a obtenção de um produto de qualidade, independentemente da escala de produção, deve-se controlar as condições higiênico-sanitárias e utilizar as boas práticas de higiene durante todo o processamento (PERESI et al., 2001).

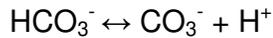
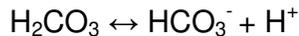
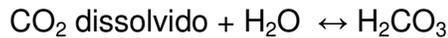
3.4. Adição de CO₂ ao leite e ao queijo

A vida de prateleira de produtos lácteos não estéreis, incluindo leite pasteurizado, queijo cottage, queijo Minas Frescal, e alguns tipos de iogurte e produtos lácteos fermentados, é geralmente limitada de 1 a 3 semanas, dependendo da qualidade dos ingredientes, condições do processo e manipulação pós-processamento (HOTCHKISS, WERNER e LEE , 2006).

A temperatura de armazenamento do leite após ordenha é um dos principais fatores que determinam sua vida de prateleira. Os microrganismos mesófilos provocam acidificação do leite pelo acúmulo de ácido láctico, resultante da fermentação da lactose. O emprego de programas de resfriamento do leite na fazenda, após ordenha, melhorou significativamente a qualidade do leite, porém, favoreceu a multiplicação de microrganismos psicotróficos, que embora sejam eliminados durante o tratamento térmico, produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas que não são inativadas nos tratamentos usuais da indústria láctea (SANTOS e FONSECA, 2001).

Um dos procedimentos que tem sido proposto para controlar as bactérias psicotróficas em leite cru é o tratamento do leite refrigerado com CO₂. O CO₂ desloca o O₂ do meio, e ao se dissolver no leite, abaixa o pH e forma ácido carbônico na fase aquosa (BUTLER, 1982):

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



Além disto, o CO_2 tem um efeito direto no metabolismo dos microrganismos independente do efeito da redução de pH e do deslocamento de O_2 (DANIELS, KRISHNAMURTHI e RIZVI, 1985). Este efeito ocorre, pois o CO_2 é altamente solúvel em materiais hidrofóbicos como os lipídios. Assim, o CO_2 se concentra na membrana lipídica das células das bactérias e age destruindo as propriedades físico-químicas da membrana. Quando o CO_2 se concentra na membrana intracelular, ele pode estimular ciclos ineficazes, reações de carboxilação e descarboxilação, as quais são comuns para todas as células, sem resultados benéficos, resultando em energia gasta e perda de ATP, não ocorrendo, conseqüentemente, a multiplicação das células dos microrganismos (STRETTON et al., 1996).

Vários estudos têm mostrado que o uso de CO_2 no leite diminui a velocidade de desenvolvimento de microrganismos. Amigo, Olano e Calvo (1995) reduziram o pH do leite de 6,7 para 6,2 e 6,0 com adição de CO_2 e observaram que estes tratamentos diminuiriam o crescimento de *Pseudomonas* spp.

Espie e Madden (1997) estudaram o efeito da injeção de 30 e 45mM de CO_2 ao leite cru armazenado por 7 dias a 6°C. As análises microbiológicas realizadas foram: coliformes a 45°C, contagem de psicrotróficos, contagem total de mesófilos aeróbios e *Lactobacillus*. Com exceção do *Lactobacillus*, os demais grupos de microrganismos demonstraram inibição da multiplicação devido à adição de CO_2 . Os autores concluíram que uma manutenção da qualidade microbiológica pode ocorrer com a adição de CO_2 ao leite cru.

Martin, Werner e Hotchkiss (2003), observaram o efeito da injeção de diferentes concentrações de CO_2 (0,6 a 61,4 mM) sobre a multiplicação microbiana em leite cru mantido a 6°C. Os resultados mostraram que o CO_2 inibiu significativamente o desenvolvimento de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*,

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Listeria monocytogenes, *Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis*, em todas as concentrações testadas, através da redução das fases lag, log e estacionária. O aumento da concentração de CO₂ injetada aumentou a inibição dos microrganismos.

Calvo, Montilla e Olano (1993), observaram que a acidificação do leite cru com CO₂, em pH entre 6,0 e 6,5, inibiu o crescimento de bactérias psicrófilas durante o armazenamento refrigerado (4°C), evitando a diminuição do rendimento dos queijos Ibérico (queijo espanhol semi-duro). Já em outros estudos (RUAS-MADIEDO et al., 1998a; RUAS-MADIEDO et al., 1998b) observou-se que o rendimento de queijos com adição de CO₂ não diferiu significativamente dos queijos controle.

Montilla, Calvo e Olano (1995) fabricaram queijo Ibérico com leite pasteurizado (controle), leite pasteurizado acidificado a pH 6,0 com adição de CO₂ e leite cru acidificado a pH 6,0 com adição de CO₂. Na produção dos queijos com adição de CO₂ houve redução de 75% do coalho necessário para a coagulação, o que foi acompanhado pela redução da proteólise. Além disto, os queijos não apresentaram diferenças significativas nas suas características sensoriais. Os autores concluíram que os queijos fabricados tanto com leite cru como com leite pasteurizado, adicionados de CO₂, não apresentaram problemas no rendimento, além de apresentarem menor proteólise.

Ruas-Madiedo et al. (1998a) adicionaram CO₂ ao leite cru para fabricação do queijo Afuega'l Pitu, um queijo espanhol de coagulação ácida e com curto período de maturação, e armazenaram o leite por 4 dias em temperatura de refrigeração (4°C), antes da pasteurização. O tratamento com CO₂ reduziu os níveis de proteólise durante os primeiros estágios de fabricação do queijo e, conseqüentemente, preveniu significativamente a diminuição do seu rendimento.

Ruas-Madiedo et al. (2002), produziram queijo Manchego, um queijo espanhol duro, através da acidificação do leite cru com CO₂ a pH 6,2. O tratamento com CO₂ modificou os parâmetros tecnológicos da produção de queijo: o tempo de coagulação foi reduzido, a dureza da coalhada foi aumentada, porém não houve diferença

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

significativa no rendimento deste queijo, quando comparado ao queijo controle, sem adição de CO₂ ao leite.

Nelson, Lynch e Barbano (2004a) acidificaram o leite pasteurizado com 35mM de CO₂ para produção de queijo Cheddar. Uma significativa redução no tempo de coagulação foi observada comparando com o queijo controle. Queijos fabricados com leite adicionado de CO₂ tiveram menos gordura total e cálcio do que os queijos controle, devido ao baixo pH (5,96) durante a etapa de drenagem do soro, enquanto que o teor de proteína não foi afetado.

A adição direta do CO₂ em produtos lácteos tem sido bastante estudada, sendo economicamente viável em leites e queijos. Grandes extensões de vida de prateleira (200% a 400%) têm sido realizadas pelo seu uso, aumentando a segurança do produto e melhorando a sua qualidade (HOTCHKISS, WERNER e LEE, 2006).

Através das pesquisas relatadas, observa-se que o CO₂, além de inibir a multiplicação de microrganismos psicrotóxicos, pode ser usado como um recurso tecnológico na fabricação de queijos, pois ele pode afetar as características de processo pela diminuição do pH no tanque de fabricação, redução da quantidade de coalho, mudanças na composição do produto e aumento do rendimento e da vida de prateleira dos queijos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Leite

O leite utilizado como matéria-prima para o experimento foi proveniente de vacas leiteiras da fazenda Atti Latte, localizada na cidade de Itatiba-SP. Para cada processamento, foram coletados 60 litros de leite cru resfriado (5°C), que foram transportados para a planta piloto de Leite e Derivados da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP.

Após a coleta de amostras para a caracterização da matéria-prima, foi realizada a pasteurização do leite a 72°C por 15 segundos em trocador de calor a placas, com capacidade de 100 litros/hora. O leite foi, então, armazenado em câmara fria ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) até o dia seguinte para a fabricação dos queijos.

4.2. Fabricação do queijo Minas Frescal

O esquema geral do trabalho é apresentado na Figura 4.1. Foram feitas três repetições completas do processamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

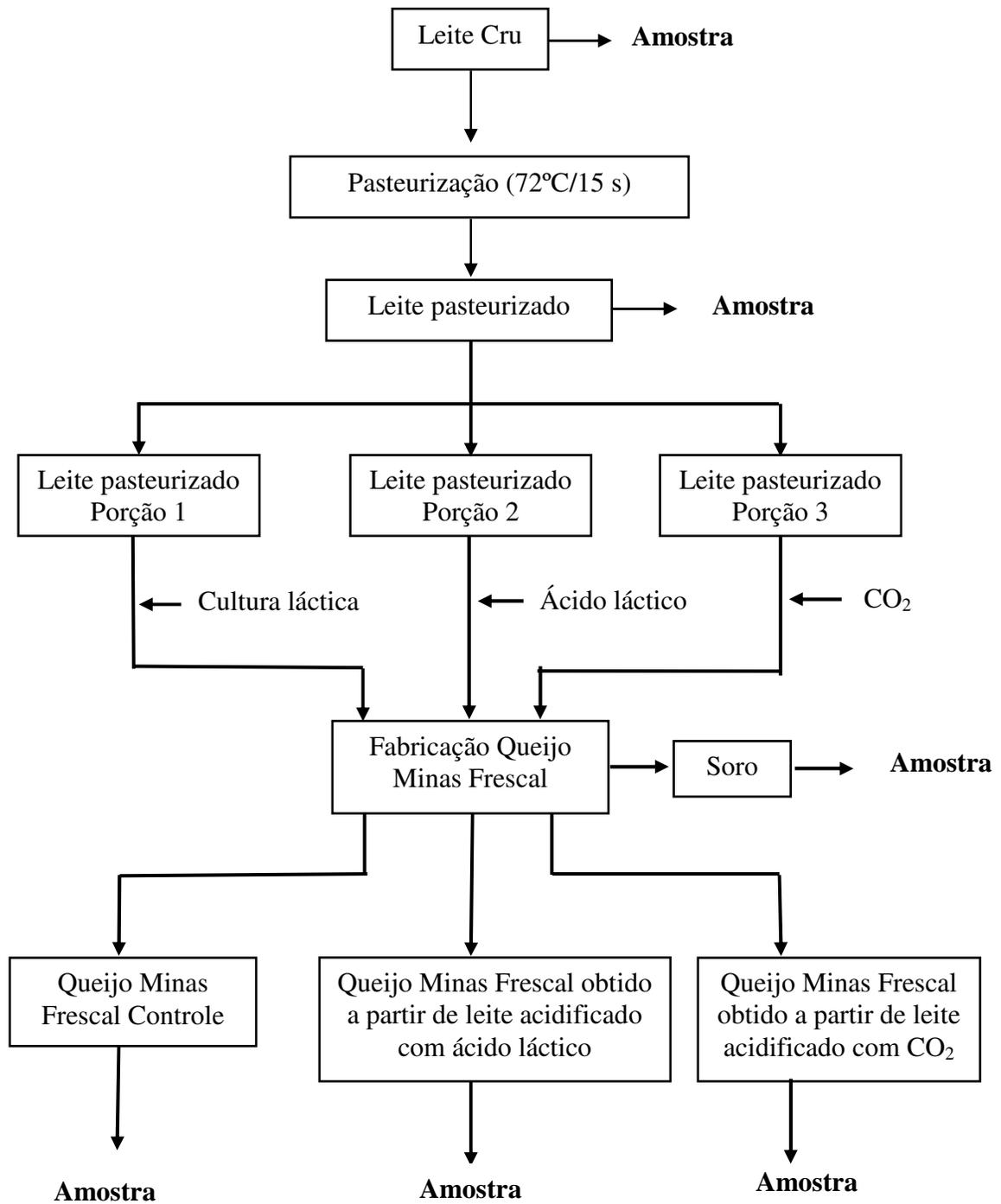


Figura 4.1. Fluxograma geral do processo

4. MATERIAL E MÉTODOS

Após pasteurização, o leite (60 litros) foi dividido em três porções de 20 litros cada. A primeira foi utilizada para fabricação do queijo Minas Frescal controle, que foi fabricado com adição de 1% de cultura láctica mesofílica tipo O. A segunda e a terceira porções foram acidificadas, respectivamente, pela adição de ácido láctico (solução de 10%) e dióxido de carbono ao leite, respectivamente, até que o pH 6,2 fosse atingido. O CO₂ foi borbulhado no leite utilizando-se uma mangueira perfurada. A partir do leite submetido a esses diferentes tratamentos seguiu-se o mesmo protocolo para fabricação de queijo Minas Frescal, conforme Oliveira (1986). Aos leites a 35°C adicionaram-se cloreto de cálcio (250 ppm) e coalho em pó.

O tempo necessário para atingir o ponto de corte foi controlado e, em seguida, o coágulo formado foi cortado utilizando-se liras verticais e horizontais, para obtenção de cubos de 1,5-2,0 cm. Foi feita a mexedura (30 minutos), dessoragem parcial e salga na massa. O sal foi diluído em água quente, na proporção de 2,1% do peso do leite e, após resfriamento até 35°C, a solução foi adicionada na massa parcialmente dessorada. Promoveu-se a remoção de aproximadamente 9,6 kg de soro para padronização da quantidade de massa e soro a ser salgada. Depois, foi realizada a dessoragem total, enformagem e viragens. Foram feitas as seguintes viragens: duas de 5 minutos, duas de 10 minutos e uma de 20 minutos. Após as viragens, os queijos, mantidos nas fôrmas, foram armazenados por 24 horas em câmara fria (5 ± 1°C). No dia seguinte, foram embalados em seladora a vácuo e armazenados em câmara fria (5 ± 1°C).

A cultura láctica utilizada foi o fermento mesofílico tipo O, da marca Ezal DriedMA, homofermentativo, constituído de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Para o preparo do fermento, inoculou-se 0,05 g da cultura liofilizada em 1000 mL do leite e incubou-se em estufa a 30°C, por 6 horas.

Utilizou-se coalho em pó, marca Ha-La, fabricado pela Christian Hansen, composto de quimosina e pepsina bovina. A força do coalho foi determinada através da metodologia descrita pela Instrução Normativa N°68 (BRASIL, 2006), que se fundamenta na determinação do tempo de coagulação de um volume de leite, a 35°C, por uma quantidade de coalho conhecida, baseada na propriedade que tem a

4. MATERIAL E MÉTODOS

quimosina do coalho de desdobrar a caseína do leite. Para a realização da análise, transferiu-se 100 mL de leite para um balão de 250 mL, que foi mantido a 35°C. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução de coalho preparada a partir de 1g do coalho e 100 mL de solução de cloreto de sódio 7%. Logo após a adição do coalho, acionou-se o cronômetro e girou-se vagarosamente o balão até o aparecimento de grumos finos na parede do frasco. A determinação foi feita em triplicada e o resultado foi expresso em segundos utilizando-se a média de dois valores que não variaram mais de 10 segundos entre si:

$$\text{Poder coagulante} = \frac{V \times 2400}{T}$$

Onde:

V = volume de leite utilizado na prova, em mL, multiplicado por 100 (coalho em pó);

2400 = tempo, em segundos, gasto para coagular 100 mL de leite cru com coalho padrão (teoricamente);

T = tempo, em segundos, gasto para coagular 100 mL de leite cru, usando a solução de coalho em exame.

4.3. Amostragem e análises realizadas

Conforme apresentado no fluxograma geral de trabalho (Figura 4.1), foram coletadas amostras de leite cru, leite pasteurizado, soros e queijos para a realização de análises físico-químicas e microbiológicas. O resumo das análises realizadas para cada uma das amostras é apresentado na Tabela 4.1.

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA/UNICAMP. O leite cru foi analisado quanto ao pH, acidez, gordura, densidade, extrato seco total utilizando-se Disco de Arckermann, fosfatase, peroxidase e contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios. O leite pasteurizado foi submetido às análises de fosfatase e peroxidase para avaliação da eficiência da pasteurização. Neste leite foram realizadas

4. MATERIAL E MÉTODOS

as análises de pH, acidez, extrato seco total, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12%, gordura, cinzas, lactose, coliformes totais e fecais e contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios.

No soro do queijo (de cada processamento) foram feitas as seguintes determinações analíticas: pH, acidez, extrato seco total, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12%, gordura, cinzas e lactose.

Os queijos fabricados a partir de leite adicionado de cultura láctica (controle) e de leite acidificado através da adição de ácido láctico ou CO₂ foram avaliados quanto ao pH, umidade, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12%, gordura, cinzas e sal. A proteólise dos queijos, expressa como índice de extensão e profundidade de proteólise, foi avaliada após 1, 7, 13, 19 e 25 dias de armazenamento refrigerado dos produtos, através das determinações de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12%.

Um dia após a fabricação dos queijos, foram realizadas as análises microbiológicas, conforme estabelecido pelo Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos – RDC Nº 12/2001 (BRASIL, 2001): *Staphylococcus* coagulase positiva, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e coliformes totais e fecais, no Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA/UNICAMP. Neste mesmo dia foram realizadas as análises de contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios, bactérias lácticas, bolores e leveduras, psicrotróficos e *Pseudomonas* spp. dos queijos, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA/UNICAMP. Estas análises foram também realizadas após 7, 13, 19 e 25 dias de armazenamento refrigerado dos queijos.

O leite e os queijos foram analisados quanto à concentração de dióxido de carbono. O leite controle e o leite adicionado de CO₂ foram analisados no dia do processamento. Os queijos controle e os obtidos a partir do leite acidificado através

4. MATERIAL E MÉTODOS

da adição de ácido láctico ou de CO₂ foram analisados no dia do processamento e durante a vida de prateleira, após 7, 13, 19 e 25 dias de armazenamento.

O pH, durante o processo de fabricação dos queijos, foi avaliado nas etapas de corte, agitação, repouso, salga e viragens dos queijos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 4.1. Análises realizadas no leite cru, leite pasteurizado, soros e queijos

	Leite cru	Leite pasteurizado	Soros	Queijos
pH	X	X	X	X
Acidez	X	X	X	
Fosfatase	X	X		
Peroxidase	X	X		
Extrato Seco Total (Disco de Arckermann)	X			
Extrato Seco Total		X	X	X
Gordura	X	X	X	X
Densidade	X			
Proteína Total		X	X	X
Nitrogênio solúvel em pH 4,6		X	X	X
Nitrogênio solúvel em TCA 12%		X	X	X
Cinzas		X	X	X
Lactose		X	X	
Sal				X
Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios	X	X		X
Contagem de bactérias lácticas				X
Contagem de bolores e leveduras				X
Contagem de psicrotóxicos				X
Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.				X
Coliformes totais		X		X
Coliformes fecais		X		X
<i>Salmonella</i> spp.				X
<i>Staphylococcus aureus</i>				X
<i>Listeria monocytogenes</i>				X
Concentração de CO ₂		X		X

4. MATERIAL E MÉTODOS

A determinação da recuperação dos constituintes do leite e do rendimento dos processos foi baseada na composição físico-química do leite, soro e queijo, conforme descrito por Furtado e Wolfschoon-Pombo (1979). No presente estudo, a recuperação foi calculada para a gordura e proteína do leite, para o queijo e para o soro, da seguinte forma:

Recuperação da proteína do leite para:

- Queijo = $\frac{\text{proteína do queijo (\%)} \times \text{massa do queijo (kg)}}{\text{proteína do leite (\%)} \times \text{massa do leite (kg)}} \times 100$
- Soro = $\frac{\text{proteína do soro (\%)} \times \text{massa do soro (kg)}}{\text{proteína do leite (\%)} \times \text{massa do leite (kg)}} \times 100$

Recuperação da gordura do leite para:

- Queijo = $\frac{\text{gordura do queijo (\%)} \times \text{massa do queijo (kg)}}{\text{gordura do leite (\%)} \times \text{massa do leite (kg)}} \times 100$
- Soro = $\frac{\text{gordura do soro (\%)} \times \text{massa do soro (kg)}}{\text{gordura do leite (\%)} \times \text{massa do leite (kg)}} \times 100$

O rendimento foi determinado considerando a massa de leite processado e a massa de queijo obtido depois de 24 horas de armazenamento refrigerado. O rendimento foi calculado e expresso da seguinte forma (LUCEY e KELLY, 2004):

- Rendimento (R) com base na massa do queijo pela massa de leite:

$$R = \frac{\text{massa de queijo}}{\text{massa de leite}} \times 100$$

- Rendimento ajustado (Raj) ao teor de umidade e de sal (SPADOTI, 2003):

$$R_{aj} = R \times \frac{100 - (\% \text{ umidade real} + \% \text{ sal real})}{100 - (\% \text{ umidade desejada} + \% \text{ sal desejada})}$$

- Rendimento em base seca (Rbs) (GIGANTE, 1991):

$$\text{Rbs} = \frac{\text{Massa de queijo} \times \% \text{ sólidos do queijo} \times 100}{\text{Massa de leite} \times \% \text{ sólidos do leite}}$$

Onde:

% umidade real = % umidade do queijo

% de sal = % de sal do queijo

% umidade desejada= 57 %

% sal desejada= 1,5 %

4.4. Determinações analíticas

4.4.1. Análises físico-químicas

Para constituição de uma amostra representativa a ser utilizada nas detecções analíticas, os leites foram previamente homogeneizados e, os queijos, foram randomicamente escolhidos, triturados em multiprocessador e homogeneizados. O mesmo procedimento de amostragem foi repetido para as determinações ao longo do tempo de vida de prateleira. As determinações analíticas foram realizadas em triplicata, de acordo com as seguintes metodologias:

pH: determinado por potenciômetro previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente nas amostras (LANARA, 1981);

Densidade: determinada introduzindo o termolactodensímetro em 1000 mL de amostra (LANARA, 1981);

Peroxidase: a atividade da enzima foi avaliada segundo metodologia descrita no Lanara (1981), a qual se baseia no potencial da enzima, quando ativa, de hidrolisar o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, que transforma o guaiacol da sua forma leuco para sua forma corada;

Fosfatase: a atividade da enzima foi avaliada segundo metodologia descrita na AOAC 33.2.50 (1995), a qual se baseia no potencial da enzima, quando ativa, de hidrolisar os ésteres fosfóricos, com liberação de fenol. Este condensa com a 2.6

4. MATERIAL E MÉTODOS

dibromo ou 2.6 dicloroquinona cloroimida formando um indofenol que em meio alcalino apresenta coloração azul;

Acidez titulável: determinada por titulação da amostra com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença de indicador fenolftaleína, segundo a metodologia AOAC 947.05 (1995);

Extrato Seco Total: determinado por secagem em estufa a 105°C, de acordo com AOAC 925.23 (1995) para leite pasteurizado, soro e queijo, e utilizando-se o disco de Arckermann para leite cru;

Gordura: determinado pelo Método de Gerber para leite e queijo, de acordo com British Standard Institution (1989); e pelo método de Mojonnier para o soro, de acordo com AOAC (1995);

Gordura no extrato seco (GES): o teor de gordura no extrato seco (GES) do queijo foi obtido pela seguinte relação:

$$\text{GES} = \frac{\% \text{gordura}}{\% \text{extrato seco total}} \times 100$$

Nitrogênio total (NT): foi determinado através do método micro-Kjeldahl para o leite e soro, e através do método macro-Kjeldahl para o queijo, de acordo com AOAC (1995). O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,38;

Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NNC): foi determinado através do nitrogênio solúvel do sobrenadante após a precipitação isoelétrica das caseínas, pelo método macro-Kjeldahl para leite, soro e queijo, de acordo com AOAC (1995);

Nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12% (NNP): foi determinado através do nitrogênio solúvel no sobrenadante após a precipitação das proteínas com TCA 12%, pelo método micro-Kjeldahl para leite e soro e macro-Kjeldahl para queijo, de acordo com AOAC (1995);

Índice de extensão de proteólise: foi calculado pela fórmula seguinte:

$$\text{IEP} = \frac{\% \text{Nitrogênio solúvel em pH 4,6}}{\% \text{Nitrogênio total}}$$

Índice de profundidade de proteólise: foi calculado pela fórmula seguinte:

$$\text{IPP} = \frac{\% \text{Nitrogênio solúvel em TCA 12\%}}{\% \text{Nitrogênio total}}$$

Proteína verdadeira: foi calculado pela fórmula seguinte:

$$\text{Pv} = (\% \text{Nitrogênio total} - \% \text{Nitrogênio solúvel em TCA 12\%}) \times 6,38$$

4. MATERIAL E MÉTODOS

% Caseína: foi calculado pela fórmula seguinte:

$$\% \text{ Caseína} = (\% \text{Nitrogênio total} - \% \text{Nitrogênio solúvel em pH 4,6}) \times 6,38$$

% Caseína Intacta: foi calculado pela fórmula seguinte:

$$\% \text{Caseína Intacta} = (\% \text{Caseína} / \% \text{Proteína verdadeira}) \times 100$$

Lactose: foi determinado segundo LANARA (1981), através da precipitação do óxido cuproso da solução de Fehling pela ação redutora do açúcar invertido;

Cinzas: determinado por incineração da amostra a 550°C, de acordo com AOAC 935.42 (1995);

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

Sal por umidade (S/U): o teor de sal na umidade (S/U) do queijo foi obtido pela seguinte relação:

$$S/U = \frac{\% \text{ sal}}{\% \text{ umidade}} \times 100$$

4.4.2. Avaliação da concentração de CO₂ no leite e nos queijos

A concentração de CO₂ no leite foi determinada através de uma curva padrão. Esta curva foi construída a partir do leite pasteurizado, que corresponde ao ponto zero de calibração do equipamento, adicionado de NaHCO₃ (0,057M) e água ultra-pura degaseificada em diferentes proporções para obtenção de concentrações conhecidas de CO₂ (Tabela 4.2), conforme descrito por Ma *et al.* (2001). A porcentagem de CO₂ foi obtida através da leitura no analisador de CO₂ (MOCON), após adição de H₂SO₄ e liberação do CO₂ dissolvido no leite para o espaço livre dos frascos. A Figura 4.2 apresenta um exemplo de curva padrão de CO₂ em leite. Para cada processamento foi determinada uma curva padrão para o leite utilizado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 4.2. Quantidade de solução padrão de bicarbonato de sódio e água ultra-pura degaseificada para a construção da curva padrão de CO₂ em leite.

Amostra	Volume de bicarbonato de sódio (mL)	Volume de água (mL)	ppm de CO ₂
1	0	12	0
2	1	11	100
3	2	10	200
4	4	8	400
5	6	6	600
6	8	4	800
7	10	2	1000
8	12	0	1200

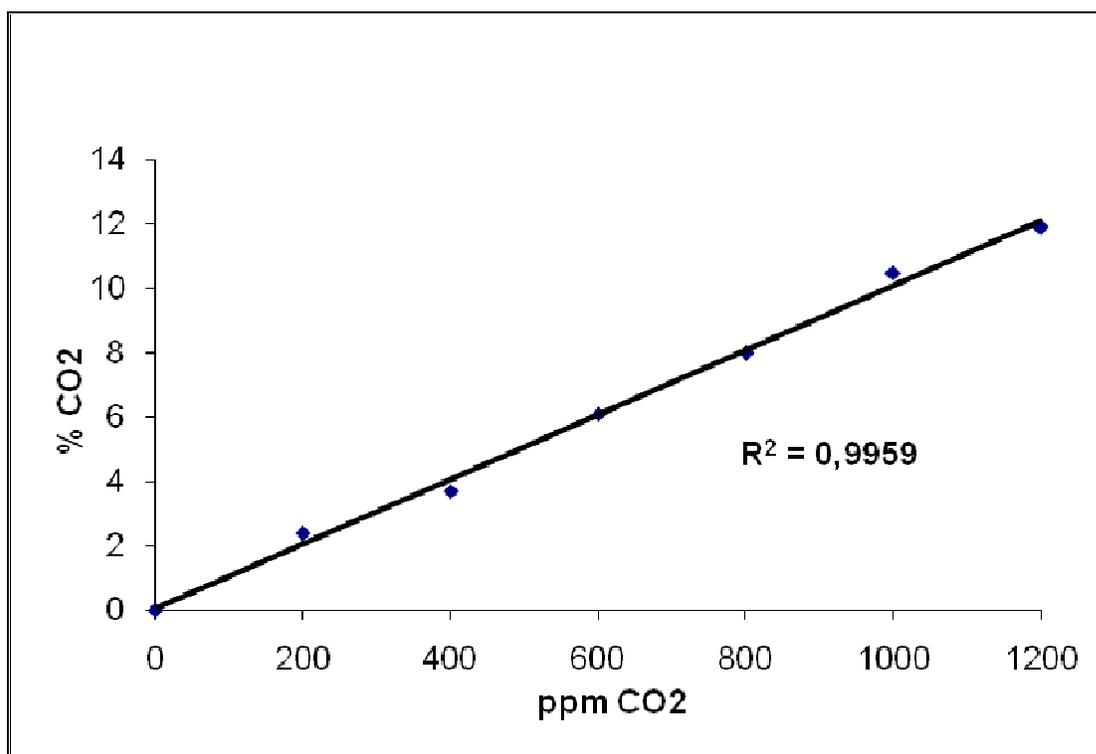


Figura 4.2. Curva padrão de CO₂ em leite ($y = 0,01x + 0,0643$)

4. MATERIAL E MÉTODOS

A concentração de CO₂ no queijo foi determinado através da curva padrão, conforme metodologia descrita por Nelson, Lynch e Barbano (2004b). Esta curva foi construída a partir do queijo controle, que corresponde ao ponto zero de calibração do equipamento, adicionado de NaHCO₃ (0,057M) e água ultra-pura degaseificada em diferentes proporções para obtenção de concentrações conhecidas de CO₂ (Tabela 4.3). A porcentagem de CO₂ foi obtida através da leitura no analisador de CO₂ (MOCON) após adição de H₂SO₄ e liberação do CO₂ dissolvido no queijo para o espaço livre dos frascos. A Figura 4.3 apresenta um exemplo de curva padrão de CO₂ em queijo. Para cada processamento foi determinada uma curva padrão para o queijo controle.

Tabela 4.3. Quantidade de solução padrão de bicarbonato de sódio e água ultra-pura degaseificada para a construção da curva padrão de CO₂ em queijo.

Amostra	Volume de bicarbonato de sódio (mL)	Volume de água (mL)	ppm de CO ₂
1	0	20	0
2	5	15	325
3	10	10	650
4	15	5	975
5	20	0	1300

4. MATERIAL E MÉTODOS

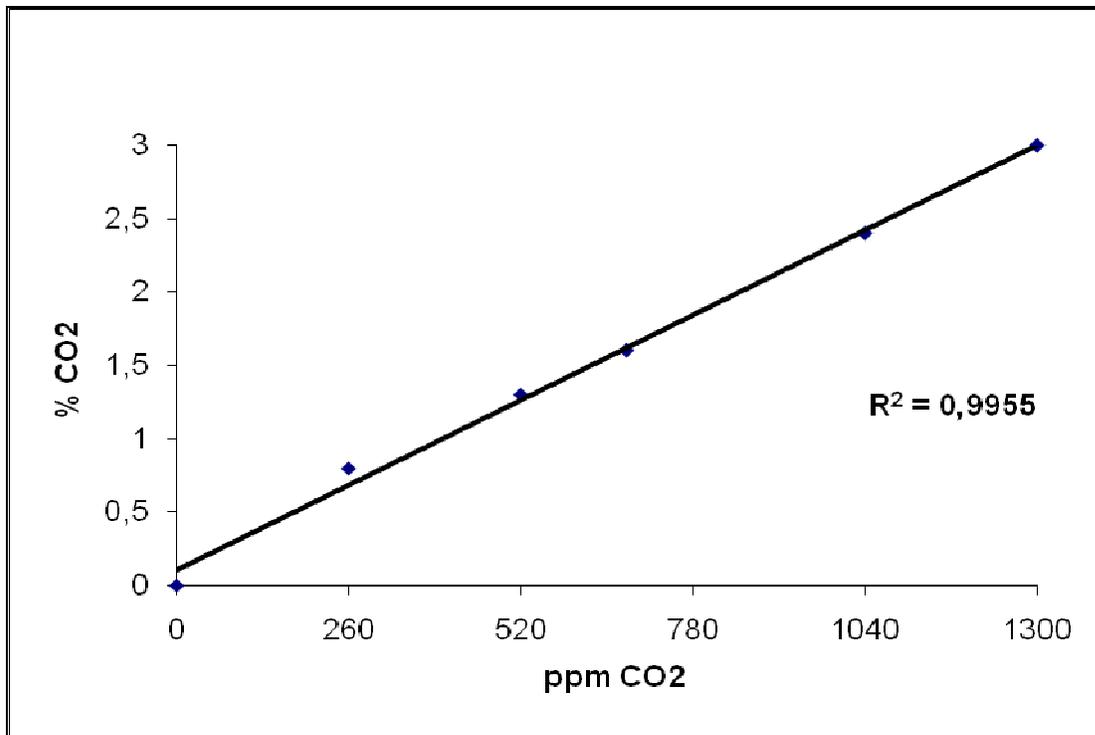


Figura 4.3. Curva padrão de CO₂ em queijo ($y = 0,0022x + 0,1011$)

4.4.3. Análises microbiológicas

Para realização das análises microbiológicas, os queijos foram escolhidos aleatoriamente. Fez-se a desinfecção da área externa da embalagem com etanol 70%, para remover os contaminantes presentes. Os queijos foram cortados em pequenas fatias e pesou-se 10 g da amostra em saco *Stomacher* para homogeneização das amostras. Adicionou-se 90 mL de citrato de sódio 2%, homogeneizou-se por 60 segundos e imediatamente utilizou-se para as análises microbiológicas. A partir desta diluição foram preparadas as diluições subseqüentes necessárias para a análise, utilizando o mesmo diluente. Todo material utilizado foi previamente esterilizado. As análises microbiológicas foram realizadas em câmara de fluxo laminar seguindo-se as seguintes metodologias:

4. MATERIAL E MÉTODOS

Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios: contagem pelo método de semeadura em profundidade, utilizando ágar padrão (PCA) e incubação a 35°C por 48 horas (APHA, 1992);

Bactérias lácticas: foi feita contagem em ágar MRS, pelo método de semeadura em profundidade e incubação das placas a 30°C por 72 h oras (APHA, 1992);

Bolores e leveduras: contagem pelo método de semeadura em superfície, utilizando ágar batata dextrose (PDA) acidificado (pH 3,5) com solução de ácido tartárico 10% e incubação a 25°C por 5 dias (APHA, 1992);

Psicrotróficos: contagem em ágar padrão (PCA), utilizando semeadura em superfície e incubação a 7°C por 10 dias (APHA, 1992);

***Pseudomonas* spp.:** contagem em ágar de isolamento de *Pseudomonas* (PIA), utilizando semeadura em superfície e incubação a 30°C por 24 horas (HAYES e NIELSEN, 2000);

Coliformes a 30-35°C e a 45°C: contagem pelo método do número mais provável (NMP) através das seguintes etapas: 1) Inoculação de 1,0 mL da amostra diluída em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e incubação por 48 horas a 35°C; 2) Transferência de uma alçada dos tubos com produção de gás para tubos contendo Caldo Bile Verde Brilhante (VB) e incubação a 35°C por 48 horas; 3) Transferência de uma alçada dos tubos com produção de gás para Caldo E. coli (EC) e incubação em banho-maria a 45,5°C por 24 horas (APHA, 1992);

Staphylococcus coagulase positiva: contagem em ágar Baird Parker (BP), pelo método de semeadura em superfície, incubando as placas a 35°C por 48 horas. A confirmação das colônias suspeitas foi feita através do teste de coloração de Gram e testes bioquímicos de catalase e coagulase (APHA, 2001);

Listeria monocytogenes: 1) Enriquecimento primário de 25 g da amostra em 225 mL de caldo LEB (Caldo para enriquecimento de *Listeria*) e incubação a 30°C; 2) Após 24 e 48 horas, inoculação do caldo LEB em caldo MFB (Caldo Fraser Modificado) e incubação a 35°C/24-48 horas; 3) Transferência de 1 alçada dos caldos para ágar LPM (ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactano) e para ágar Oxford (OXA); 4) Identificação das colônias através de coloração de Gram e pelos testes de catalase, β -hemólise em ágar sangue de cavalo, motilidade a 25°C em meio SIM e produção de ácido a partir da utilização de ramnose, manitol e xilose (WARBURTON, FARBER e BABIUK, 1991);

4. MATERIAL E MÉTODOS

Salmonella spp.: 1) Pré-enriquecimento de 25 g da amostra em 225 mL de água peptonada tamponada e incubação a 35°C/18-24 horas; 2) Enriquecimento seletivo em Caldo Tetrionato (TT) e em Caldo RV (Rappaport-Vassiliadis) e incubação a 35°C/18-24 horas e 42°C/18-24 horas, respectivamente; 3) Isolamento em ágar HE (Hektoen Entérico), ágar XLD (Xilose Lisina Desoxicolato) e para ágar Bismuto Sulfito (BS); 4) Identificação das colônias suspeitas em ágar Tríplice Açúcar e Ferro (TSI) e em ágar Lisina e Ferro (LIA) (APHA, 2001).

4.5. Planejamento Estatístico

O planejamento estatístico utilizado foi o Split-plot com três repetições, em um planejamento do tipo fatorial 3 x 5, em blocos completamente aleatorizados. O fator tratamento teve 3 níveis de variação (queijo com adição de cultura láctica (controle), queijo fabricado a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico e queijo fabricado a partir de leite acidificado através da adição de CO₂) e o fator tempo teve 5 níveis de variação (1, 7, 13, 19, 25 dias após a fabricação). Os processamentos foram considerados como blocos (processo 1, 2 e 3).

O efeito dos tratamentos sobre o rendimento e a composição físico-química foi analisado por análise de variância (ANOVA) de acordo com este delineamento. O efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação destes fatores foi analisado por análise de variância de dois fatores (ANOVA) e o Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância foi utilizado para comparação de médias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Leite cru e pasteurizado

As características físico-químicas e microbiológicas dos leites cru e pasteurizado são apresentadas na Tabela 5.1. A composição média dos leites encontra-se dentro dos limites preconizados pela legislação e literatura (JENNESS, 1988; BRASIL, 1996). Os leites apresentaram resultados satisfatórios em relação à composição físico-química e semelhantes às de outros trabalhos (CAMPOS, 2000; DORNELLAS, 1997; ROSSI, 1997).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5.1. Composição físico-química média, característica microbiológica e desvio padrão (n=3) do leite cru e pasteurizado

Determinações Analíticas	Leite cru	Leite pasteurizado
Análises físico-químicas		
pH	6,843 ± 0,006	6,81 ± 0,01
Acidez (°D)	15,7 ± 0,5	15,7 ± 0,6
Extrato seco total (%)	11,93 ± 0,04*	12,03 ± 0,09
Densidade a 15°C (g/L)	1,030 ± 0,001	----
Gordura (%)	3,43 ± 0,06	3,43 ± 0,06
Proteína bruta (%)	----	3,10 ± 0,02
Proteína verdadeira (%)	----	2,92 ± 0,03
Caseína (%)	----	2,49 ± 0,03
Caseína Intacta (%)	----	85 ± 1,1
Lactose (%)	----	4,84 ± 0,04
Cinzas (%)	----	0,72 ± 0,03
Fosfatase	Positiva	Negativa
Peroxidase	Positiva	Positiva
Análises microbiológicas		
Contagem Total (log UFC/ml)	5,48	2,43
Coliformes totais (NMP/ml)	----	4
Coliformes fecais (NMP/ml)	----	< 3

* Calculado pelo Disco de Arckermann.

Após pasteurização, o leite apresentou atividade de peroxidase e ausência de atividade de fosfatase, indicando a eficiência da pasteurização, o que resultou na redução de 3 ciclos logarítmicos, em média, na contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios.

Os resultados das análises de coliformes totais (30-35°C) e fecais (45°C) estão de acordo com a legislação, que estabelece contagem máxima de 4 NMP/mL para coliformes fecais em leite pasteurizado (BRASIL, 2001).

5.2. Efeito dos tratamentos sobre o processamento dos queijos

Observa-se na Figura 5.1 que o pH do leite, do queijo controle e dos queijos obtidos a partir do leite acidificado pela adição de ácido láctico ou CO₂ diferiram significativamente entre si durante o processo de fabricação. Como era esperado, o pH inicial diferiu devido à adição de ácido láctico ou dióxido de carbono ao leite, no início da fabricação dos queijos. O leite controle apresentou em média pH $6,83 \pm 0,01$, enquanto os leites acidificados com ácido láctico ou CO₂ apresentaram, em média, pH de $6,24 \pm 0,03$ e pH de $6,27 \pm 0,03$, respectivamente. Observa-se na Figura 5.1 que a diferença foi mantida durante o processamento, exceto na etapa de viragem dos queijos, na qual os valores de pH não apresentaram diferenças significativas. Nesta etapa, os queijos controle e obtidos a partir de leite acidificado com ácido láctico ou CO₂ apresentaram pH de $6,49 \pm 0,01$, $6,3 \pm 0,2$ e $6,4 \pm 0,1$, respectivamente. A redução do pH do queijo controle deveu-se à ação das bactérias lácticas adicionadas no início do processo de fabricação do queijo. Após 24 horas de armazenamento refrigerado ($5 \pm 1^{\circ}\text{C}$), o pH do queijo controle apresentou uma nova queda, atingindo valores de $5,77 \pm 0,21$, o qual diferiu significativamente do pH dos queijos fabricados a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico ou CO₂. Mais uma vez esta queda no pH está relacionada à atuação das bactérias lácticas no queijo controle.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

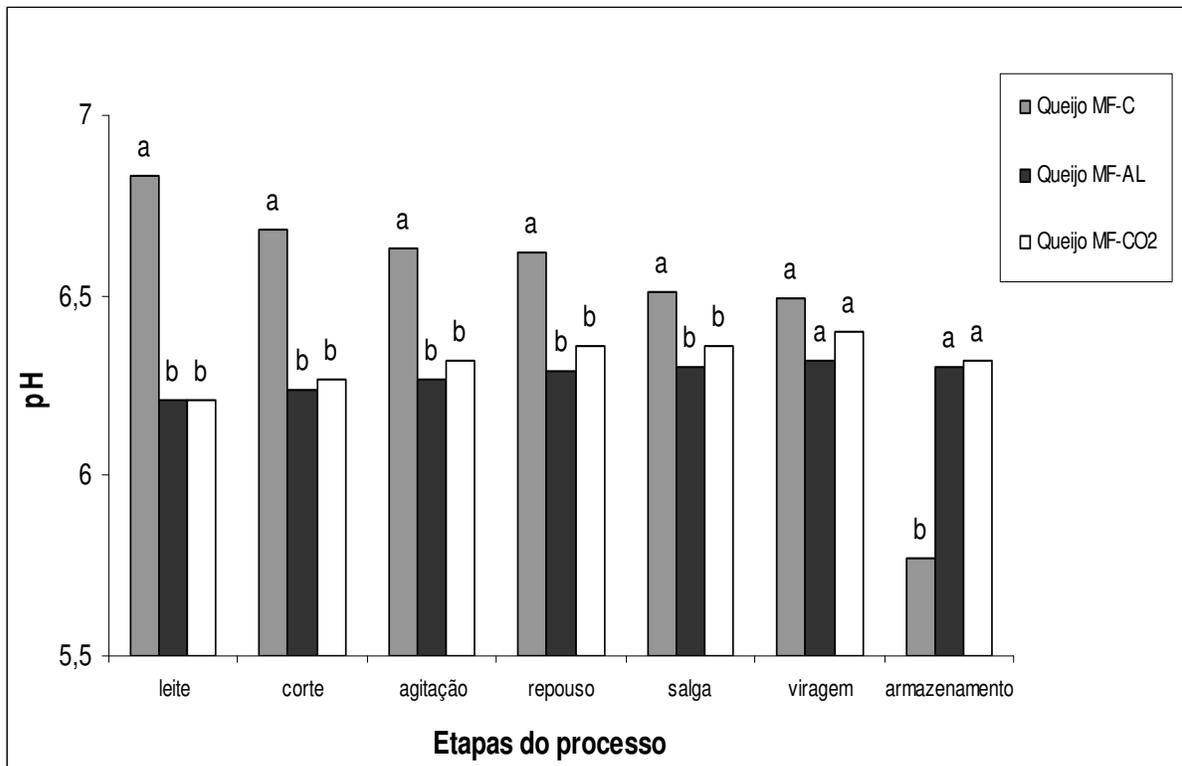


Figura 5.1. pH dos leites e comportamento do pH dos queijos Minas Frescal durante a fabricação (n=3).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa.

Cabe ainda destacar que o pH do queijo controle diminuiu durante o processo de fabricação, enquanto o pH dos queijos obtidos a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico ou CO₂ não variaram significativamente (Figura 5.2).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

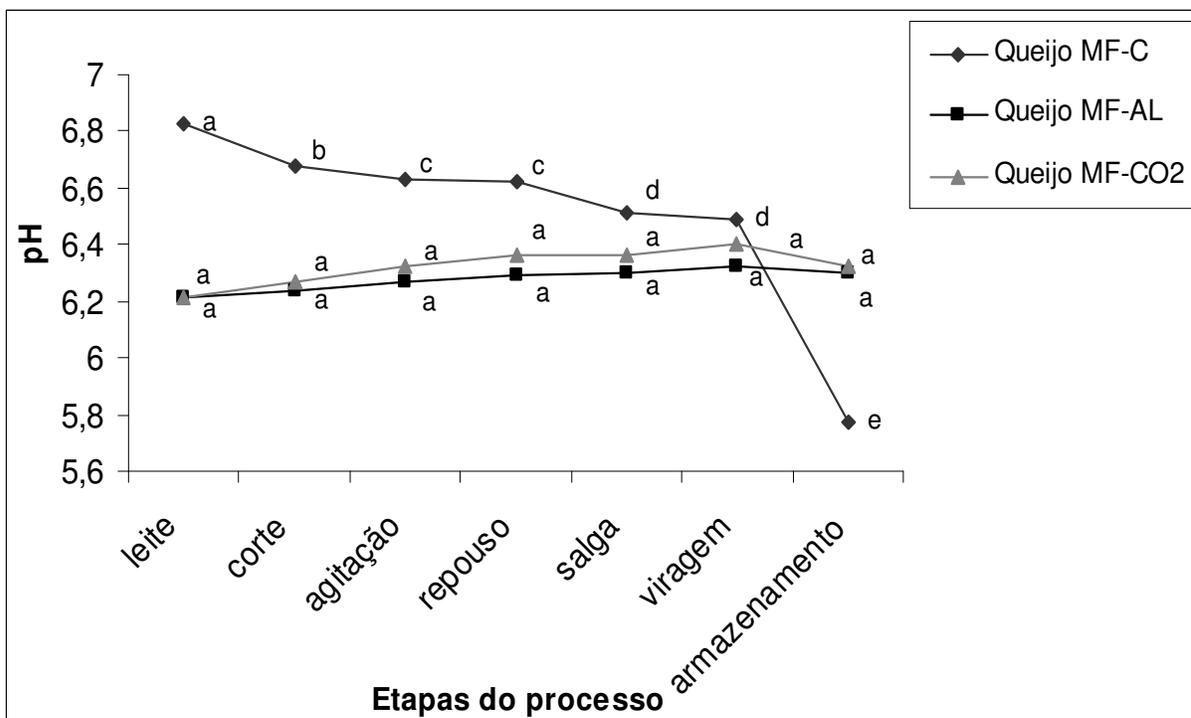


Figura 5.2. Valores de pH durante o processo de fabricação dos queijos Minas Frescal (n=3).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

O comportamento do pH é um fator determinante no processo de fabricação de queijos, sendo que seu abaixamento reduz o tempo necessário à coagulação, favorece a sinérese e a desmineralização da massa, podendo afetar a composição, as características funcionais e o desenvolvimento da microbiota dos queijos (FOX et al., 2000).

Observa-se na Tabela 5.2 que a acidificação através da adição de ácido láctico ou CO₂ não implicou em diferença significativa no tempo de coagulação do leite, que foi de $7,3 \pm 0,6$ e 7 ± 1 minuto. Entretanto, o tempo de coagulação para ambos os tratamentos foi significativamente menor quando comparado ao queijo controle (35 ± 1 minuto). O menor tempo de coagulação deveu-se ao melhor desempenho do coalho,

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

em meio ácido. Além disso, o menor pH favorece o aumento da velocidade de agregação micelar, aumentando a firmeza e a consistência do gel formado. Isto ocorre devido à reação de agregação micelar, conferida pela diminuição da estabilidade das micelas, por neutralização das cargas negativas e pela migração de fosfato de cálcio intramicelar para a fase aquosa, aumentando disponibilidade de íons cálcio em solução (FOX et al., 2000; WALSTRA et al., 1999).

Tabela 5.2. Efeito dos tratamentos sobre o tempo de coagulação dos leites

	Queijo MF-C*	Queijo MF-AL**	Queijo MF-CO ₂ ***	Valor de p
Tempo de coagulação (minutos)	35 ± 1 ^a	7,3 ± 0,6 ^b	7 ± 1 ^b	< 0,0001

* Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica;

** Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico;

*** Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

Neste trabalho, a redução de 0,6 unidades de pH (de aproximadamente 6,8 para leite controle para aproximadamente 6,2 para leite acidificado através da adição de ácido láctico ou CO₂) implicou na redução de 80% do tempo de coagulação. A redução do tempo de coagulação após acidificação do leite foi também observada por outros autores. Calvo, Montilla e Olano (1993) verificaram redução do tempo de coagulação de 80% em queijos espanhóis de coagulação enzimática fabricados com leite pasteurizado. Os autores abaixaram o pH do leite de 6,65 para 6,0 e obtiveram o mesmo tempo de coagulação deste trabalho. Redução de 60% no tempo de coagulação foi observada por Ruas-Madiedo et al. (2002) na fabricação de queijo Espanhol duro, após a redução de 0,5 unidades de pH obtida através da adição de CO₂ ao leite. A redução de aproximadamente 11% no tempo de coagulação foi observada por Nelson, Lynch e Barbano (2004a), na fabricação de queijo Cheddar, após redução do pH do leite de 6,65 para 5,93.

5.3. Efeito dos tratamentos sobre a composição dos queijos e dos soros

As Tabelas 5.3 e 5.4 apresentam respectivamente a composição físico-química dos queijos e dos soros obtidos a partir dos queijos controle e dos leites acidificados através da adição de ácido láctico ou CO₂. Observa-se na Tabela 5.3 que os tratamentos afetaram significativamente o pH e os teores de umidade, gordura, cinzas e sal por umidade dos queijos. Os demais parâmetros não foram significativamente afetados pelos tratamentos.

Tabela 5.3. Composição físico-química, desvio padrão e valor de *p* dos queijos (n=3).

Características	Queijo MF-C*	Queijo MF-AL**	Queijo MF-CO ₂ ***	Valor de <i>p</i>
pH	5,77 ± 0,24 ^b	6,30 ± 0,07 ^a	6,32 ± 0,15 ^a	< 0,0001
Umidade (%)	63,02 ± 0,20 ^a	57,44 ± 0,05 ^b	57,62 ± 0,4 ^b	< 0,0001
Gordura (%)	19,10 ± 1,8 ^b	22,9 ± 0,8 ^a	22,67 ± 0,6 ^a	< 0,0001
Sal (%)	1,54 ± 0,04	1,54 ± 0,04	1,59 ± 0,01	0,1484
Sal/umidade (%)	2,44 ± 0,02 ^b	2,68 ± 0,03 ^a	2,76 ± 0,02 ^a	< 0,0001
Proteína verdadeira (%)	14,67 ± 0,42	14,85 ± 0,28	14,66 ± 0,15	0,6684
Caseína (%)	14,18 ± 0,28	14,34 ± 0,35	14,13 ± 0,17	0,6559
Caseína Intacta (%)	96,72 ± 0,83	96,57 ± 0,50	96,39 ± 0,21	0,7933
Cinzas (%)	3,25 ± 0,12 ^a	2,66 ± 0,16 ^b	2,76 ± 0,06 ^b	< 0,0001

* Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica;

** Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico;

*** Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (*p* ≤ 0,05).

Após 24 horas de armazenamento refrigerado, o queijo controle apresentou pH menor (5,77) que os queijos obtidos a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico (6,30) ou CO₂ (6,32), os quais não diferiram significativamente entre si. Esta diferença de pH deveu-se à ação das bactérias lácticas que degradam a lactose residual do queijo diminuindo seu pH nas primeiras horas de armazenamento. Estes valores de pH estão muito próximos dos considerados padrões para queijo Minas

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Frescal, que são, segundo Furtado e Lourenço Neto (1994), 6,1-6,3 para o queijo fabricado com adição de ácido láctico. No processo de fabricação, o CO₂ possui um papel semelhante ao do ácido láctico, pois ele se dissolve no leite e forma ácido carbônico na fase aquosa (BUTLER, 1982). Diferenças de pH em queijos Minas Frescal também foram observadas por Campos (2000), em que os queijos fabricados com adição de 0,1% e 0,5% de fermento láctico apresentaram pH de 6,28 e 6,16, respectivamente, enquanto o queijo fabricado sem adição de fermento, apresentou pH de 6,37. Dornellas (1997) também observou que o pH dos queijos Minas Frescal fabricados com fermento láctico e com ácido láctico diferiram entre si. O queijo adicionado de ácido láctico apresentou pH de 6,34 e o queijo com adição de fermento láctico de 5,50, valores estes muito próximos aos observados neste trabalho.

Tabela 5.4. Composição físico-química, desvio padrão e valor de *p* dos soros dos queijos controle, com adição de ácido láctico e com adição de CO₂ (n=3).

Características	Soro controle	Soro AL	Soro CO₂	Valor de <i>p</i>
pH	6,54 ± 0,06 ^a	6,25 ± 0,04 ^b	6,43 ± 0,03 ^a	0,0005
Acidez (°D)	12,1 ± 0,8 ^c	16,2 ± 0,8 ^a	15 ± 1,5 ^b	< 0,0001
Extrato seco total (%)	7,18 ± 0,03 ^a	6,84 ± 0,06 ^b	6,81 ± 0,04 ^b	< 0,0001
Gordura (%)	0,91 ± 0,06 ^a	0,60 ± 0,01 ^b	0,56 ± 0,02 ^b	< 0,0001
Lactose (%)	4,7 ± 0,1	4,57 ± 0,07	4,46 ± 0,06	0,0703
Proteína verdadeira (%)	1,09 ± 0,09	1,1 ± 0,1	1,08 ± 0,09	0,7227
Caseína (%)	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,38 ± 0,20	0,9530
Cinzas (%)	0,50 ± 0,03	0,51 ± 0,05	0,46 ± 0,06	0,4960

^{a, b} Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

Observa-se na Tabela 5.4 que o pH do soro obtido no processamento do queijo Minas Frescal fabricado por acidificação do leite com ácido láctico foi significativamente menor que o pH do soro dos outros dois tratamentos, os quais não diferiram significativamente entre si. Esta característica pode ser considerada uma vantagem do ponto de vista tecnológico quando se visa o aproveitamento deste subproduto. Durante o processamento, com a agitação da massa (coágulo + soro) no

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

tanque de fabricação aberto, há perdas de CO₂ para a atmosfera (CHAMPAGNE, ST-GELAIS e CANDOLLE, 1998), e o soro obtido não difere do soro do queijo controle quanto ao pH. No que diz respeito à acidez titulável, os soros dos três tratamentos diferiram significativamente entre si, apresentado maior e menor acidez os soros obtidos a partir da fabricação do queijo com leite acidificado através da adição de ácido láctico e adicionado de cultura láctica, respectivamente. A acidez conferida pelo CO₂, ao soro, pode ser eliminada por agitação e aquecimento do soro.

O queijo controle apresentou maior umidade (63,02%) que os obtidos a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico (57,44%) ou CO₂ (57,62%), os quais não diferiram significativamente entre si. Além disso, o queijo controle apresentou umidade superior à considerada padrão para queijo Minas Frescal que é, segundo Furtado e Lourenço Neto (1994), 55-58% de umidade. Naldini (2002) também encontrou teores de umidade do queijo fabricado por acidificação do leite com ácido láctico menores do que os teores do queijo fabricado com adição de fermento. O queijo fabricado a partir de leite adicionado de ácido láctico apresentou 60,44% de umidade, enquanto no fabricado com fermento foi de 62,89%.

O menor teor de umidade dos queijos obtidos a partir do leite pré-acidificado deveu-se à maior sinérese do coágulo no tanque de fabricação, a qual é grandemente governada pelo pH do sistema. Observa-se na Figura 5.1 que o pH do queijo controle foi significativamente maior que o dos outros dois tratamentos durante praticamente todo o processamento. Acredita-se que o menor pH no tanque de fabricação favoreceu as interações protéicas, o que promoveu maior contração do coágulo, maior liberação de soro e, conseqüentemente, a obtenção de queijos com menor teor de umidade (McMAHON, PAULSON e OBERG, 2005). Paralelamente, observa-se na Tabela 5.4 que os soros obtidos a partir do processamento dos leites acidificados através da adição de ácido láctico ou CO₂ apresentaram significativamente menores teores de extrato seco total quando comparados ao queijo controle.

Outro fenômeno governado pelo pH da massa é o teor de minerais dos queijos. É amplamente reconhecido na literatura que a redução do pH durante o processo de fabricação causa a desmineralização das micelas de caseína

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

(McMAHON, PAULSON e OBERG, 2005; LUCEY e FOX, 1993). Embora neste trabalho não se tenha determinado o teor de minerais específicos, pode-se avaliar este comportamento através do teor de cinzas nos queijos. O queijo controle, cujo pH permaneceu mais alto durante o processo de fabricação (Figuras 5.1 e 5.2) apresentou também teor de cinzas (3,25%) significativamente maior que os queijos obtidos a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico (2,66%) e CO₂ (2,76%), os quais não diferiram significativamente entre si. Esta diferença no teor de cinzas dos queijos não se refletiu nos soros. Observa-se na Tabela 5.4 que os teores de cinzas dos soros não diferiram significativamente entre si.

Observa-se na Tabela 5.3 que o queijo controle apresentou teor de gordura significativamente menor (19,10%) que dos queijos obtidos a partir de leite acidificado através de adição de ácido láctico (22,9%) ou CO₂ (22,67%), os quais não apresentaram diferenças entre si. O teor de gordura do queijo controle encontra-se dentro da faixa de esperada para este tipo de queijo, que é de 17-19%, enquanto os queijos dos outros dois tratamentos apresentaram teor de gordura superior. Variação no teor de gordura foi também observada em relação aos soros obtidos. Observa-se na Tabela 5.4 que o soro obtido a partir da fabricação do queijo controle apresentou significativamente maior teor de gordura (0,91%) que os obtidos pelo processamento do leite acidificado com ácido láctico (0,60%) ou CO₂ (0,56%), os quais não diferiram entre si.

Um menor teor de gordura em queijos fabricados com adição de fermento láctico também foi observado no trabalho de Campos (2000), em que os queijos Minas Frescal fabricados com adição de fermento láctico (0,1% e 0,5%) apresentaram uma tendência a menores valores de gordura, 21,83% e 21,92%, respectivamente, do que o queijo fabricado por acidificação com ácido láctico, apresentando um valor de 22,67%. Em relação aos soros destes queijos, observou-se um comportamento semelhante nos teores de gordura quando comparado com os nossos dados. O soro do queijo com maior porcentagem de fermento láctico apresentou um maior teor de gordura, 0,36%, enquanto o soro do queijo sem adição de fermento láctico apresentou um valor menor, 0,30%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de sal dos queijos (Tabela 5.3) não variaram significativamente entre si, entretanto, o queijo controle apresentou porcentagem de sal/umidade significativamente menor do que os queijos obtidos a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico ou CO₂, os quais não diferiram entre si.

Na Tabela 5.4, pode-se perceber que os teores de lactose, proteína verdadeira, caseína, relação caseína/proteína verdadeira e cinzas dos soros não diferiram significativamente entre si. Os resultados médios do soro controle apresentaram valores semelhantes aos dos soros dos trabalhos de Rossi (1997) e Dornellas (1997).

O teor de gordura do soro controle foi maior do que o teor do soro com ácido láctico ou CO₂. Este valor maior de gordura foi devido à coalhada menos firme do queijo controle, que retêm menos elementos do queijo. Esta perda de gordura para o soro interferiu no seu valor do extrato seco total, que foi maior que dos outros soros.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4. Efeito dos tratamentos sobre a recuperação dos constituintes do leite e o rendimento dos queijos

As Figuras 5.3 e 5.4 apresentam a recuperação de proteína e de gordura para o queijo e para o soro em cada tratamento.

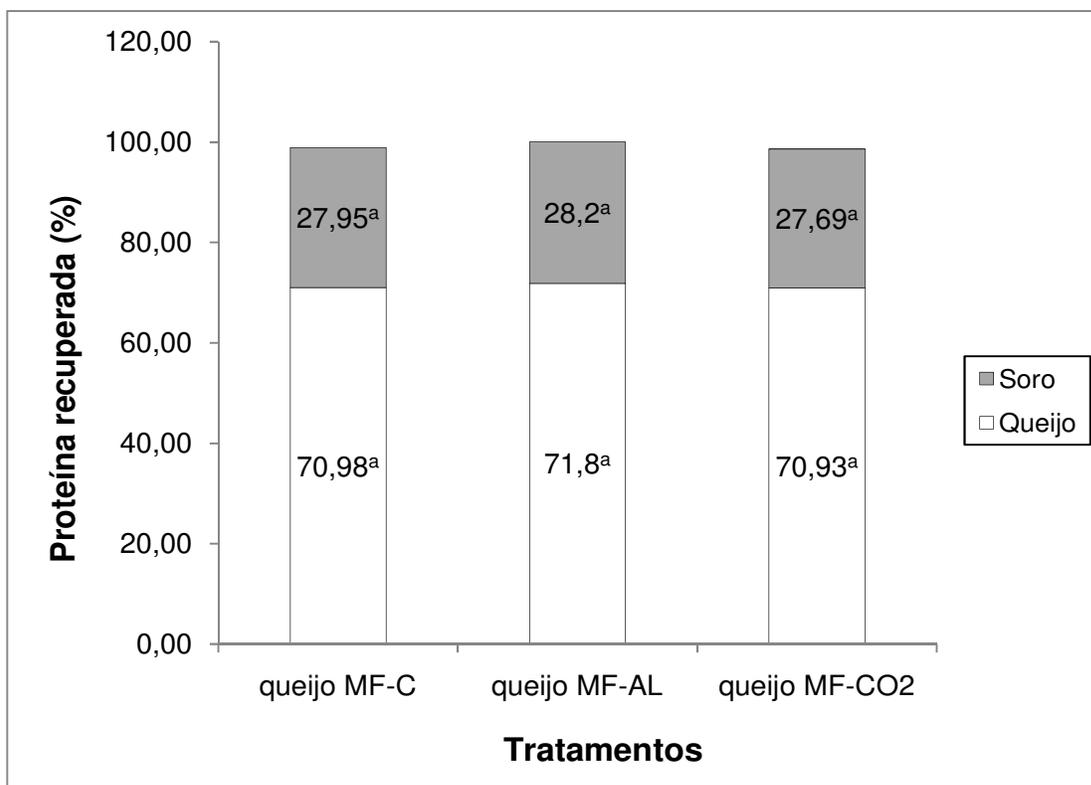


Figura 5.3. Recuperação de proteína para o queijo e o soro para cada tratamento (n=3).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

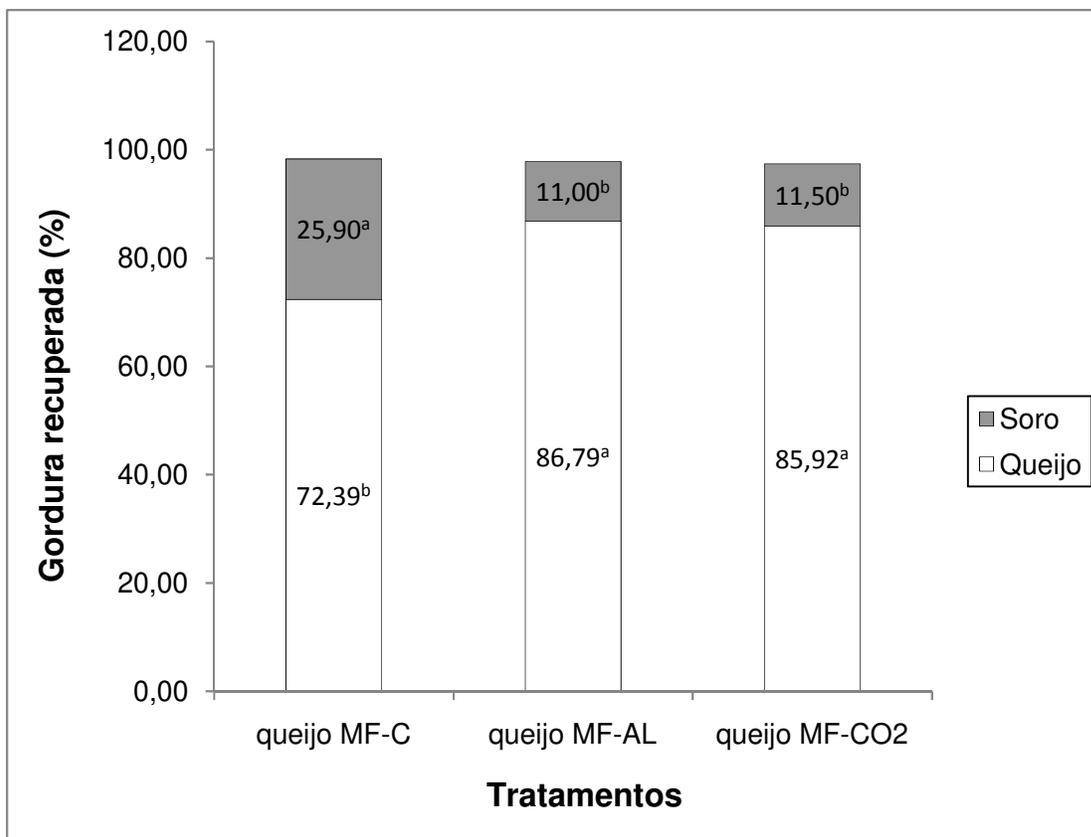


Figura 5.4. Recuperação de gordura para o queijo e o soro para cada tratamento (n=3).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

Os tratamentos não afetaram significativamente a recuperação de proteína do leite para os queijos e para os soros. Os valores encontrados apresentaram em média um valor de 71,26% de proteína recuperada, para valores médios de 3,1% de proteína no leite, estando de acordo com os resultados médios de proteína dos queijos (14,73%) (Tabela 5.3), os quais não variaram entre si. Neves-Souza e Silva (2005) também encontraram valores semelhantes para a recuperação de proteína do leite em queijos Minas Frescal. Os autores obtiveram, em média, 72,33% e 73,00% de proteína recuperada do leite para os queijos fabricados com coalho bovino e coalho microbiano, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos afetaram significativamente a recuperação de gordura do leite para os queijos e para os soros. O queijo controle apresentou uma recuperação de gordura menor do que os outros queijos (72,39%). Isto ocorreu devido ao pH de coagulação deste queijo (6,83), que foi maior do que nos outros tratamentos (6,21). O pH mais alto do queijo controle contribuiu para uma coalhada mais frágil e uma estrutura mais aberta. Já os queijos fabricados com leite acidificado apresentaram uma massa mais compacta, devido às maiores interações protéicas em sua estrutura, aprisionando, assim, quantidades maiores de gordura.

A cifra de transição de gordura do queijo Minas Frescal processado com coalho bovino, no trabalho de Neves-Souza e Silva (2005) está de acordo com os valores dos queijos Minas Frescal deste trabalho, fabricados por acidificação do leite com ácido láctico ou CO₂. O valor encontrado pelos autores foi 85,33% de recuperação de gordura do leite para o queijo, e os valores dos queijos Minas Frescal acidificados com ácido láctico ou CO₂ foram 86,79% e 85,95%, respectivamente.

No estudo desenvolvido por Saboya et al. (1998), os autores fabricaram queijo Minas Frescal com coalho bovino e cultura láctica e encontraram valores de 92,29% para recuperação de gordura do leite para os queijos. Estes autores relataram uma menor perda da quantidade de gordura no soro (0,3%) em queijos fabricados com leite com 3,24% de gordura, ao passo que no presente trabalho perdeu-se em média 0,6% e 0,56% de gordura nos soros dos queijos fabricados com leite acidificado com ácido láctico ou CO₂, respectivamente, sendo que o leite utilizado nos processamentos apresentou, em média, 3,43% de gordura. O queijo controle, porém, apresentou um valor baixo de recuperação de gordura devido a uma maior perda da quantidade de gordura no soro (0,91%).

St-Gelais, Champagne e Bélanger (1997) também observaram uma menor perda da quantidade de gordura no soro dos queijos fabricados por acidificação do leite com ácido láctico ou com CO₂. Os autores afirmam que a atividade da quimosina é maior em baixo pH, e, conseqüentemente, ocorre maior retenção de gordura nestes

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

queijos, devido à melhor formação de uma rede protéica durante a formação do coágulo, aprisionando maior quantidade de gordura.

A Tabela 5.5 apresenta os resultados do rendimento, rendimento ajustado e rendimento em base seca dos queijos Minas Frescal.

Tabela 5.5. Rendimento queijeiro e desvio padrão dos processos (n=3).

	Queijo MF-C*	Queijo MF-AL**	Queijo MF-CO ₂ ***	Valor de p
Rendimento	18 ± 1,7 ^a	16 ± 1,7 ^a	16 ± 2,0 ^a	0,1817
Rendimento ajustado	16 ± 1,5 ^a	16 ± 1,6 ^a	15 ± 1,9 ^a	0,2259
Rendimento base seca	56 ± 5,2 ^a	56 ± 5,5 ^a	56 ± 6,5 ^a	0,9843

*Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle

**Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado com ácido láctico

***Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado com CO₂

^{a,b} Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (p ≤ 0,05).

Apesar da menor recuperação de gordura para o queijo controle, observa-se que isto não se traduziu em menor rendimento dos queijos. Conforme Tabela 5.5, os tratamentos não afetaram significativamente os rendimentos dos diferentes queijos. Outros autores também observaram este mesmo comportamento (RUAS-MADIEDO et al., 1998a; 2002; MCCARNEY, MULLAN e ROWE, 1995 e ST-GELAIS, CHAMPAGNE e BÉLANGER, 1997), não encontrando diferenças significativas entre os rendimentos dos queijos controle e dos queijos fabricados com leite acidificado com dióxido de carbono.

Assim como neste trabalho, McCarney, Mullan e Rowe (1995), não observaram diferenças significativas nos rendimentos de queijos Cheddar, produzidos com e sem adição de dióxido de carbono nos leites. Após 2 dias de armazenamento refrigerado, o rendimento do queijo controle foi 9,10% e do queijo obtido por acidificação do leite com CO₂ foi 8,81%. St-Gelais, Champagne e Bélanger (1997) também não obtiveram diferenças entre os rendimentos dos queijos Cheddar controle e dos produzidos com

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

adição ácido láctico e de CO₂ ao leite, apresentando resultados de 9,85%, 9,90% e 9,60%, respectivamente. Após 3 dias de armazenamento refrigerado dos queijos espanhóis de coagulação ácida e rápida maturação, Ruas-Madiedo et al. (1998a), encontraram valores de rendimento de 16,77% e 17,69% para queijos controle e obtidos por acidificação do leite com CO₂, respectivamente, não observando diferenças significativas neste resultado.

Calvo, Montilla e Olano (1993) e Uceda et al. (1994) observaram um aumento do rendimento dos queijos espanhóis e Manchego, respectivamente, adicionados de CO₂ nos leites crus, devido à ação deste gás sobre a inibição dos microrganismos psicotróficos, que podem atuar no leite refrigerado. Estes microrganismos diminuem o rendimento dos queijos, através da atuação das enzimas proteolíticas e lipolíticas que sobrevivem à pasteurização do leite.

O rendimento depende da transição dos componentes sólidos do leite para o queijo, especialmente, proteína e gordura (LUCEY e KELLY, 1994). Os resultados deste trabalho sugerem que os tratamentos realizados no leite, e, conseqüentemente, as diferenças no pH durante o processo de fabricação, podem influenciar na recuperação de gordura do leite para os queijos, não comprometendo o rendimento. O pH do queijo controle apresentou valores de 6,8 a 6,5 durante o processo de fabricação, enquanto que o pH dos queijos fabricados por acidificação do leite com ácido láctico ou com CO₂, mantiveram-se constantes, apresentando valores de 6,3 a 6,2 (Figura 5.1). Estes valores podem alterar a estrutura do coágulo, retendo mais componentes do leite no queijo. Barbano e Rasmussen (1992) afirmam que a retenção de gordura na massa é mecânica, associada à estrutura do coágulo. Como o ácido láctico e o CO₂ diminuem o pH do leite, conseqüentemente, ocorre a contração da massa e, possivelmente, maior retenção de gordura no coágulo.

5.5. Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre as características físico-químicas do queijo Minas Frescal

A Tabela 5.6 apresenta a ANOVA para o efeito do tratamento, do tempo de armazenamento refrigerado, e da interação destes fatores sobre o pH, porcentagem

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

de CO₂ e proteólise dos queijos, que foi representado como índice de extensão de proteólise (IEP) e índice de profundidade de proteólise (IPP).

Tabela 5.6. Valores de *p*-valor demonstrando o efeito dos tratamentos, do tempo e da interação tratamento X tempo sobre pH, % CO₂, índices de extensão e profundidade de proteólise dos queijos (n=3).

	GL	Valores de <i>p</i>			
		pH	% CO ₂	IEP	IPP
Tratamento	2	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Tempo	4	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Tratamento X Tempo	8	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Observa-se na Tabela 5.6 que os tratamentos e o tempo de armazenamento refrigerado afetaram significativamente o pH, a porcentagem de CO₂ e os índices de extensão e profundidade de proteólise dos queijos. Verificou-se também uma interação significativa entre o tratamento e o tempo de armazenamento para as respostas avaliadas.

Os tratamentos afetaram significativamente o pH dos queijos (Figura 5.5). O queijo controle apresentou um pH menor, pois este leite foi adicionado de bactérias lácticas, o que não ocorreu com os queijos fabricados com leite acidificado com adição de ácido láctico ou CO₂. O pH dos queijos foi significativamente afetado pela interação tratamento X tempo. Observa-se na Figura 5.6, que apresenta o efeito do tempo de armazenamento sobre o pH dos queijos Minas Frescal, que os três queijos diferiram significativamente entre si. Todos os pH dos queijos diminuíram ao longo do tempo, porém, esta queda foi mais acentuada no queijo controle, devido à adição das bactérias lácticas neste leite.

Um comportamento semelhante ao observado neste trabalho pode ser observado por Montilla, Calvo e Olano (1995). Os autores fabricaram queijos Ibérico com adição de HCl e com adição de dióxido de carbono no leite e observaram que os

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

dois queijos apresentaram maiores valores de pH durante a maturação, em comparação aos valores de pH do queijo controle (sem adição de cultura láctica, ácido ou CO₂).

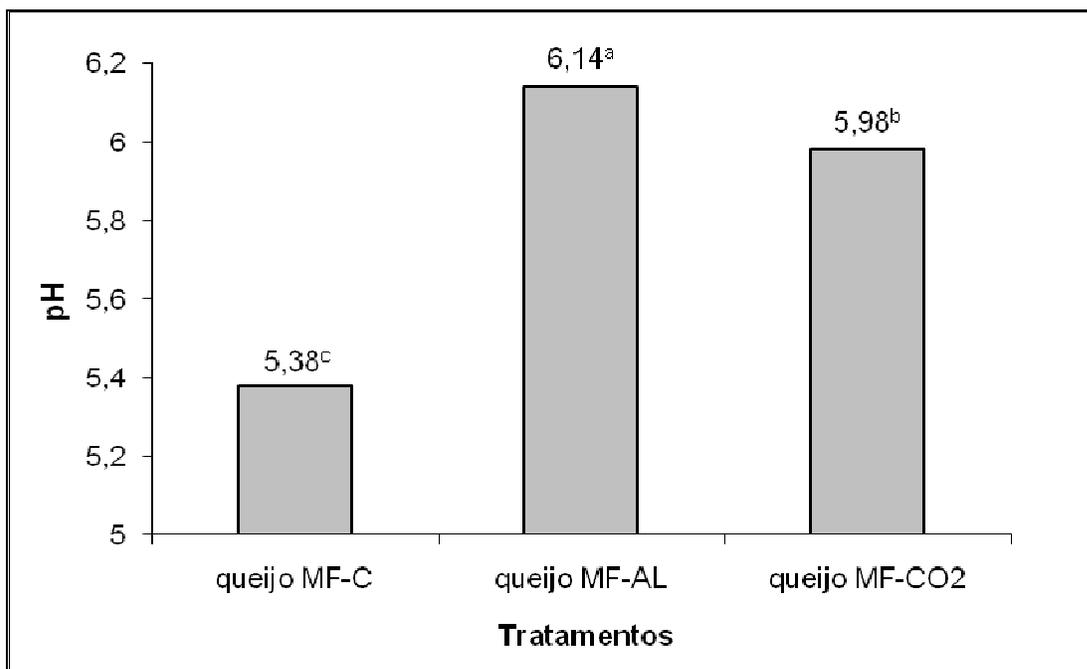


Figura 5.5. Efeito dos tratamentos sobre o pH dos queijos Minas Frescal

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

O pH dos queijos fabricados sem fermento mantiveram-se maiores durante a vida de prateleira do queijo Minas Frescal, sendo que o queijo fabricado por acidificação com ácido láctico iniciou com um valor de pH de 6,30 e finalizou com 5,95. Já o queijo com adição de CO₂ iniciou com um valor de 6,32 e apresentou uma queda no 19º dia de armazenamento (5,54) (Figura 5.6), provavelmente, devido à atuação de microrganismos contaminantes no produto. Na Tabela 5.9, observa-se uma alta contagem de coliformes a 30-35°C no queijo fabricado por acidificação do

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

leite com CO₂ já no 13º dia de armazenamento refrigerado. A atuação destes microrganismos neste queijo contribuiu para o abaixamento de pH, devido à fermentação da lactose, formando ácido láctico.

O queijo controle apresentou menor pH devido à ação das bactérias lácticas, inicialmente adicionadas no leite, que degradam a lactose, formando ácido láctico. O valor inicial do pH deste queijo foi de 5,77 e no 25º dia apresentou um valor de 5,15. A diminuição do pH em queijos adicionados de cultura láctica também pôde ser observado nos trabalhos de Wolfschoon-Pombo, Furtado e Munck (1978), Isepon e Oliveira (1995) e Van Dender e Moreno (1992). Os queijos com adição de fermento láctico tornaram-se mais ácidos durante o período de estocagem, provocando uma maior desmineralização protéica do produto.

Naldini (2002) também observou maior pH durante a vida de prateleira dos queijos Minas Frescal fabricados por acidificação direta (6,45 no 1º dia e 5,42 no 18º dia) do que os queijos fabricados pelo método convencional (com adição de fermento láctico) (5,31 no 1º dia e 4,58 no 18º dia). Assim como Silva et al. (2003), que observaram uma diminuição maior do pH dos queijos fabricados com adição de fermento láctico. O pH no final do tempo de armazenamento destes queijos (5,3-4,9) estão de acordo com os valores deste trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

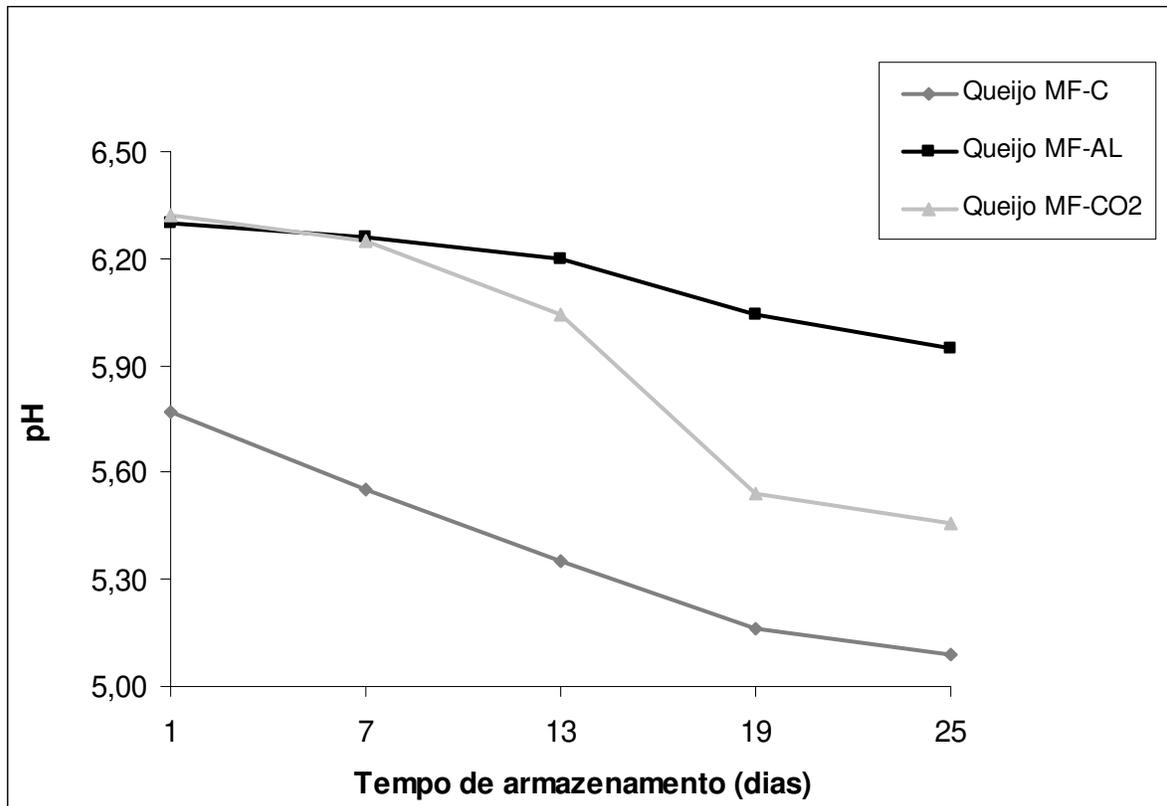


Figura 5.6. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre o pH dos queijos Minas Frescal (n=3).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

Observa-se nas Figuras 5.7 e 5.8 que os tratamentos afetaram significativamente os índices de extensão e profundidade de proteólise dos queijos. O queijo controle apresentou maiores índices de extensão (%nitrogênio solúvel em pH 4,6/ %nitrogênio total) e profundidade (%nitrogênio solúvel em TCA/ %nitrogênio total) de proteólise durante a sua vida de prateleira; já os queijos obtidos por acidificação do leite com ácido láctico ou com CO₂ apresentaram valores menores para estes parâmetros.

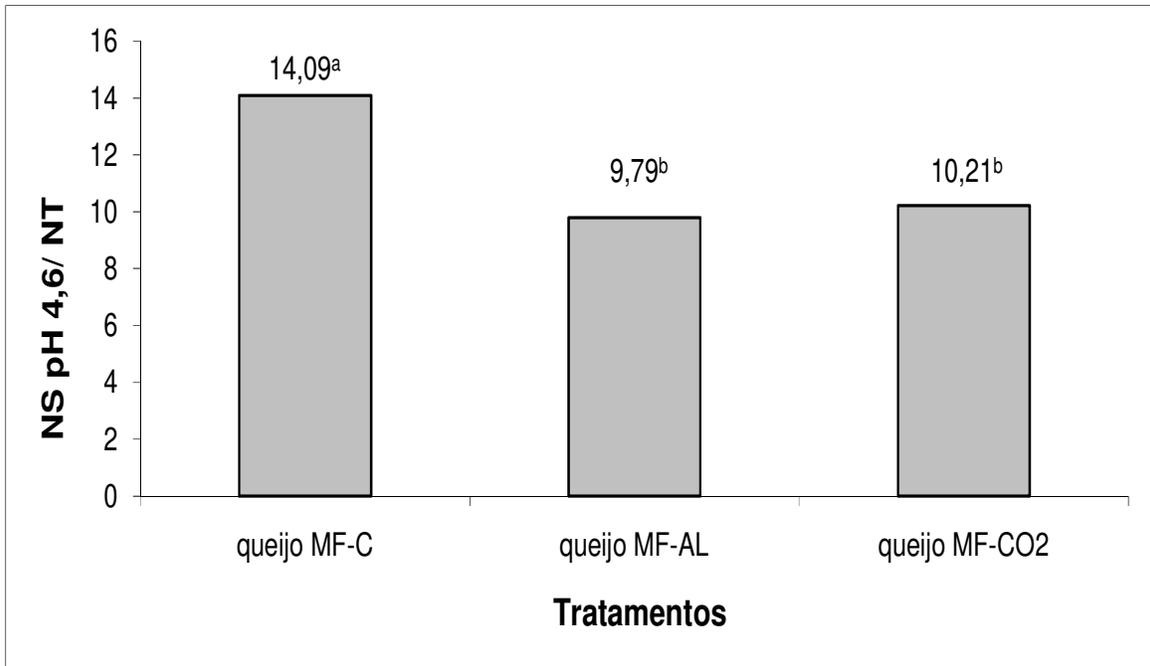


Figura 5.7. Efeito dos tratamentos sobre o índice de extensão de proteólise dos queijos Minas Frescal

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

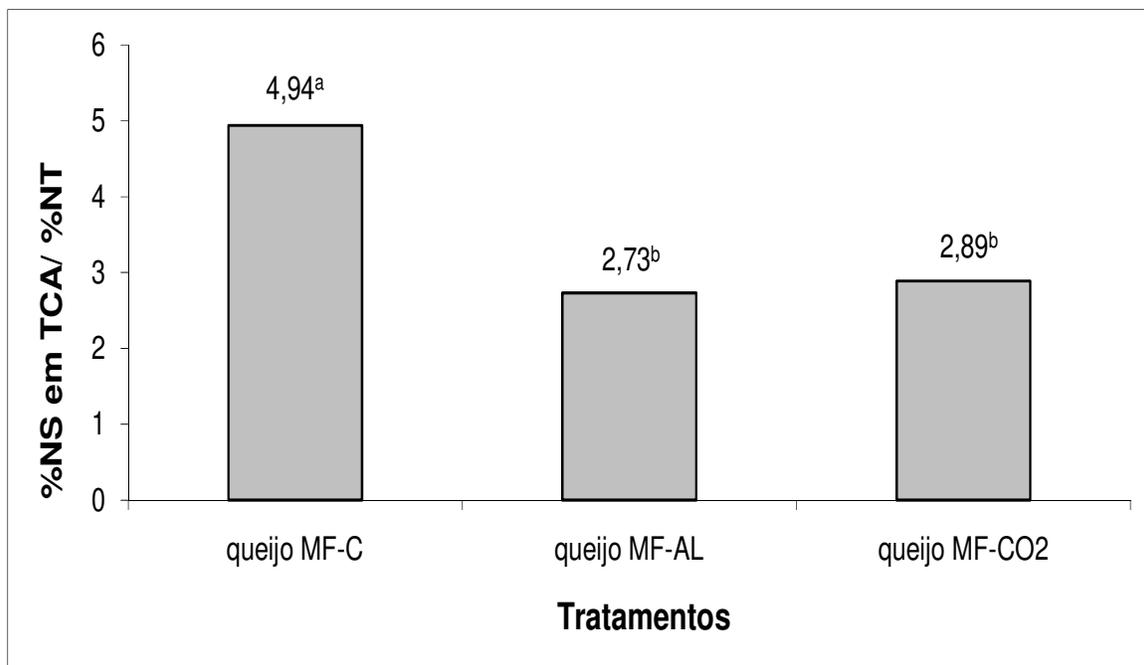


Figura 5.8. Efeito dos tratamentos sobre o índice de profundidade de proteólise dos queijos Minas Frescal

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

A proteólise primária é expressa como a porcentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 sobre a porcentagem de nitrogênio total. A extensão é um fator indicativo da proteólise primária. A proteólise primária dos três queijos aumentou significativamente com tempo de armazenamento refrigerado (Figura 5.9). Esta proteólise foi mais acentuada no queijo controle até o 7^o dia, do que nos queijos obtidos a partir da acidificação do leite com ácido láctico ou CO₂. O alto nível de nitrogênio solúvel em pH 4,6 sobre a porcentagem de nitrogênio total encontrado para o queijo controle (14,09%), deve estar relacionado à alta umidade deste queijo. Maiores teores de água favorecem as reações enzimáticas, entre elas a ação hidrolítica da quimosina, que é o principal responsável pela proteólise primária em queijo Minas. Os queijos obtidos por leites acidificados com ácido láctico ou com CO₂ também apresentaram aumento da proteólise com o tempo de armazenamento. Esta proteólise pode estar relacionada ao

pH mais alto destes queijos, que favorece a ação da plasmina sobre a β - e a α_{s2} -caseína.

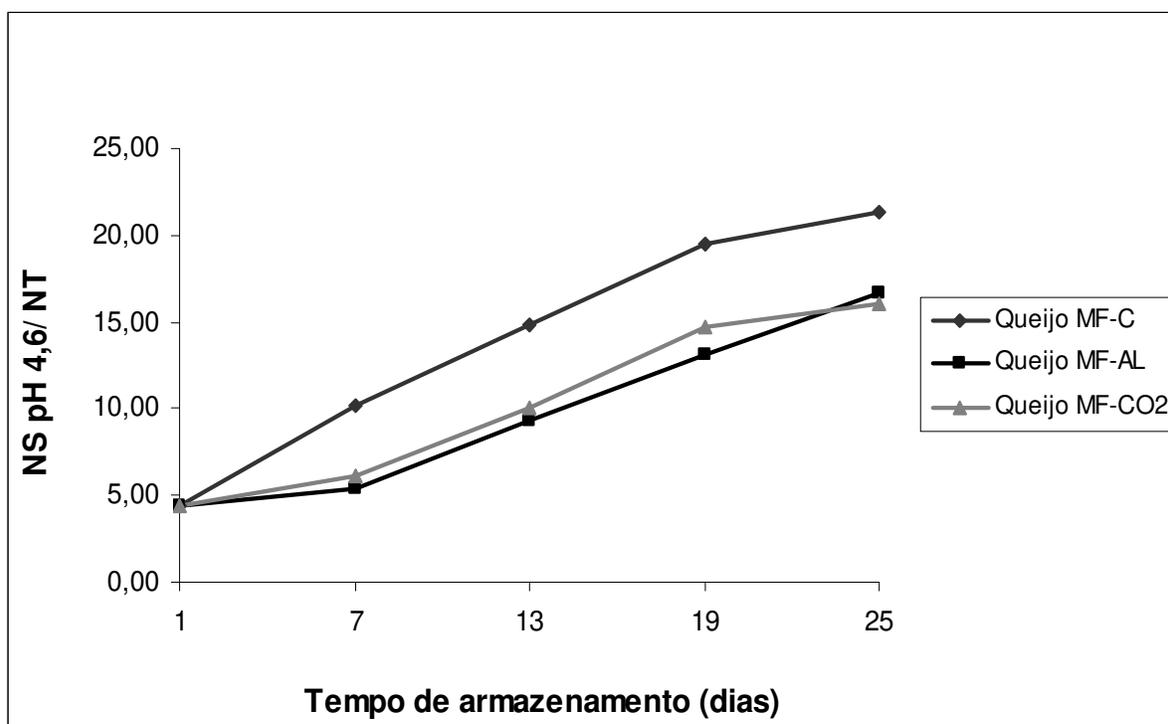


Figura 5.9. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre o índice de extensão de proteólise dos queijos Minas Frescal (n=3)

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

A proteólise secundária é expressa como a porcentagem de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a 12% sobre a porcentagem de nitrogênio total. A proteólise secundária dos três queijos aumentou significativamente com o tempo de armazenamento refrigerado (Figura 5.10). Os tratamentos afetaram significativamente a proteólise secundária dos queijos. O queijo controle também obteve maiores teores de proteólise secundária (4,94%) do que os queijos fabricados com leites acidificados com ácido láctico ou com CO₂ (2,73% e 2,89%, respectivamente). A maior profundidade de proteólise se deve à presença das enzimas proteolíticas do fermento, que hidrolisam, principalmente, os peptídios resultantes da ação do coalho sobre as caseínas, gerando pequenos peptídios e aminoácidos livres (FOX, 1989). Assim, nos

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

queijos sem a utilização do fermento láctico, a proteólise secundária ocorre fundamentalmente em função da presença de microrganismos contaminantes ou resistentes à pasteurização.

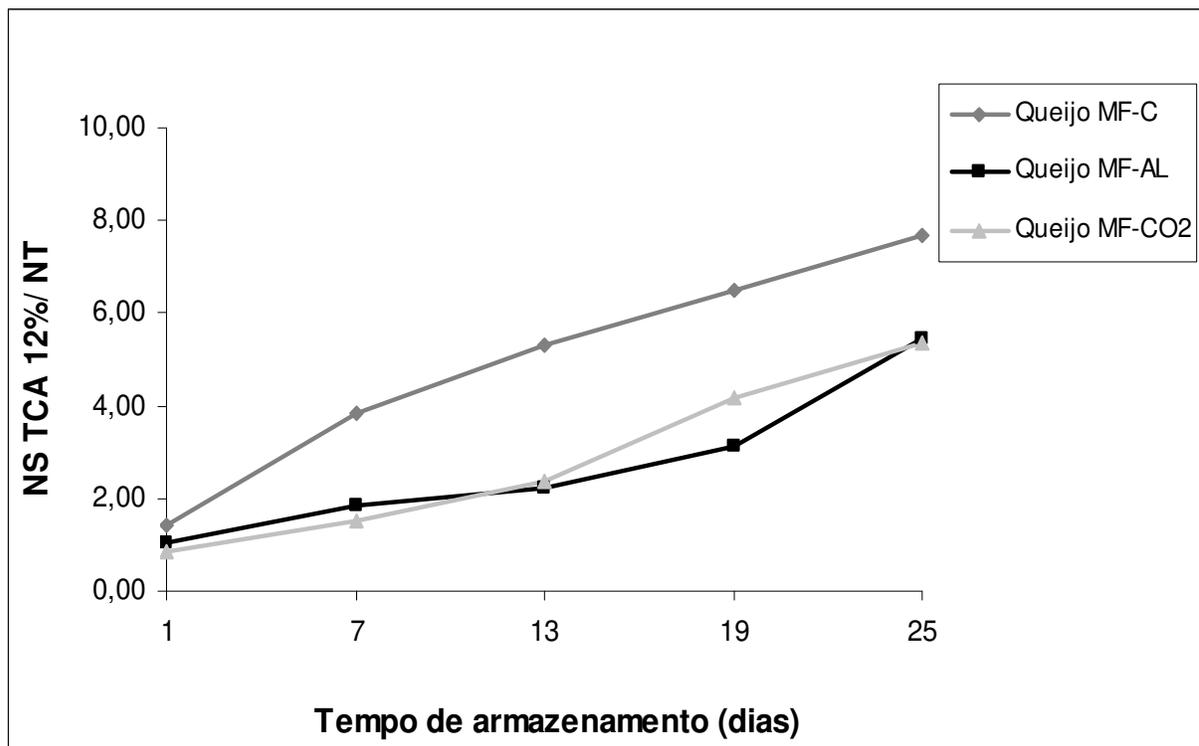


Figura 5.10. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre o índice de profundidade de proteólise dos queijos Minas Frescal (n=3)

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

Em relação ao índice de extensão de proteólise, as médias foram de 9,79% e 10,21% para os queijos fabricados com leites acidificados com adição de ácido láctico ou com adição de dióxido de carbono, respectivamente, e de 14,09% para o queijo controle. O queijo controle apresentou valores médios do índice de extensão de proteólise de 4,46% no primeiro de dia de armazenamento refrigerado e 14,82% no 13º dia, e os queijos fabricados com adição de ácido láctico ou CO₂ ao leite apresentaram valores de 4,42% e 4,42% (dia 1), e, 9,36% e 10,03% (dia 13),

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

respectivamente. Estes resultados concordam com os verificados por Isepon e Oliveira (1993), que foram de 4,99% (dia 1) a 10,71% (dia 13) nos queijos fabricados sem adição de cultura láctica para o índice de extensão de proteólise. Assim como Wolfschoon-Pombo (1983) que, trabalhando com queijo Minas Frescal, verificou valores médios de índices de extensão de proteólise de 5,8% a 9,7% em queijos cujo leite foi acidificado com ácido láctico.

Já para o índice de profundidade de proteólise, as médias variaram de 2,73% e 2,89%, para os queijos fabricados com leites acidificados com adição de ácido láctico ou com adição dióxido de carbono, respectivamente, e de 4,94% para o queijo controle. Dornellas (1997) também observou um aumento nos níveis de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético a 12% e de nitrogênio solúvel em pH 4,6 em queijo Minas Frescal adicionado de agente coagulante (coalho bovino e microbiano) e fermento láctico. Estes queijos apresentaram maior atividade proteolítica do que os queijos sem adição de fermento láctico, perdendo a integridade física após 16 dias de armazenamento. Resultado semelhante foi observado por Naldini (2002), em que o queijo com adição de fermento láctico apresentou, após 15 dias de fabricação, massa disforme, com amolecimento e grande mudança na textura.

Como neste trabalho, outros autores também observaram um aumento na proteólise de queijos Minas Frescal fabricados com adição de fermento láctico. Após 21 dias de armazenamento refrigerado, Viotto e Campos (2000) observaram um maior aumento na profundidade e extensão de proteólise dos queijos Minas Frescal fabricados com fermento láctico, em relação àqueles fabricados sem adição de fermento. Trabalhando com 3 diferentes processos tecnológicos de fabricação de queijo Minas Frescal (acidificação direta, ultrafiltração e adição de cultura láctica), Carvalho, Viotto e Kuaye (2007) observaram que os queijos fabricados com adição de cultura láctica tiveram uma maior proteólise ao longo da vida de prateleira. A acidificação mais intensa nestes queijos promoveu uma perda de cálcio para o soro, causando a desmineralização dos queijos.

Em relação à adição de dióxido de carbono no leite, pode-se observar que o queijo fabricado com este leite, apresentou menor proteólise do que o queijo fabricado

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

sem acidificação do leite (queijo controle). Isto foi estudado no trabalho de Montilla, Calvo e Olano (1995), em que os autores observaram uma maior proteólise no queijo controle do que nos queijos fabricados por acidificação do leite com ácido láctico ou dióxido de carbono. Nelson, Lynch e Barbano (2004b) também notaram este comportamento, concluindo que a adição de CO₂ no processo de fabricação de queijos produz uma massa mais firme, que pode ser detectada pelo toque e pela resistência do coágulo, quando cortado com a faca. Ruas-Madiedo et al. (2003) mediram os valores de extensão e profundidade de proteólise em queijos duros espanhóis e observaram que estes valores foram menores em queijos fabricados com leite tratado com CO₂. Estes resultados foram atribuídos à inibição pelo CO₂ da proteólise microbológica. De acordo com os autores, o CO₂ residual pode ter inibido a proteólise da microbiota natural do leite nos primeiros estágios de maturação dos queijos.

Conforme pode ser observado na Tabela 5.6, o tempo, o tipo de tratamento e a interação destes fatores afetaram significativamente a porcentagem de CO₂ dos queijos. Como era esperado, os valores de concentração de CO₂ apresentaram diferenças significativas entre os queijos. O queijo controle e o queijo fabricado por acidificação do leite com ácido láctico não apresentaram diferenças significativas entre si, apresentando valores médios de 40 ppm ao longo do tempo de armazenamento (Figura 5.11).

Já o queijo com adição de CO₂ apresentou valores mais altos de concentração de dióxido de carbono (954 ppm) nos primeiros dias de armazenamento, diminuindo seus valores ao longo do tempo, até permanecerem constantes. Com 19 dias de armazenamento, a concentração de CO₂ atingiu um valor de 302 ppm, semelhante ao valor do trabalho de Nelson, Lynch e Barbano (2004b), onde o queijo Cheddar adicionado de CO₂ apresentou um teor de 337 ppm ao longo do tempo de armazenamento.

Ao adicionar CO₂ no leite, uma parte do dióxido de carbono fixa-se na gordura do queijo, e outra parte, concentra-se na fase aquosa, que se perde na atmosfera ao longo do tempo. Quando a injeção de CO₂ ocorre em temperaturas entre 30-40°C, a

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

maior parte do CO_2 se dissolve na fase lipídica (CHAMPAGNE, ST-GELAIS e CANDOLLE, 1998; NELSON, LYNCH e BARBANO, 2004b), assim como ocorreu neste trabalho (injeção a 35°C). Porém, como o queijo Minas Frescal possui uma alta umidade, parte do dióxido de carbono foi fixada na fase aquosa e perdeu-se no soro e para a atmosfera, durante o armazenamento refrigerado.

A quantidade de dióxido de carbono presente no leite adicionado de CO_2 foi de 1113 ppm (11,2%), para um valor de pH do leite de 6,2. Já nos leites controle e com adição de ácido láctico, foram encontrados valores de CO_2 de 100 ppm (1%). Nelson, Lynch e Barbano (2004b) adicionaram dióxido de carbono no leite até atingir um pH de 5,9. Para este valor de pH, a quantidade de CO_2 foi medida, apresentando um valor de 1600 ppm.

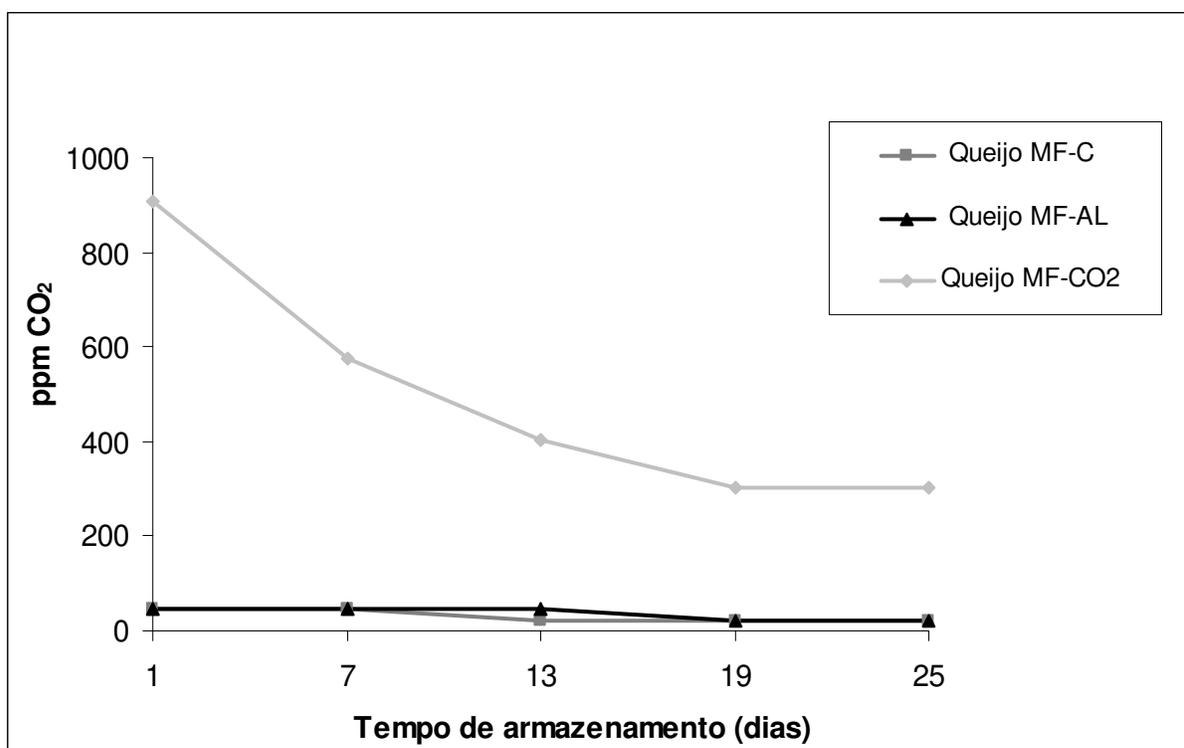


Figura 5.11. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a quantidade de CO_2 dos queijos Minas Frescal ($n=3$).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF- CO_2 – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO_2 .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.6. Efeito dos tratamentos sobre as características microbiológicas do queijo Minas Frescal

Os resultados das análises microbiológicas dos três queijos (controle, com acidificação do leite com ácido láctico e com acidificação do leite com CO₂), após 1 dia de fabricação, estão apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Características microbiológicas dos queijos

	Queijo MF-C*	Queijo MF-AL**	Queijo MF-CO ₂ ***	Valor de p
Contagem total (log UFC/g)	8,78 ^a	4,70 ^b	4,60 ^b	< 0,0001
Bactérias lácticas (log UFC/g)	8,70 ^a	3,90 ^b	4,00 ^b	< 0,0001
Bolores e Leveduras (log UFC/g)	1,04 ^b	2,91 ^a	1,15 ^b	0,0204
Psicrotróficos (log UFC/g)	6,48 ^a	4,32 ^b	3,94 ^b	0,005
<i>Pseudomonas</i> spp. (log UFC/g)	4,58 ^a	3,11 ^a	2,04 ^b	< 0,0001
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	< 1,0 x 10 ²	< 1,0 x 10 ²	< 1,0 x 10 ²	-
<i>Salmonella</i> spp. (UFC/25g)	Ausência	Ausência	Ausência	-
<i>Listeria monocytogenes</i> (UFC/25g)	Ausência	Ausência	Ausência	-
Coliformes a 30-35°C (NMP/g)	4	16	60	0,3991
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3	< 3	< 3	-

*Queijo MF C – Queijo Minas Frescal controle

**Queijo MF AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado com ácido láctico

***Queijo MF CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado com CO₂

^{a,b} Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (p ≤ 0,05).

Avaliando-se os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras de queijos e considerando os padrões microbiológicos estabelecidos pelos órgãos oficiais – Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), observa-se que os produtos se enquadram dentro dos padrões legais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das contagens de *Staphylococcus aureus* e coliformes a 45°C nos três queijos, foram menores que 5×10^2 UFC/g e menores que 5×10^2 NMP/g, respectivamente, e os queijos não apresentaram *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostra.

A contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios dos queijos com diferentes tratamentos diferiram significativamente entre si. O queijo controle apresentou uma contagem inicial maior (8,78 log UFC/g), devido à cultura láctica adicionada no leite antes da sua coagulação. Os queijos fabricados por acidificação do leite com adição de ácido láctico ou com adição de CO₂ não diferiram significativamente entre si, porém apresentaram diferenças em relação ao queijo controle. Não foi adicionada cultura láctica nestes queijos, por isso, eles apresentaram uma menor contagem total (4,70 e 4,60 log UFC/g, respectivamente).

Como era esperado, as contagens de bactérias lácticas nos queijos apresentaram resultados semelhantes à contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios. O queijo controle diferiu significativamente dos queijos obtidos por acidificação do leite com ácido láctico ou com CO₂. A presença da cultura láctica foi responsável por esta diferença no queijo controle, sendo que nos outros dois queijos, as contagens apresentadas (3,90 e 4,00 log UFC/g) são referentes às bactérias lácticas naturais do leite, que sobreviveram à sua pasteurização (SHARPE, 1979).

Avaliando-se as populações de bolores e leveduras encontradas nos queijos, verificou-se que o queijo controle e o fabricado por acidificação do leite com CO₂ não apresentaram diferenças entre si, mas diferiram em relação ao queijo obtido a partir de leite acidificado com ácido láctico, o qual apresentou a maior contagem. O tratamento com dióxido de carbono ajudou a inibir o crescimento de bolores e leveduras, diminuindo assim, a contagem inicial deste queijo. Já o queijo controle, por possuir alta contagem de bactérias lácticas que competem com os bolores e as leveduras, apresentou também menores contagens.

Os queijos fabricados a partir de leite acidificado com adição de CO₂ ou com adição de ácido láctico não diferiram significativamente entre si para as contagens de

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

microrganismos psicotróficos, mas diferiram do queijo controle. O baixo pH destes queijos durante o processo de fabricação ajudou a diminuir as contagens de microrganismos psicotróficos, além da presença de bactérias lácticas no queijo controle que podem se desenvolver no meio para contagem de microrganismos psicotróficos. Os microrganismos psicotróficos são provenientes da contaminação do leite pelos equipamentos de ordenha, água, solo e ar (SANTANA et al., 2001; SANTOS e FONSECA, 2001). Em queijos, sua presença é atribuída à contaminação durante o processamento, podendo produzir defeitos de qualidade como sabor amargo (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

Os tratamentos afetaram significativamente as contagens de psicotróficos e *Pseudomonas* spp., sendo que as menores contagens de *Pseudomonas* spp. foram observadas no queijo fabricado a partir de leite acidificado com CO₂. Este resultado está em concordância com outros trabalhos (AMIGO, OLANO e CALVO, 1995; ESPIE e MADDEN, 1997; MARTIN, WERNER e HOTCHKISS, 2003), nos quais os autores observaram, também, uma menor contagem de *Pseudomonas* spp., devido à adição de dióxido de carbono ao leite.

A inibição de microrganismos psicotróficos pelo CO₂ também foi observada por outros pesquisadores. Ruas-Madiedo et al. (1996) observaram o efeito da adição de CO₂ na microbiota do leite cru, e concluíram que o maior efeito foi nas contagens de coliformes e psicotróficos, diminuindo-as. Calvo, Montilla e Olano (1993) também observaram uma redução do crescimento de microrganismos psicotróficos em queijos fabricados com adição de CO₂ até pH 6,0 – 6,5.

5.7. Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento sobre as características microbiológicas do queijo Minas Frescal

A Tabela 5.8 apresenta a análise estatística do efeito dos tratamentos, do tempo, e da interação destes fatores sobre a contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios, bactérias lácticas, bolores e leveduras, psicotróficos e

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pseudomonas spp., observadas nos queijos controle e obtidos a partir de leite acidificado com ácido láctico ou com CO₂.

Tabela 5.8. Valores de *p*-valor demonstrando o efeito dos tratamentos, do tempo e da interação tratamento X tempo sobre a contagem de microrganismos dos queijos (n=3).

	GL	Valores de <i>p</i>				
		Contagem Total	Bactérias Lácticas	Bolores e Leveduras	Psicrotróficos	<i>Pseudomonas</i>
Tratamento	2	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Tempo	4	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Tratamento X Tempo	8	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0005	< 0,0002

Observa-se na Tabela 5.8 que os tratamentos, o tempo de armazenamento refrigerado e a interação tratamento X tempo afetaram significativamente as populações de todos os microrganismos avaliados.

Pode-se verificar nas Figuras 5.12 e 5.14 que o queijo controle apresentou em média maiores contagens de microrganismos mesófilos aeróbios e bactérias lácticas quando comparado com os queijos fabricados a partir de leites acidificados com ácido láctico ou com CO₂, os quais não diferiram entre si. Entretanto, o comportamento das populações desses microrganismos ao longo do tempo de armazenamento foi completamente distinto para os queijos controle e para os queijos fabricados com acidificação do leite.

Observa-se nas Figuras 5.13 e 5.15 que para os queijos obtidos a partir de leite acidificado com ácido láctico ou com CO₂, as contagens de microrganismos mesófilos aeróbios e de bactérias lácticas aumentaram ao longo do tempo até 19 dias de armazenamento refrigerado. Enquanto que, para o queijo controle, a contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios manteve-se praticamente constante e a de bactérias lácticas diminuiu ao longo do tempo, especialmente após 19 dias de

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

armazenamento refrigerado. Após 19 e 25 dias de tempo de armazenamento, as contagens de bactérias aeróbias mesófilas nos queijos são mais uniformes, apresentando pequenas variações.

Os queijos fabricados a partir de leite acidificado com ácido láctico ou com CO₂ apresentaram um resultado semelhante no que diz respeito às contagens totais de microrganismos mesófilos aeróbios. As contagens aumentaram durante a vida de prateleira dos queijos até atingirem um valor em torno de 7,00 log UFC/g. Este aumento ocorreu devido à presença de microrganismos resistentes à pasteurização, que se desenvolveram nos queijos. Já o queijo controle iniciou as contagens com um alto valor (8,78 log UFC/g), devido à adição de bactérias lácticas no leite. Este valor diferiu significativamente dos encontrados nos outros queijos e se manteve constante durante o tempo de armazenamento refrigerado. Dornellas (1997) também observou este mesmo comportamento em queijos Minas Frescal fabricados com adição de fermento láctico. Estes queijos apresentaram contagens maiores de microrganismos mesófilos aeróbios do que os queijos fabricados por acidificação direta, devido à presença de bactérias lácticas naqueles queijos.

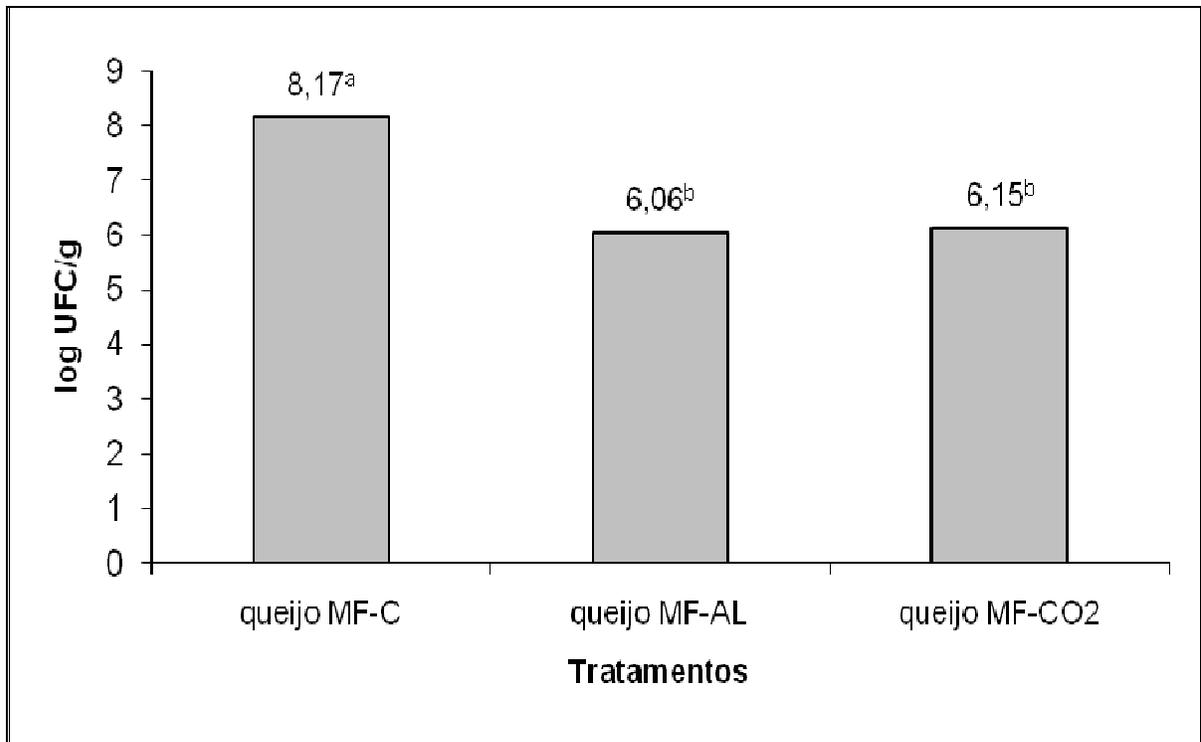


Figura 5.12. Efeito dos tratamentos sobre a contagem total dos queijos Minas Frescal
Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

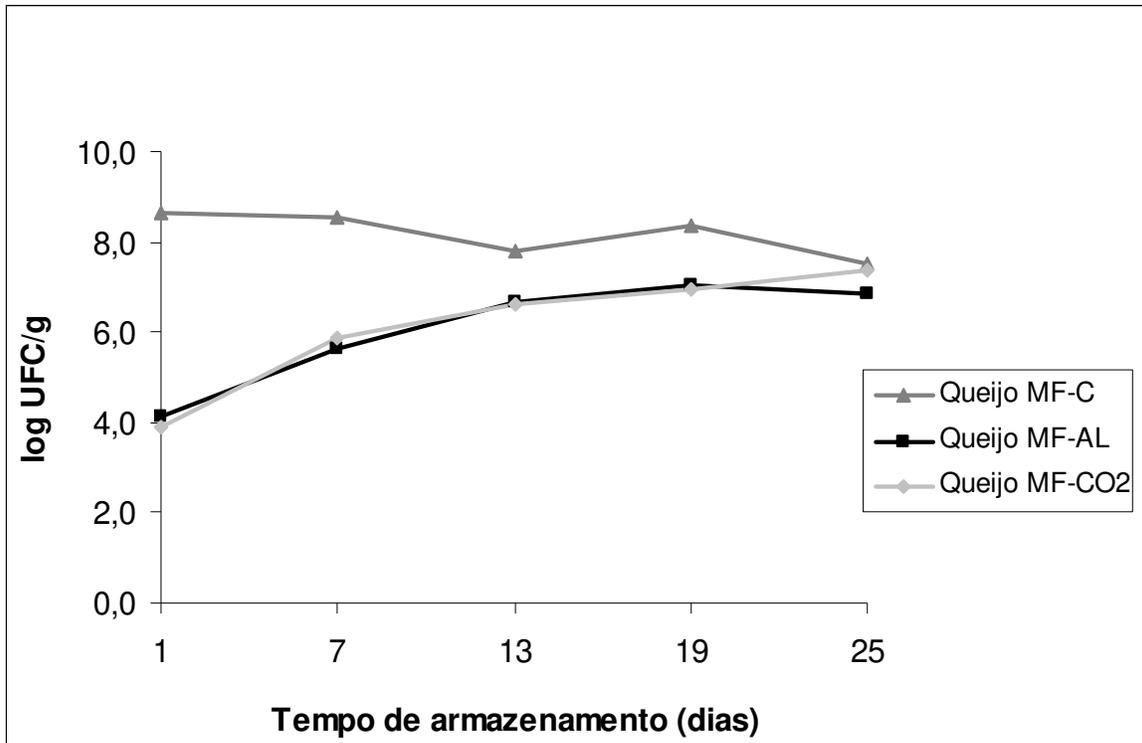


Figura 5.13. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem total dos queijos Minas Frescal (n=3).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

As contagens de bactérias lácticas dos queijos fabricados a partir de leite acidificado com ácido láctico ou com CO₂ não diferiram entre si durante a vida de prateleira destes queijos, porém diferiram das contagens do queijo controle. O queijo controle inicialmente apresentou uma contagem de 8,70 log UFC/g devido à adição de bactérias lácticas no leite, durante o processo de fabricação. Esta contagem foi decrescendo, por consequência da competição das bactérias lácticas com outros microrganismos presentes no queijo, atingindo um valor em torno de 6,50 log UFC/g no 25º dia de fabricação.

As contagens de bactérias lácticas dos queijos obtidos por acidificação do leite com ácido láctico ou com CO₂ aumentaram ao longo do tempo de armazenamento,

até o 19º dia. Após este dia, as contagens decresceram, possivelmente devido aos microrganismos presentes nestes queijos que competiram com as bactérias lácticas.

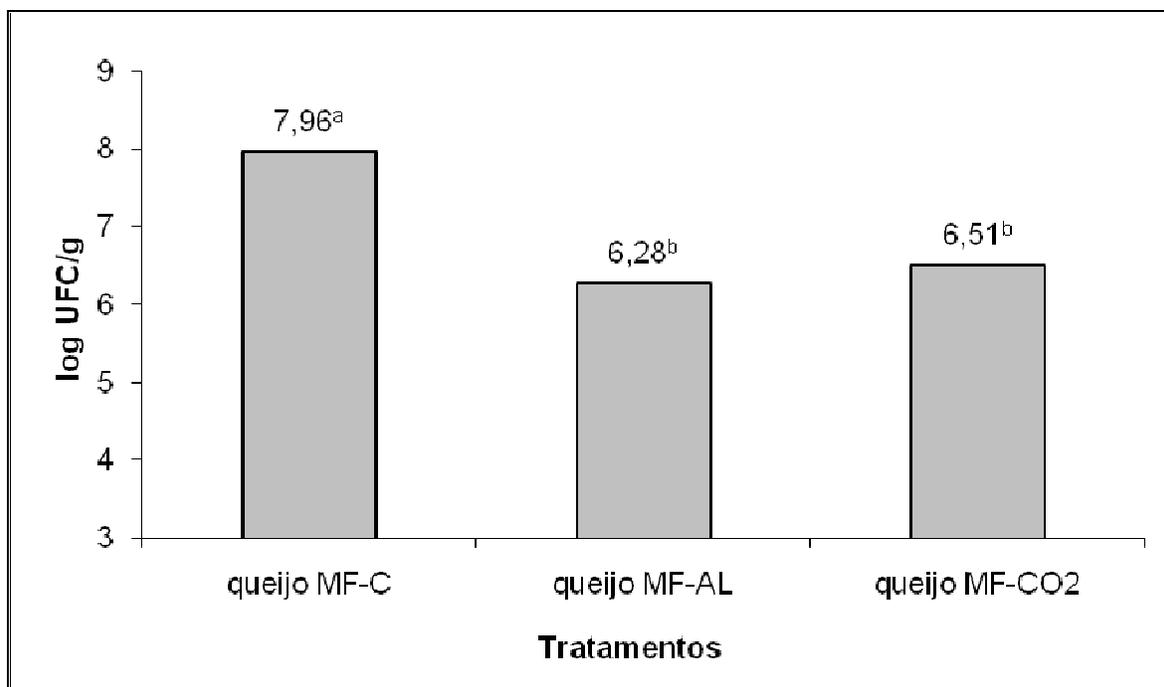


Figura 5.14. Efeito dos tratamentos sobre a contagem de bactérias lácticas dos queijos Minas Frescal

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

O mesmo comportamento foi observado por Ruas-Madiedo et al. (1998a; 2002). Os autores fabricaram queijos a partir de leite acidificado com e sem (controle) adição de CO₂. Foram analisadas as contagens totais de microrganismos mesófilos aeróbios e de *Lactococcus* spp. nos queijos. O comportamento microbiológico dos dois queijos foi similar, apresentando um aumento das contagens nos primeiros 3 dias de maturação, atingindo um valor de 10 ciclos logarítmicos e, após 15 dias de maturação, os queijos apresentaram valores de 6,5 –8 ciclos logarítmicos de UFC/g. Esta queda das contagens foi devido à competição entre os microrganismos, assim como foi observado neste trabalho, para o queijo Minas Frescal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estes resultados são condizentes com os estudos de Naldini (2002), que observou uma maior contagem inicial de bactérias lácticas em queijos convencionais, e ao 12º dia de armazenamento refrigerado, revelou um declínio de 0,31 ciclos logarítmicos em suas contagens.

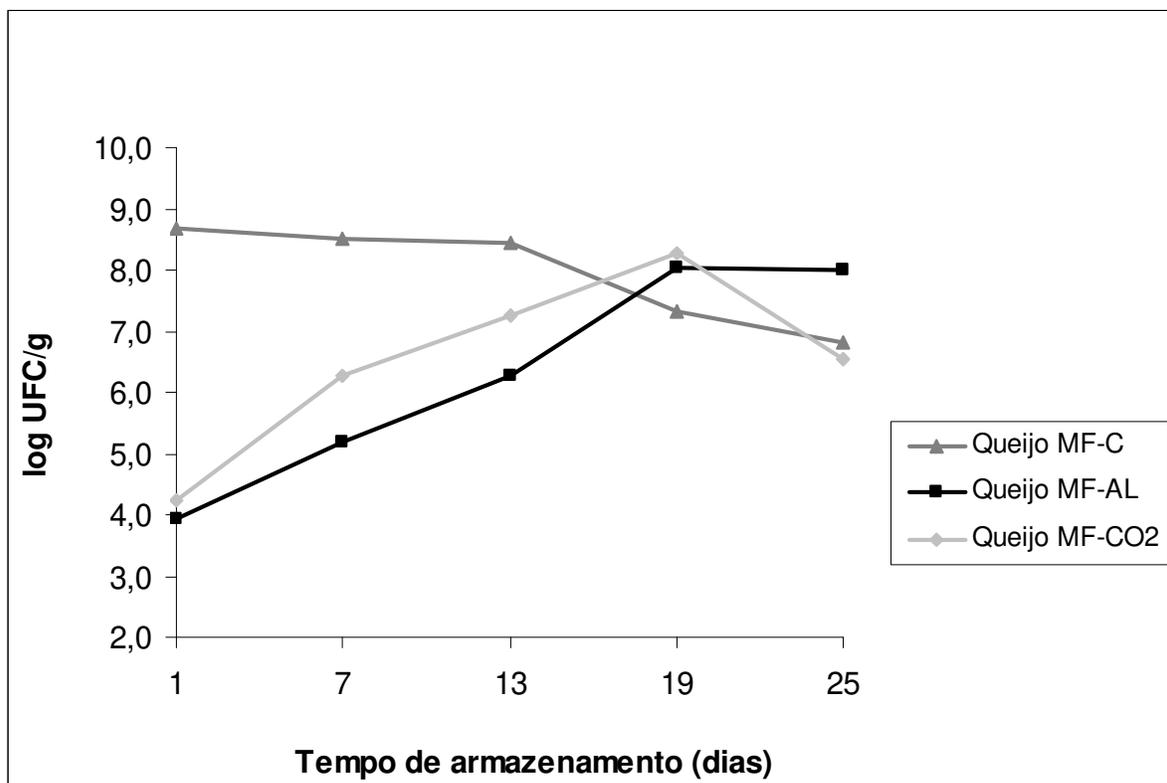


Figura 5.15. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem de bactérias lácticas dos queijos Minas Frescal (n=3).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

A contagem média de bolores e leveduras foi significativamente maior no queijo fabricado a partir de leite acidificado com ácido láctico (4,13) (Figura 5.16) do que nos queijos controle e fabricado a partir de leite acidificado com CO₂, os quais não diferiram entre si. A contagem de bolores e leveduras aumentou ao longo do tempo de armazenamento refrigerado para todos os tratamentos (Figura 5.17), entretanto, as contagens do queijo obtido a partir de leite acidificado com CO₂

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

aumentou ao longo do tempo, mas obteve sempre contagens menores que os demais queijos. O queijo controle obteve um aumento acentuado de suas contagens após 13 dias de armazenamento refrigerado e o queijo obtido a partir de leite acidificado com ácido láctico apresentou uma tendência de crescimento nas suas contagens, porém em menor intensidade.

O dióxido de carbono apresentou um efeito inibidor nestes microrganismos. A contagem deste queijo começou baixa (1,15 log UFC/g) e ao 25º dia apresentou um resultado em torno de 4,00 log UFC/g. Já o queijo controle apresentou um crescimento acentuado destes microrganismos durante a vida de prateleira, chegando a um valor de 6,00 log UFC/g ao final do experimento. Porém, Campos (2000) observou um aumento nas contagens de bolores e leveduras com o tempo, em queijos Minas Frescal com adição de 0,1 e 0,5% de fermento láctico e em queijos sem fermento, sendo que, as maiores contagens foram observadas para os queijos sem fermento e, as menores, para o queijo com adição de 0,5% de fermento.

Os resultados do trabalho de Campos (2000) estão de acordo com os resultados do 1º dia de armazenamento refrigerado dos queijos deste trabalho. O queijo produzido por acidificação do leite com ácido láctico apresentou as maiores contagens de bolores e leveduras, porém, a adição de fermento láctico não teve um efeito inibitório nestes microrganismos durante a vida de prateleira do produto. Já a presença de dióxido de carbono mostrou-se eficaz no controle da multiplicação de bolores e leveduras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

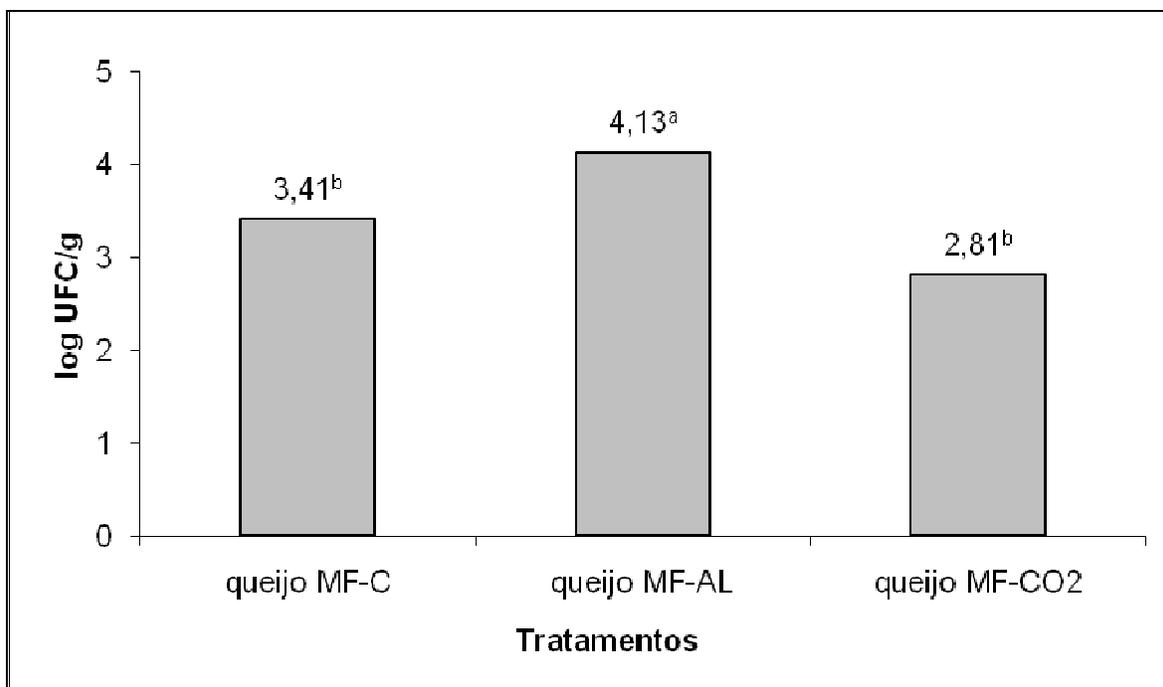


Figura 5.16. Efeito dos tratamentos sobre a contagem de bolores e leveduras dos queijos Minas Frescal

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

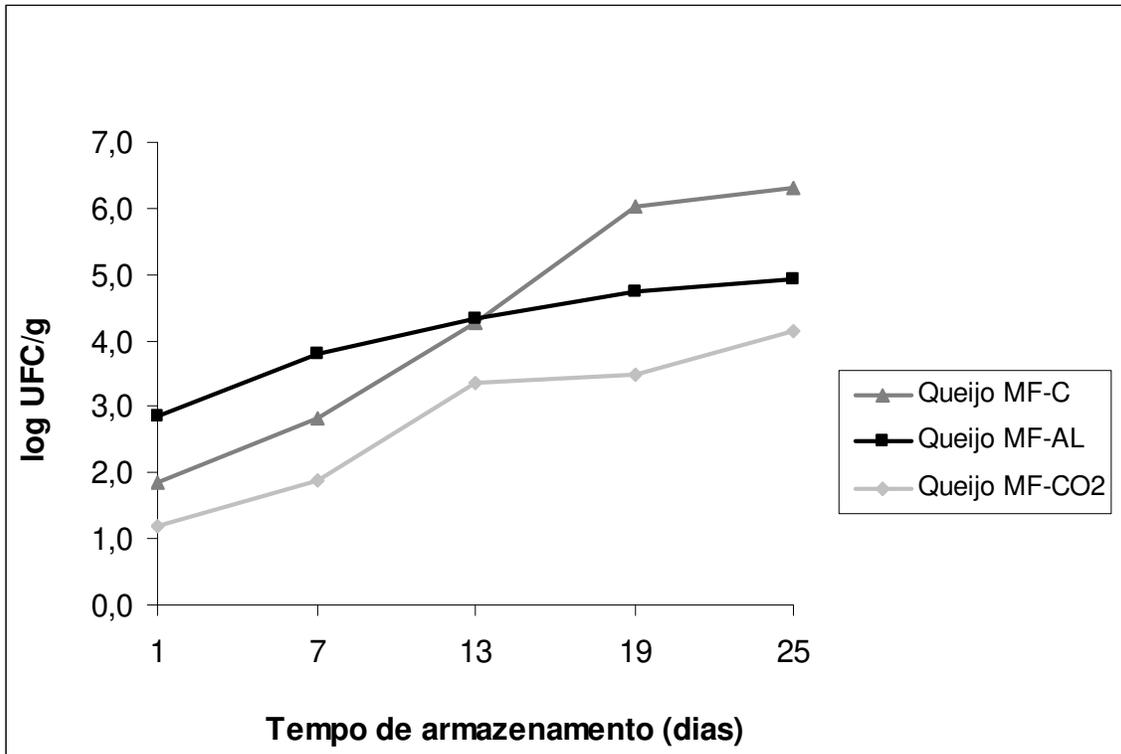


Figura 5.17. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem de bolores e leveduras dos queijos Minas Frescal (n=3).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

Observa-se nas Figuras 5.18 e 5.19 que o queijo fabricado a partir de leite acidificado com CO₂ apresentou as menores contagens dos microrganismos *Pseudomonas ssp.* Os queijos fabricados a partir de leites acidificados com CO₂ ou com ácido láctico não diferiram significativamente entre si para as contagens de psicotróficos, durante a vida de prateleira, porém, diferiram do queijo controle. Já para as contagens de *Pseudomonas ssp.*, os queijos controle e obtido a partir de leite acidificado com ácido láctico não diferiram entre si, enquanto que o queijo obtido a partir de leite acidificado com CO₂ diferiu dos demais.

Pode-se observar nas Figuras 5.20 e 5.21 que as contagens de psicotróficos e *Pseudomonas spp.* nos queijos aumentaram durante o tempo de armazenamento refrigerado, exceto para a contagem de psicotróficos do queijo controle e do queijo

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

fabricado com leite acidificado por CO₂, que a partir do 13^o dia de armazenamento manteve suas contagens constantes.

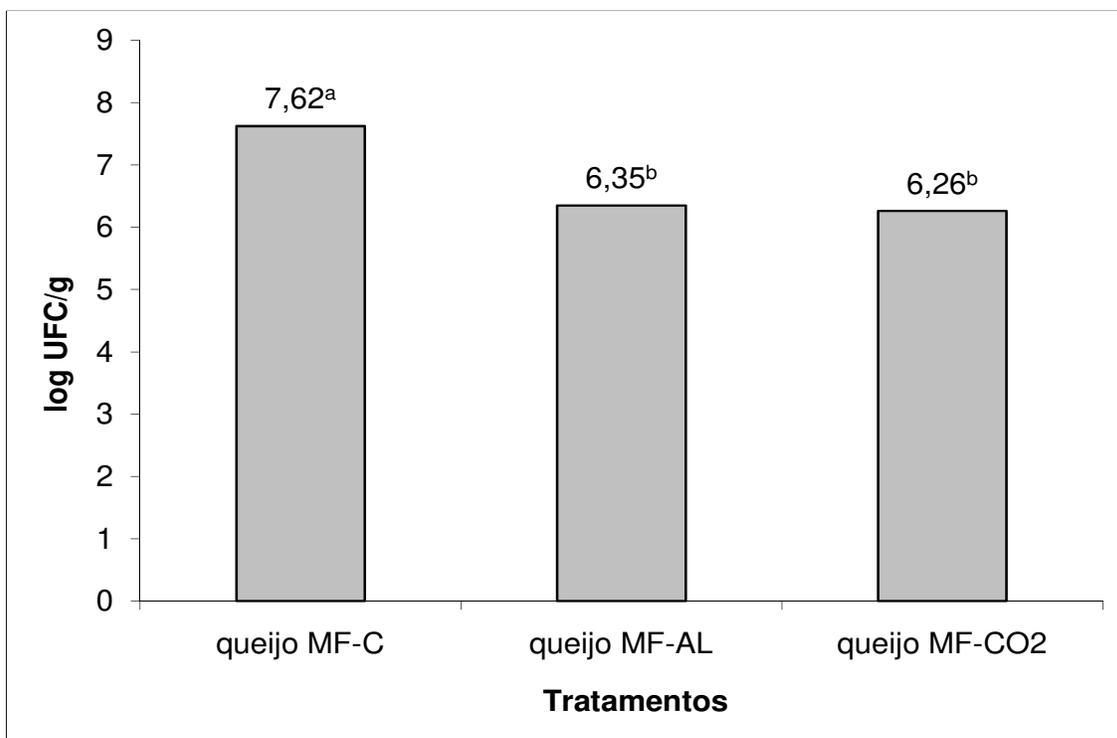


Figura 5.18. Efeito dos tratamentos sobre a contagem de psicotróficos dos queijos Minas Frescal

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

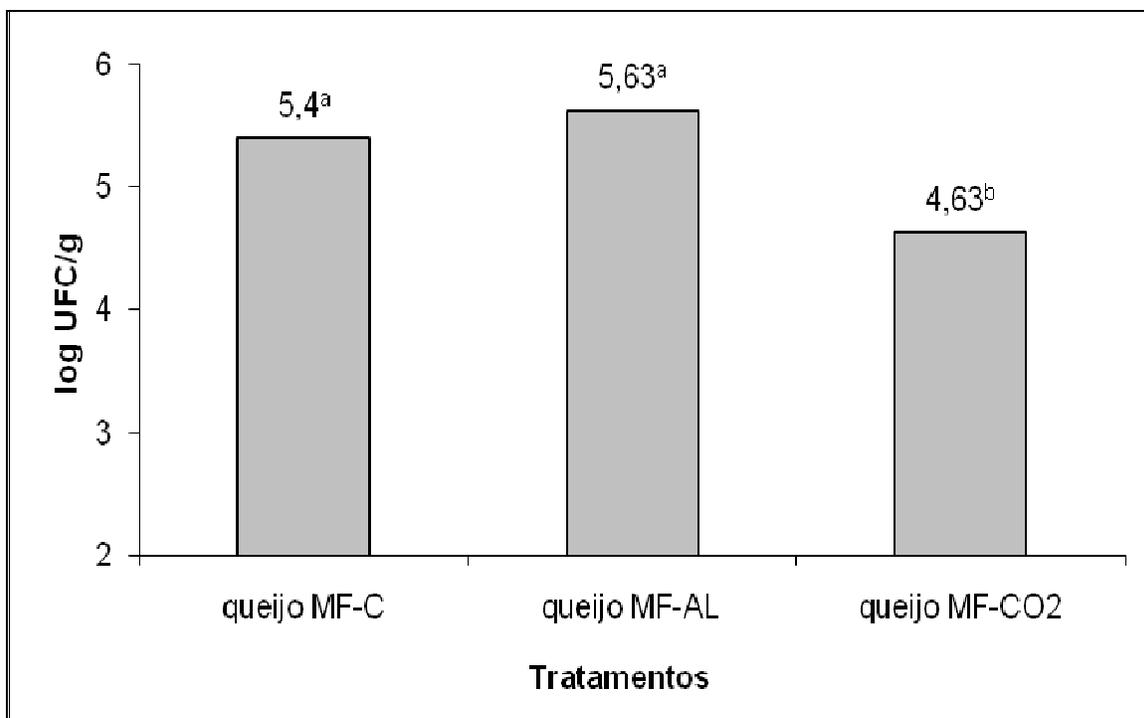


Figura 5.19. Efeito dos tratamentos sobre a contagem de *Pseudomonas ssp.* dos queijos Minas Frescal

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

^{a, b} Valores com a mesma letra não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para cada etapa para um mesmo tipo de queijo.

A contagem de psicrotróficos do queijo controle aumentou durante a primeira semana de armazenamento refrigerado e depois se estabilizou para 7,5 log UFC/g. Os queijos obtidos a partir da acidificação do leite por ácido láctico ou por CO₂ apresentaram contagens crescentes durante o tempo de armazenamento, até atingirem valores de 7,00 – 8,00 log UFC/g no 25º dia. Em 19 e 25 dias de tempo de armazenamento refrigerado as contagens destes microrganismos nos queijos apresentaram um comportamento mais uniforme, apresentando pequenas variações. Esta alta contagem de microrganismos psicrotróficos possivelmente está relacionada à presença de microrganismos mesófilos no meio de cultura incubado, que conseguem desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Kraft (1992), os microrganismos psicotróficos têm sido definidos como o subgrupo dos mesófilos, pois eles crescem em temperaturas moderadamente baixas e continuam se multiplicando em temperaturas abaixo da máxima para a maioria dos mesófilos. Assim, a contagem de psicotróficos dos queijos indicou a presença de bactérias lácticas, que foi confirmada pelo teste de coloração de Gram, no qual se observou tanto a presença de microrganismos Gram-positivos (bactérias lácticas), quanto de Gram-negativos.

A contaminação pós-pasteurização pode ser responsável pela presença de microrganismos psicotróficos em leite pasteurizado. Os microrganismos psicotróficos possuem uma temperatura mínima de multiplicação de -5 a 5°C, uma temperatura ótima de 25 a 30°C e uma temperatura máxima de 30 a 35°C (KRAFT, 1992).

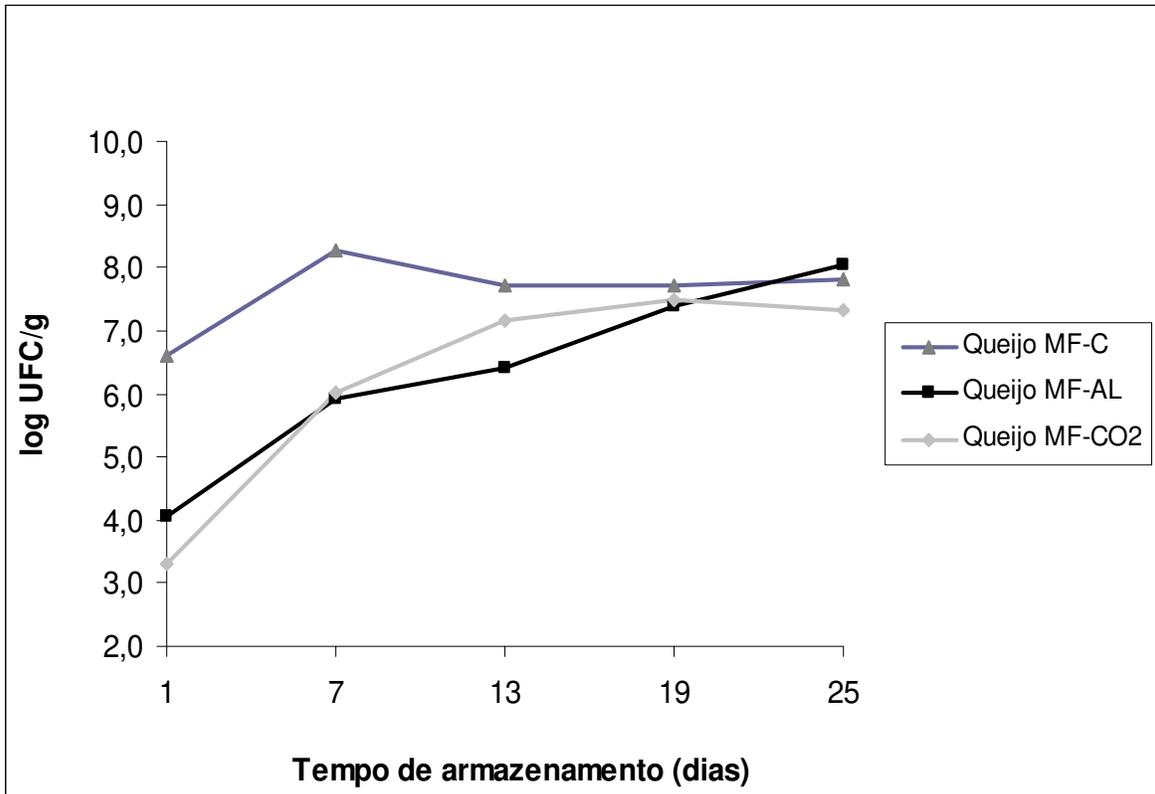


Figura 5.20. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem de psicrotróficos dos queijos Minas Frescal (n=3).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

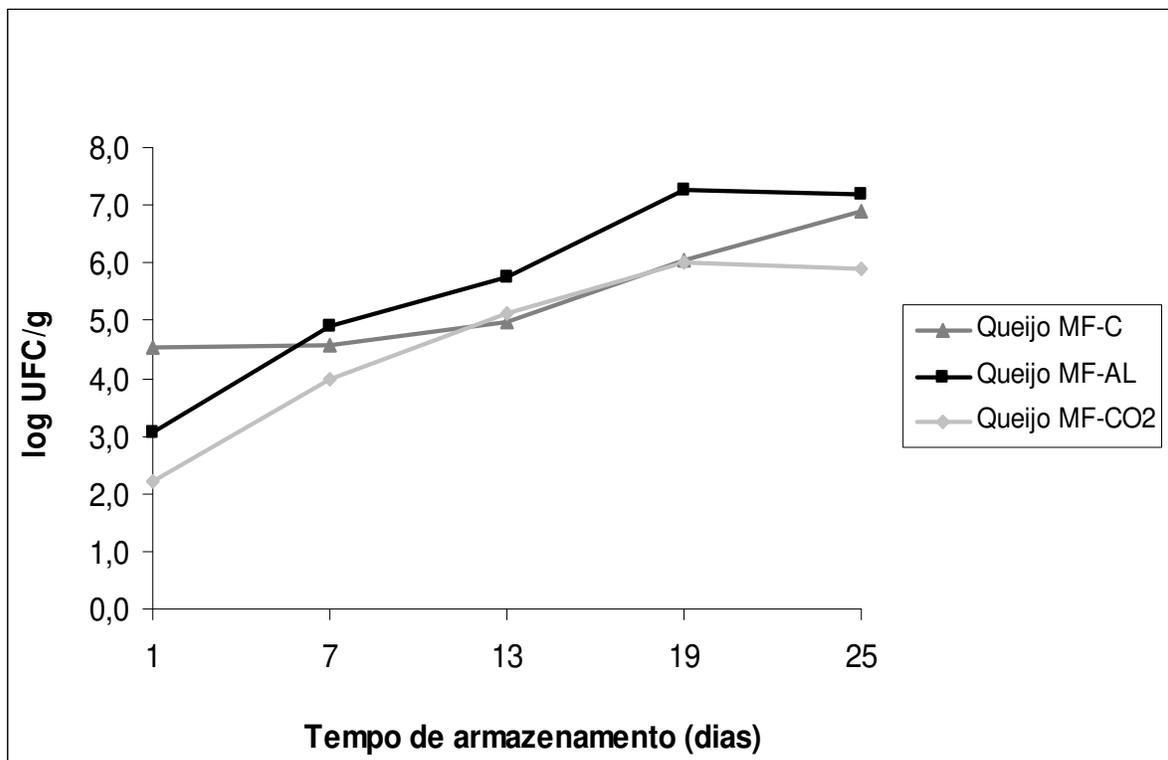


Figura 5.21. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem de *Pseudomonas* spp. dos queijos Minas Frescal (n=3).

Queijo MF-C – Queijo Minas Frescal controle, fabricado com adição de cultura láctica; Queijo MF-AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de ácido láctico; Queijo MF-CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado através da adição de CO₂.

A diferença significativa das contagens de *Pseudomonas* spp. dos queijos controle e obtido a partir de leite acidificado com ácido láctico, em relação ao queijo obtido a partir de leite acidificado com CO₂, está relacionada com o efeito de inibição do dióxido de carbono sobre os microrganismos aeróbios psicrótrópicos. Assim, a contagem de *Pseudomonas* spp. do queijo fabricado com adição de CO₂ ao leite iniciou com valores menores (2,04 log UFC/g), enquanto que os queijos controle e obtido a partir de leite acidificado com ácido láctico apresentam contagens iniciais de 4,58 e 3,11 log UFC/g, respectivamente.

Este efeito na contagem dos *Pseudomonas* spp. diminuiu durante a vida de prateleira do queijo, devido à dissipação do CO₂ para a atmosfera, o que resulta em uma contagem de 5,00 log UFC/g ao final do tempo de armazenamento refrigerado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens de coliformes totais (30-35°C) aumentaram com o tempo de armazenamento refrigerado dos queijos (Tabela 5.9). O queijo obtido a partir do leite acidificado com CO₂ apresentou um valor fora dos limites permitidos pela legislação (< 5 x 10² NMP/g) já na terceira semana após fabricação (13º dia) (BRASIL, 2001), e o queijo obtido a partir do leite acidificado com ácido láctico, após a quarta semana de fabricação (19º dia). Observa-se que o dióxido de carbono não apresentou nenhum efeito inibitório para a multiplicação de coliformes totais. Já o queijo controle, apresentou menores contagens de coliformes totais, devido à competição destes microrganismos com as bactérias lácticas presentes no queijo. Dornellas (1997) também observou que os queijos fabricados com fermento láctico apresentaram menores contagens de coliformes totais e fecais do que os queijos fabricados com leite acidificado com ácido láctico. Assim, o fermento láctico funciona como um inibidor da maioria da microbiota patogênica dos queijos.

Adans e Nicolaidis (1997) afirmam que uma população de bactérias pode restringir o crescimento de outros microrganismos simplesmente pela ocupação do espaço físico e assimilação dos nutrientes disponíveis. Além disso, os microrganismos patógenos não sobrevivem bem em um ambiente quando são adicionadas bactérias lácticas nele, devido à competição pelos nutrientes do meio.

A multiplicação dos coliformes a 30-35°C e 45°C foi inibida ao longo da vida de prateleira do queijo controle, no trabalho de Campos (2000), que observou que os queijos Minas Frescal fabricados com adição de fermento foram os que apresentaram menores taxas de multiplicação desses microrganismos, em relação aos queijos fabricados com leite acidificado por ácido láctico. A inibição do crescimento de microrganismos patógenos em queijos adicionados de cultura láctica também foi observada por outros autores. Alexandre et al. (2002) isolaram 192 linhagens de bactérias lácticas de cinco amostras de queijo Minas artesanal e observaram que 48 linhagens isoladas (25%) foram capazes de inibir a multiplicação *in vitro* de microrganismos, dentre os quais *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Carvalho, Viotto e Kuaye (2007) observaram que 29% de 31 amostras de queijos

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

fabricados com adição de cultura láctica apresentaram contagens de coliformes fecais acima do limite máximo estabelecido pela legislação. Já os queijos fabricados por acidificação direta, foram mais susceptíveis à contaminação por coliformes, apresentando 64,5% de suas 31 amostras com contagens acima do limite máximo permitido.

De acordo com Breidt e Fleming (1998), as bactérias lácticas podem competir com outros patógenos em alimentos, mostrando-se bastante eficientes neste aspecto. Os autores afirmam que a forma de ação das bactérias lácticas é o amensalismo, em que uma cultura microbiana inibe o crescimento da outra através da produção de metabólitos, ou através da competição por nutrientes entre as culturas. Uma vez suprimida a microbiota do fermento láctico, os possíveis contaminantes não encontrarão a competição oferecida por estas bactérias, podendo desta forma, desenvolverem-se. Assim, o queijo controle pode ser considerado o queijo mais seguro microbiologicamente.

Não houve contaminações por coliformes fecais (45°C) em todos os queijos durante a vida de prateleira. Isto é resultado da qualidade inicial do leite e das boas práticas de fabricação dos queijos (Tabela 5.9).

Tabela 5.9. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre a contagem de coliformes a 30-35°C e coliformes a 45°C dos queijos Minas Frescal (n=3).

Tempo de armazenamento (dias)	1	7	13	19	25
Coliformes a 30- 35°C (NMP/g)					
Queijo MF-C*	4	11	36	185	200
Queijo MF-AL**	17	17	240	> 2400	> 2400
Queijo MF-CO ₂ ***	58	116	> 2400	> 2400	> 2400
Coliformes a 45°C (NMP/g)					
Queijo MF-C*	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Queijo MF-AL*	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Queijo MF-CO ₂ ***	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3

*Queijo MF C – Queijo Minas Frescal controle

**Queijo MF AL – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado com ácido láctico

***Queijo MF CO₂ – Queijo Minas Frescal obtido a partir de leite acidificado com CO₂

As bactérias lácticas apresentaram um efeito inibitório sobre os coliformes a 30-35°C no queijo controle. Resultados semelhantes foram verificados por Campos e Viotto (2000), que observaram que somente uma repetição do queijo com 0,1% de fermento láctico e uma repetição do queijo com 0,5% de fermento láctico apresentaram valores de coliformes fecais maiores que 3 NMP/g. Em ambos os casos ocorreram reduções das contagens com o tempo de armazenamento refrigerado do queijo. Em nenhum dos processamentos dos queijos sem fermento houve contaminação inicial por coliformes fecais. Além disto, os autores observaram que, de todos os microrganismos contaminantes estudados, as maiores taxas de crescimento foram encontradas nos queijos onde não se utilizou fermento láctico, deixando clara a ação protetora deste fermento.

Conforme Northolt (1984), no começo da fermentação, a ação inibitória é devida à produção, por parte dos microrganismos do fermento, de compostos antimicrobianos e peróxidos, além da queda no potencial de óxido-redução. Depois, a produção de ácido láctico abaixa o pH do queijo e contribui para a inibição dos contaminantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este comportamento inibitório das bactérias lácticas frente a microrganismos patógenos também foi observado por Guedes Neto et al. (2005) que estudaram a atividade antimicrobiana de linhagens de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. isoladas de queijo coalho. Os autores concluíram que os *Lactobacillus* spp. possuem atividade antagonista em relação aos microrganismos patogênicos mais potentes, devendo ser usado em queijos, para melhorar a qualidade sanitária do produto.

Observou-se que o pH dos queijos contribuiu para a inibição de microrganismos. A partir da 4ª semana de armazenamento refrigerado (19º dia), o pH dos queijos apresentaram valores menores que 6,2, o que inibiu ou manteve constante as contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, bactérias lácticas, psicotróficos e *Pseudomonas* spp (Figura 5.6).

A cultura láctica ajudou na inibição de microrganismos patógenos, através da manutenção da contagem de coliformes no queijo controle. Porém, as altas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, bactérias lácticas e psicotróficos encontradas neste queijo contribuíram para o aumento dos níveis de proteólise. Assim, este queijo apresentou textura disforme e não manteve sua forma física com o tempo de armazenamento refrigerado. Já os queijos fabricados a partir de leite acidificado com ácido láctico ou com CO₂ mantiveram sua forma física durante a sua vida de prateleira, devido ao menor desenvolvimento de microrganismos mesófilos aeróbios, bactérias lácticas e psicotróficos, o que contribuiu para uma menor proteólise em relação ao queijo controle.

O queijo fabricado a partir de leite acidificado com CO₂ não apresentou a proteção frente a microrganismos patógenos oferecida pelas bactérias lácticas, porém este queijo além de apresentar comportamento semelhante ao queijo fabricado a partir de leite acidificado com ácido láctico em relação à textura firme, apresentou uma menor contagem de *Pseudomonas* spp. e bolores e leveduras durante a vida de prateleira do produto, além de um soro com menor acidez, possuindo, assim, mais

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

vantagens de fabricação e qualidade do que o queijo fabricado a partir de leite acidificado com ácido láctico.

Considerando que o queijo Minas Frescal é um queijo fabricado com alto grau de manipulação, e apresenta um alto teor de umidade e lactose, e baixo teor de sal, este produto é altamente susceptível a contaminações. Assim, surge a necessidade da utilização de culturas lácticas que confirmam proteção ao queijo. Além disso, o tratamento com dióxido de carbono é também um bom inibidor de certos tipos de microrganismos, surgindo uma sugestão de fabricar o queijo Minas Frescal com adição de CO₂ e cultura láctica.

6. CONCLUSÕES

O pH, umidade, gordura e cinzas dos queijos foram afetados pelos diferentes tratamentos realizados. O pH e a gordura do queijo controle foram menores do que dos queijos fabricados a partir de leite acidificado com CO₂ ou com ácido láctico, porém, a umidade e as cinzas foram maiores no queijo controle.

O queijo produzido pelo método convencional apresentou, durante todo armazenamento, valores de pH mais baixos que dos queijos obtidos por adição de CO₂ ou ácido láctico no leite, decorrente da produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas.

O tempo de coagulação dos queijos fabricados com leite acidificado por adição de CO₂ e por adição de ácido láctico foi menor do que o tempo de coagulação do queijo controle, devido ao abaixamento do pH do leite para 6,2. Conseqüentemente, estes queijos apresentaram uma maior vida de prateleira, devido à textura e consistência firme.

A recuperação da proteína do leite nos queijos não apresentou diferenças significativas. Já a recuperação de gordura apresentou diferenças para os diferentes tratamentos. Apesar de ocorrer esta diferença de gordura no queijo controle, os rendimentos dos queijos não foram afetados pelos diferentes tratamentos.

A proteólise dos queijos fabricados a partir de leite acidificado com CO₂ ou com ácido láctico foi menor do que do queijo adicionado de cultura láctica, devido à ação proteolítica do fermento láctico, à presença de microrganismos deterioradores e ao baixo pH deste queijo.

O CO₂ inibiu o crescimento de *Pseudomonas* ssp. e bolores e leveduras no queijo obtido por acidificação do leite com CO₂. Já o queijo controle, por conter cultura láctica, obteve as menores contagens de coliformes totais.

6. CONCLUSÕES

As contagens de microrganismos mesófilos aeróbios e de bactérias lácticas do queijo controle foram maiores do que dos queijos fabricados por acidificação do leite com CO₂ ou com ácido láctico. Isto ocorreu devido à presença de cultura láctica, que com o tempo de armazenamento refrigerado, foi diminuindo por causa da competição entre os microrganismos presentes no meio.

O trabalho revelou que os queijos fabricados a partir de leite acidificado com CO₂ ou ácido láctico mostraram-se, à primeira vista, como uma boa solução para os problemas de conservação do produto (textura firme, manutenção da forma física), porém, estes queijos são mais susceptíveis ao crescimento de patógenos, pois não possuem a resistência oferecida pela cultura láctica às contaminações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, v. 8, n. 5-6, p. 227-239, 1997.

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijos tipo Minas Frescal de produção artesanal, comercializado em Poços de Caldas, MG. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102-103, p. 71-73, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **APHA**, Washington, 1992.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **APHA**, 4.ed., Washington, 2001.

AMIGO, L.; OLANO, A.; CALVO, M. M. Preservation of raw Milk with carbon dioxide. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, v. 200, p. 293-296, 1995.

ARAÚJO, V. S. ; SANTOS, E. C. S. ; QUEIROZ, M. L. P. ; FREITAS-ALMEIDA, A. C. . Análise Bacteriológica do Queijo Minas Frescal Comercializado Na Cidade do Rio de Janeiro. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1997. v. 1. p. 283-283 (Resumo).

ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of Staphylococcus and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 1172-1177, 2002.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS (ABIQ). **Produção de queijos no Brasil**, 2005. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/>. Acessado em 05/05/2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16th edition, Volume 2, 1995.

BARBANO, D. H.; RASMUSSEN, R. R. Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 1, p. 1-2, 1992.

BARROS, P. C. O. G.; NOGUEIRA, L. C.; RODRIGUEZ, E. M.; CHIAPPINI, C. C. J. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, v.18, n. 122, p. 57-60, 2004.

BISHOP, J.R.; WHITE, C.H. Assessment of dairy product quality and potential shelf-life: a review. **Journal of Food Protection**, v. 49, n. 9, p. 739-753, 1986.

BRASIL, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Portaria nº. 146, de 07 de março de 1996, aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Publicado no Diário Oficial da União de 11/03/1996, Seção 1, Página 3977-3986.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**. Resolução RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, revogando a portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro 16 de 1997. Diário Oficial da União, Brasília 10 de janeiro de 2001.

BRASIL, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº. 4, de 01 de março de 2004, aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Publicado no Diário Oficial da União de 05/03/2004, Seção 1, Página 5.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº. 68, de 12 de dezembro de 2006, oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial da União de 14/12/2006, Seção 1, Página 8.

BREIDT, F.; FLEMING, H. P. Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3159-3165, 1998.

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

BUTLER, J. N. **Carbon Dioxide Equilibria and Their Applications**. Addison Wesley Publishing Company, Reading, MA, 1982. 259 p.

CALVO, M. M.; MONTILLA, M. M.; OLANO, A. Rennet-clotting properties and starter activity on milk acidified with carbon dioxide. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 12, p. 1073-1076, 1993.

CAMPOS, A. C. **Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesofílico no rendimento, proteólise, qualidade microbiológica e propriedades mecânicas do queijo Minas Frescal**. Campinas, 2000. 80 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

CAMPOS, A. C.; VIOTTO, W. H. Microbiologia do queijo Minas Frescal durante o armazenamento refrigerado. Influência da concentração de fermento láctico. In: XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000, Fortaleza, CE. **Livro de Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, p. 4.36-4.36, 2000.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas-SP**. 2003. 107 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, p. 262–267, 2007.

CHAMPAGNE, C. P.; LAING, R. R.; ROY, D.; MAFU, A. A.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 1-30, 1994.

CHAMPAGNE, C. P.; ST-GELAIS, D.; CANDOLLE, A. de ; Acidification rates and population ratios of lactic starters in carbonated milk. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 31, p. 100-106, 1998.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. 4 ed. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 2001, cap. 13, p. 159-166.

DANIELS, J. A.; KRISHNAMURTHI, R.; RIZVI, S. S. H. A review of the effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 6, p. 532-537, 1985.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and different industrialized countries. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 1-17, 2001.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 130-138, 2003.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DORNELLAS, J. R. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise, e “shelf life” do queijo Minas Frescal**. Campinas, 1997. 197 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

EMMONS, D.B. Milk clotting enzymes. Estimating cheese yield losses from proteolysis during cheese making. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 2016-2021, 1990.

ESPIE, W. E.; MADDEN, R. H. The carbonation of chilled bulk milk. **Milchwissenschaft**, v. 52, p. 249-253, 1997.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborn pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. The **“Bad Bug Book”**. 1998. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>. Acessado em: 25/09/2008.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. Cheese rheology and texture. In P. F. FOX, T. P. GUINEE, T. M. COGAN, P. L. H. McSWEENEY (eds.). **Fundamentals of cheese science**. Aspen, Gaithersburg: Aspen. 2000. 587 p.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON POMBO, A. F. Fabricação de queijo Prato e Minas: Estudo do rendimento. Parte I – Determinação das cifras de transição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 34, n. 205, p. 3-19, 1979.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FURTADO, M. M.; SOUZA, H. M.; MUNCK, A. V. A fabricação do queijo Minas Frescal sem o emprego de culturas lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n. 207, p. 15-21, 1980a.

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; SOUZA, H. M.; MUNCK, A. V. Estudo conclusivo a respeito da fabricação do queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n. 208, p. 13-16, 1980b.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J .P. M. **Tecnologia de queijos**. Manual técnico para produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

FURTADO, M. M.; MOSQUIM, M. C. A.; FERNADES, A. R.; SILVA, C. A. B. da. In: SILVA, C. A. B. da., FERNANDES, A. R. **Projetos de empreendimentos agroindustriais**: produtos de origem animal. Viçosa: UFV, 2003. 308p.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos**: causas e prevenção. São Paulo, SP, 2005. 200 p.

GIGANTE, M.L. **Contribuição ao estudo do uso de gordura vegetal na fabricação de queijo minas frescal**. 1991. 161 p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M. R.; NUNUES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, supl. 2, p. 245-250, 2005.

HAYES, M. C.; NIELSEN, S. S. Plasmin levels in fresh milk whey and commercial whey protein products. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 3, p. 387-394, 2000.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HOFFMAN, F. L.; SILVA, J. V. da.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 69-76, 2002.

HOTCHKISS, J. H.; WERNER, B. G.; LEE, E. Y. C. Addition of carbon dioxide to dairy products to improve quality: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 158-168, 2006.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIOIS FOR FOODS – ICMSF. **Microorganisms in food**: Characteristics of microbial pathogens. London: Blackie Academic & Professional, v. 5, 1998. 513 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIOIS FOR FOODS – ICMSF. **Microorganisms in food**: Microbiological ecology of food commodities. Gaithersburg: A Chapman & Hall Food Science Book, An Aspen Publication, v. 6, p. 549-558, 2000.

ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, J. A. Influência das culturas lácticas no índice de proteólise do queijo Minas Frescal. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 3, p. 451-454, 1993.

ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, J. A. Variação do índice de proteólise na aceitabilidade do queijo tipo Minas Frescal. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13, Juiz de Fora. Programa Oficial, **Resumos**. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, p. 287, 1995.

ISEPON, J. S. dos.; SANTOS, P. A. dos.; SILVA, M. A. P. da. Avaliação microbiológica de queijo Minas Frescal comercializados na cidade em Ilha Solteira-SP. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 106, p. 89-91, 2003.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6 ed. Gaithersburg: Springer-Verlag, 2000. 767p.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JENNESS, R. Composition of milk. In: JENNESS, R. **Fundamentals of dairy chemistry**, 3d. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 1-38, 1988.

KRAFT, A. A. **Psychrotrophic Bacteria in Foods: Disease and Spoilage**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 274 p.

LANARA-Secretaria de Defesa Agropecuária. M.A. **Métodos Analíticos Oficiais de Controle de Produtos de origem animal e seus Ingredientes**. II-Métodos 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**, v. 70, n. 8, p. 1748-1760, 1987.

LEITE, R. L.; CARVALHO, E. P.; MOURA, C. J.; TEIXEIRA, L. A. M.; PEREIRA, M. L. Estudo das condições higiênico-sanitárias de queijos “Minas Frescal” e “Minas Padrão” elaborados a partir de leite proveniente de vacas com mastite subclínica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 320, p. 03-11, mai/jun. 2001.

LÓPEZ, M. B.; JORDÁN, M.J.; HELLIN, P.; CASTILLO, M.; LAENCINA, J. Kinetics of k-casein hidrolisis by different rennets and coagulant enzymes in Murciano-Granadina goat milk. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 7, p. 370-373, 1997.

LOSS, C. R; HOTCHKISS, J. H. **Dairy Processing: The use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products**. Boca Raton: CRC Press, 2000, 546 p.

LUCEY, J.; KELLY, J. Cheese yield. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Huntingdon Cambs, v. 47, n. 1, p. 1-14, 1994.

LUCEY, J. A.; FOX, P. F. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 6, p. 1714-1724, 1993.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MA, Y.; BARBANO, D. M.; HOTCHKISS, J. H.; MURPHY, S.; LYNCH, J. M. Impact of CO₂ addition to milk on selected analytical testing methods. **Journal Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 1959-1968, 2001.

MAGRO, M. I. M.; CORBACHO, J. M. M.; SORRIBES, C. H.; GEA, A. M. S.; GOMEZ, J. M. R. Las bacteriocinas de las bacterias lacticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, v. 37, n. 314, p. 59-66, 2000.

MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 1932-1940, 2003.

MAZAL, G.; VIANNA, P. C. B.; SANTOS, M. V.; GIGANTE, M. L. Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 630-636, 2007.

McCARNEY, T.; MULLAN, W. M. A.; ROWE, M. T. Effect of carbonation of milk on Cheddar cheese yield and quality. **Milchwissenschaft**, v. 50, p. 670-673, 1995.

MCCMAHON, D. J.; PAULSON, B.; OBERG, C. J. Influence of calcium, pH, and moisture on protein matrix structure and functionality in direct-acidified non-fat mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 3754-3763, 2005.

MONTILLA, A.; CALVO, M. M.; OLANO, A. Manufacture of cheese made from CO₂-treated milk. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, v. 200, p. 289-292, 1995.

MORA, A.; LEÓN, S. L.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; LÓPEZ, C.; DAHBI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 204-210, 2007.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MUIR, D. D. The shelf life of dairy products: raw milk and dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n. 1, p. 24-32, 1996.

NALDINI, M. C. M. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas frescal elaborados pelo método convencional e por acidificação direta**. Campinas, 2002. 72p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

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**, v. 87, n. 11, p. 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**, v. 87, n. 11, p. 3590-3600, 2004b.

NEVES-SOUZA, R. D.; SILVA, R. S. S. F. Estudo do custo-rendimento do processamento de queijos tipo Minas Frescal com derivado de soja e diferentes agentes coagulantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 170-174, 2005.

NORTHOLT, M. D. Growth and inactivation of pathogenic micro-organisms during manufacture and storage of fermented dairy products. A review. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 38, p. 135-150, 1984.

OLARTE, C.; GONZÁLEZ-FANDOS, M.; GIMÉNEZ, M.; SANZ, S.; PORTU, J. The growth of *Listeria monocytogenes* in fresh goat cheese (Cameros cheese) packaged under modified atmospheres. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 75-82, 2002.

OLIVEIRA, C. A. F.; MORENO, J. F. G.; MESTIERI, L.; GERMANO, P. M. L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas Frescal e Mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 31-35, 1998.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. São Paulo, Ícone; Campinas, Unicamp, 1986. 146 p.

PEREIRA, M. L.; LARA, M. A.; DIAS, R. S.; CARMO, L. S. do. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "tipo Minas". **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 4, p. 349-350, 1991.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F., CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 51, n. 5, p. 427-431, 1999a.

PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERGDOLL, M. S. Estafilococos e alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 66-67, p. 48-55, 1999b.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S. Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria- 1.Oxygen metabolites and products from catabolism. **Lait**, v. 71, p. 525-541, 1991.

RICHARDSON, G. H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products**. Washington: American Public Health Association, 1985. 412 p.

ROSSI, D. A. **Utilização do coalho bovino e coagulantes microbiano e genético na elaboração do queijo Minas Frescal**. 1997. 68 p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J. C.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; GONZÁLEZ DE LLANO, D.; REYES-GAVILÁN, C. G. de. Preservation of the

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 5, p. 502-508, 1996.

RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J. C.; ALONSO, L.; REYES-GAVILÁN, C. G. de. Afuega'l Pitu cheese quality: carbon dioxide addition to refrigerated milk in acid-coagulated cheesemaking. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 951-958, 1998a.

RUAS-MADIEDO, P.; ALONSO, L.; DE LLANO, D. G.; REYES-GAVILÁN, C. G. de. Growth and metabolic activity of a cheese starter in CO₂-acidified and non-acidified refrigerated milk. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, v. 206, p. 179-183, 1998b.

RUAS-MADIEDO, P.; ALONSO, L.; DELGADO, T.; BADA-GANCEDO, J. C.; REYES-GAVILÁN, C. G. Manufacture of Spanish hard cheeses from CO₂-treated milk. **Food Research International**, v. 35, n. 7, p. 681-690, 2002.

RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J. C.; DELGADO, T.; GUEIMONDE, M.; REYES-GAVILÁN, C. G. Proteolysis in rennet-coagulated Spanish hard cheeses made from milk preserved by refrigeration and addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 115-122, 2003.

SABOYA, L. V.; OLIVEIRA, A. J.; FURTADO, M. M.; SPADOTI, L. M. Efeitos físico-químicos da adição de leite reconstituído na fabricação de queijo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 368-378, 1998.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrótróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 145-154, 2001.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza-CE. **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 13, n. 1, p. 31-36, 1995.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. da. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SÃO PAULO. Comunicado Conjunto CVS / IAL nº 1/03 de 15 de janeiro de 2003. Tornam público os resultados do Programa de Análise Fiscal de Alimentos – Programa Paulista 2002, instituído pelo Centro de Vigilância Sanitária em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz. Secretaria do Estado da Saúde. **Diário Oficial**, Estado de São Paulo, 01 fev. 2003, seção 1. Suplemento.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ALVES, R. M. V.; OLIVEIRA, L. M.; GOMES, T. G. **Embalagens com atmosfera modificada**, 2 ed. Campinas: CETEA/ITAL, 1998. 114p.

SHARPE, E. Lactic Acid Bacteria in the Dairy Industry. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 1979.

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

SILVA, I. M.M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 241-248, 2003.

SILVA, M.C.D., HOFER, E., TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.

SCHLEIFER, K.H.; EHNNANN, M.; REUNFOLAR, C.; BROCKMANN, E.; LUDWIG, W.; AMANN, R. Application of molecular methods for the classification and

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

identification of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 1081-1089, 1995.

SPADOTI, L.M. **Avaliação de propriedades do queijo tipo Prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação**. 2003. 228 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ST-GELAIS, D., CHAMPAGNE, C. P., BÉLANGER, G. Production of Cheddar cheese using milk acidified with carbon dioxide. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 11, p. 614-618, 1997.

STRETTON, S.; MARSHALL, K. C.; DAWES, I. W.; GOODMAN, A. E. Characterization of carbon dioxide-inducible genes of the marine bacterium *Pseudomonas* sp. S91. **FEMS Microbiology Letters**, v. 140, n. 1, p. 37-42, 1996.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-40, 1997.

UCEDA, R.; PICÓN, A.; GUILLEN, A. M.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Characteristics of Manchego cheese manufactured from ewe raw milk preserved by addition of carbon dioxide or by activation of the lactoperoxidase system. **Milchwissenschaft**, v. 49, n. 12, p. 678–683, 1994.

UPRETI, P.; METZGER, L. E. Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: Manufacture and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 420-428, 2006.

USTUNOL, Z.; HICKS, C.L. Effect of calcium addition on yield of cheese manufactured with *Endothia parasitica* protease. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 1, p. 17-25, 1990.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VAN DENDER, A. G. F.; MORENO, I. Estudos de processos alternativos para fabricação de queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 47, n. 279-281, p. 76-77, 1992.

VIEIRA, M. A. S. **Controle de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijo Minas frescal através de tratamento termoquímico**. Campinas, 2000. 195p. Tese (Doutora em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

VIOTTO, W. H.; CAMPOS, A. C. Proteolysis during refrigerated storage of Minas Frescal cheese. In: Cheese Ripening and Technology IDF Symposium, 2000, Banff, Canada. **Abstracts of IDF Symposium**. Brussels: International Dairy Federation, v. 1, p. 119, 2000.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy Technology — Principles of Milk Properties and Processes**. New York: Marcel Dekker, 1999. 727 p.

WARBURTON, D. W.; FARBER, J. M.; BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: CANADA. Health and Welfare. **Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analytical of foods**, [MFHPB 30]. Ottawa: Polyscience, 1991.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; FURTADO, M. M., MUNCK, A. V. Estudo da fabricação de queijo Minas Frescal com ácido láctico em substituição do fermento láctico, **Anais do V Congresso Nacional de Laticínios**, EPAMIG/ ICLT, p. 160-182, 1978.

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

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZENG, S.S.; SORYAL, K.; FEKADU, B.; BAH, B.; POPHAM, T. Predictive formulae for goat cheese yield based on milk composition. **Small Ruminant Research**, v. 69, Issue 1-3, p. 180-186, 2007.