EXTENSÃO E PROFUNDIDADE DE PROTEÓLISE EM QUEIJO MINAS FRESCAL (*)

Extent and depth of proteolysis in minas and "frescal" cheeses(*)

Alan Frederick Wolfschoon Pombo (**)
Achson de Lima (***)

RESUMO

O trabalho detalha os aspectos relacionados com o índice analítico de maturação de queijo minas frescal, visando o controle da proteólise. A extensão da proteólise incluiu determinações do nitrogênio solúvel, do nitrogênio de alto peso molecular e do nitrogênio aminoacídico; a profundidade da proteólise agrupou as determinações do nitrogênio de baixo peso molecular, como, por exemplo, dados de NPN e outros, liberados pela atividade das peptidases, incluindo também as determinações dos conteúdos relativos das caseínas íntegras e hidrolisadas. Os dados típicos, para os queijos minas fabricado com ácido lático e com fermento, foram apresentados.

INTRODUÇÃO

Durante a fabricação, maturação e vida-de-prateleira do queijo, ocorrem mudanças ou transformações nos carboidratos, lípides e proteínas. Estas transformações devem-se principalmente às carboidrases, lipases e proteases, isto é, às enzimas fornecidas pelas bactérias usadas como fermento (chamados "starters"), às enzimas naturais do leite, às enzimas da flora láctica do leite e ao próprio coalho utilizado na fabricação.

Na maioria dos alimentos (fermentados) ricos em proteínas, a proteólise, lipólise e glicólise são os fatores principais para as mudanças na textura, na consistência e no "flavour" do produto. É evidente então, que a degradação da proteína, a proteólise, o seu controle analítico representam um fator de qualidade do produto, no nosso caso, o queijo, indicando-nos seu estágio de maturação.

Uma das melhores formas para expandir o consumo de queijos a baixo custo seria modificar o método de fabricação e fazer com que o tempo de maturação fosse curto (para queijos curados) e/ou que a vida útil (chamada "shelf-life") ou de prateleira fosse maior (queijos frescais).

Expressado em forma simples, o queijo pode ser considerado como sendo formado de três componentes, ou seja, de gordura, de água e de extrato seco desengordurado. E :e último é formado principalmente pela caseína. Além disto, podemos imaginar o queijo como uma estrutura ou matriz de caseína, na qual encontram-se presos ou retidos os outros componentes, isto é, a gordura e o soro (a água) e nestes elementos dispersos molecularmente, como a lactose, sais, proteínas solúveis, etc.

Numerosos trabalhos têm sido realizados no mundo inteiro para estudar as transformações que ocorrem nos principais componentes do queijo, gordura, proteína e lactose durante a maturação. Entretanto, revisando a literatura pertinente, encontramos que pouquíssimos trabalhos têm sido conduzidos no Brasil sobre os nossos queijos típicos. Devemos mencionar aqui os trabalhos (recentes) pioneiros apresentados em Congressos anteriores, por Wandeck e Bonassi com relação a ácidos graxos.

A grande demanda de queijo de boa qualidade tem conduzido à realização de trabalhos de pesquisa no DPTA/ILCT-EPAMIG, como os estudos realizados por Wolfschoon-Pombo *et al.* (1978) sobre modificações na tecnologia de fabricação do queijo Minas frescal, onde verificou-se um amento no rendimento, na vida útil do queijo e melhores características organolépticas quando se utiliza ácido láctico em substituição ao fermento láctico.

Recentemente realizamos um estudo das mudanças bioquímicas que ocorrem durante a maturação e vida-de-prateleira de queijos prato e minas frescal. Este último, como o nome indica, é um queijo consumido sem necessidade de ser maturado. Entretanto, o processo de fabricação (adição de ácido láctico ou fermento) influencia decisivamente na consistência, sabor e durabilidade do produto. Nosso propósito é o de conhecer melhor as causas destas diferenças e para isto, acompanhamos por um lado, a proteólise em ambos os tipos de queijo durante sua vida de prateleira e, por outro, a fermentação da lactose e sua relação com a acidez e pH.

1.0 Extensão e profundidade da proteólise

Tratamos aqui de alguns índices que podem ser

(*) Trabalho realizado no Centro de Pesquisa e Ensino/Instituto de Laticínios Cândido Tostes e apresentado no VII Congresso Nacional de Laticínios no período de 19 a 23 de julho de 1982.

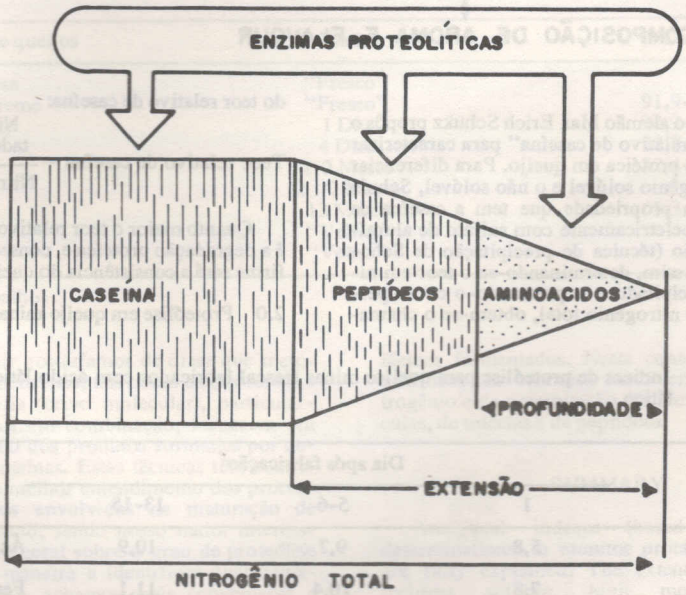
(**) Professor e Pesquisador Ex-Chefe do Laboratório de Físico-Química do CEPE/ILCT; Endereço atual: Kraft G.F. R&D Unterbibergersts, 16 – 8000 – München 83 – República Federal da Alemanha.

(***) Técnico em Química e auxiliar de pesquisa do Laboratório de Físico-Química do CEPE/ILCT – Rua Tenente Freitas, 116 – 36045 – Juiz de Fora-MG (Composto e impresso em 10/04/91)

utilizados no controle analítico da proteólise em queijos, e comparamos estes índices em queijos Minas frescal fabricados com ácido láctico e com fermento láctico.

A proteólise do queijo é considerada resultante de várias atividades enzimáticas (proteinases, peptidases) sendo que os principais contribuintes são a quimosina (renina, coalho) e enzimas do fermento láctico. Organismos por ventura presentes como resultado de contaminação casual também poderiam contribuir para essa degradação. Além da ação específica que tem a quimisina de quebrar a ligação Phe_{105} e Met_{106} da K-caseína, aceita-se que a quimosina possui ainda uma atividade proteolítica não específica, que hidrolisa a para - K - caseína em grandes peptideos. Por outro lado, as bactérias do "starter" liberam peptídeos da caseína através das proteinases que eles produzem, sendo que alguns desses peptídeos (hidrófobos) podem causar sabor amargo. Os *"streptococci"* produzem uma variedade de peptidases, que podem liberar aminoácidos dos peptídeos produzidos, tanto pela quimosina como pelas proteinases do "starter". A protease natural do leite contribui em menor grau, formando pequenos peptídeos e aminoácidos. A Figura 1 sintetiza esquematicamente a proteólise da caseína:

Figura 1 Conceitos de extensão e de profundidade de proteólise em suas formas aplicáveis à digestão da caseína



Em 1894 sugeriu Bondzynski os substantivos "extensão" e "profundidade" para designar as mudanças na proteólise do queijo. A "extensão" da proteólise se caracteriza pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis acumuladas durante o processo, e expressadas como percentagens do nitrogênio total:

$$\text{Extensão} = \frac{\text{Nitrogênio solúvel x 100}}{\text{Nitrogênio Total}}$$

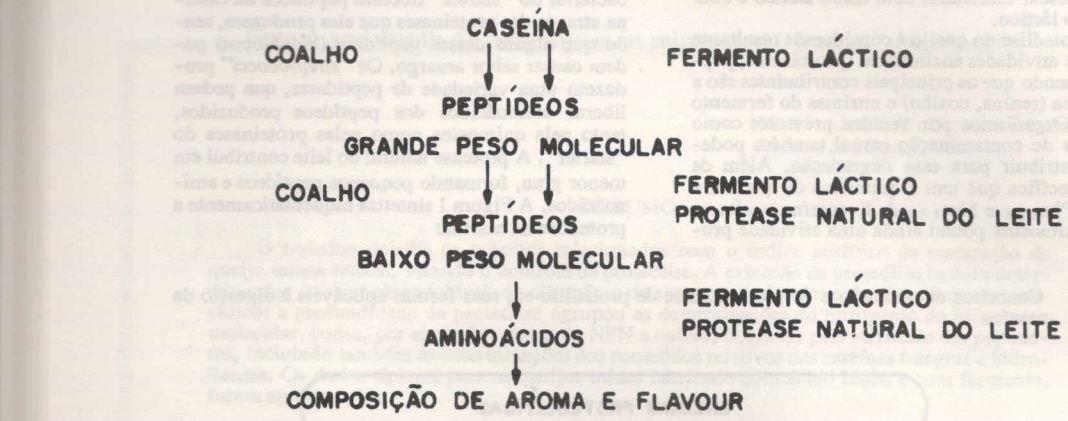
Isto é melhor conhecido no nosso meio como "índice de maturação". Sua determinação analítica é baseada na precipitação isoelétrica da caseína a pH < 4,6 em uma amostra diluída do queijo e quantificação das substâncias solúveis através do método de Kjeldahl.

A "profundidade" da proteólise abrange as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, acumuladas durante o processo. Compostos característicos são os aminoácidos, oligo-peptideos, aminas etc. A profundidade pode ser quantificada pelo teor em nitrogênio não protéico, solúvel em ácido tricloroacético, ou pela determinação direta dos aminoácidos produzidos e expressados como percentual da proteína solúvel total. Geralmente, utiliza-se o teor em nitrogênio não protéico (NPN):

$$\text{Profundidade} = \frac{\text{Nitrogênio Não Protéico x 100}}{\text{Nitrogênio Solúvel Total}}$$

Entende-se por NPN aquelas substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular que não precipitam na presença de ácido tricloroacético a 12%. A Figura 2 representa graficamente os efeitos simultâneos das atuações do coalho e dos fermentos:

FIGURA 2 Efeitos simultâneos das atuações do coalho e dos fermentos



O químico alemão Max Erich Schukz propôs o termo "teor relativo de caseína" para caracterizar a degradação protéica em queijo. Para diferenciar entre o nitrogênio solúvel e o não solúvel, Schulz utilizou uma propriedade que tem a caseína de precipitar isoeletricamente com sulfato de alumínio e potássio (técnica de precipitação de Scholossaman). Assim, determinando-se o teor em nitrogênio precipitado e expressando-o como percentagem do nitrogênio total, obtem-se o chamado teor relativo de caseína:

$$\text{Teor relativo de caseína} = \frac{\text{Nitrogênio precipitado com alume}}{\text{Nitrogênio total x 100}}$$

Quanto maior o teor relativo de caseína, menor é a degradação proteíca e, conseqüentemente, mais firme será a consistência do queijo.

2.0 Proteólise em queijo minas frescal

TABELA 1 Índices de proteólise para queijos minas frescal fabricados com ácido lático e com fermento lático

	Dia após fabricação			Método de fabricação
	1	5-6	13-15	
N-Solúvel(a)	5,8	9,7	10,9	Ácido láctico
N-Total	7,8	10,4	11,1	Fermento
NPN (b)	–	3,6	5,8	Ácido láctico
N-Total	–	6,5	7,7	Fermento
NPN (b)	–	39,3	54,3	Ácico láctico
N-Solúvel	–	61,8	69,5	Fermento
% Relativa	94,2	90,9	89,0	Ácido láctico
Caseína	92,1	89,6	88,1	Fermento

(a) Extensão
(b) Profundidade

Na Tabela 1 observa-se que os queijos fabricados com fermento láctico apresentam extensão (N-solúvel/N total) e profundidade (NPN/N-Total, NPN/N-Solúvel) da proteólise muito maior que os queijos fabricados com ácido láctico. Da mesma forma, a degradação da proteína, expressada como o teor relativo de caseína, é também maior nos queijos fabricados com fermento láctico. Assim, pode-se atribuir a menor firmeza desses queijos à maior proteólise que ocorre nos mesmos.

A extensão, que se deve principalmente à ação proteolítica do coalho sobre as caseínas do queijo, deveria, em princípio, ser igual para ambos os queijos; entretanto, é um pouco maior no queijo fabricado com fermento láctico, visto que as enzimas do "starter" são capazes de atacar a para K-caseína no queijo e convertê-las em produtos (nitrogenados) solúveis, independentemente dos produtos de degradação do coalho (residual). Pesquisas já demonstraram a atividade proteolítica que exercem tanto o *"Streptococcus lactis"* como o *"Streptococcus cremoris"* sobre a e β-caseína. Essa ação proteolítica se manifesta durante a própria fabricação como demonstra o índice de 7,8 encontrado após um dia. As proteases (peptidases) do fermento láctico atuam sobre os peptídeos liberados principalmente devido a ação do coalho, com o que se formam mais aminoácidos e compostos de baixo peso molecular, fato bem ilustrado pela Tabela 1, onde se comparam os índices de profundidade após 5-6 dias e após duas semanas de fabricação. Evidentemente, ninguém irá vender um queijo frescal com mais de uma semana de fabricação, mas é notável a diferença na profundidade da proteólise entre os dois queijos, mesmo após 2 semanas.

O teor relativo de caseína do queijo fabricado com ácido láctico é superior ao do queijo com fermento: após 1 dia 94,2% vs. 92,1% e após aproximadamente uma semana: 90,9% vs. 89,6%. A Tabela 2 mostra o teor relativo em caseína para alguns queijos, segundo determinado por Schulz (1953).

TABELA 2 Teor relativo de caseína de alguns queijos de acorco com Schulz.

Tipos de queijos	Idade	% Caseína
Quark Sobremesa	"Fresco"	98,6
Quark Duplo Creme	"Fresco"	91,9-96,7
Minas Frescal (a)	1 Dia	92,9-94,2
Prato (a)	4 Dias	92,2-94,9
Gouda	1-2 Meses	82,4-84,7
Provolone	2 1/2 Meses	87
Parmesão	13 Meses	65,3-69,8
Roquefort	"Velho"	37,8
Gorgonzola	"Velho"	39,5

(a) Nosso trabalho

Para concluir gostaríamos de dizer que metodos analíticos modernos, tais como electroforese e gel-cromatografia (crivo molecular), particularmente se usados em combinação, fornecem um quadro detalhado dos produtos formados por degradação de proteínas. Estas técnicas têm contribuido muito ao melhor entendimento dos processos proteolíticos envolvidos na maturação de queijos. Entretanto, sendo nosso maior interesse uma informação geral sobre o grau de proteólise no queijo, de maneira a identificar qualitativamente o produto, achamos mais conveniente e apropriado às nossas condições o uso de técnicas e índices mais simples, como os aqui expostos. Assim perguntas sobre a consistência de um queijo, que depende principalmente da sua umidade, gordura e componentes protéicos não dissolvidos, podem ser parcialmente respondidas quantificando-se as diferentes formas de nitrogênio ("proteínas"). Ficou demonstrado que a diferença observada na consistência do queijo minas frescal, fabricado pelos processos ácido láctico e fermento láctico, é parcialmente devida às diferenças na extensão e profundidade da proteolíse e degradação da caseína em ambos os casos.

CONCLUSÃO

Os conceitos de extensão e profundidade de proteólise são adotados como atributos de controle de qualidade na produção de queijos e produtos lácteos fermentados. Neste contexto, os índices analíticos são baseados em determinações de nitrogênio e na precipitação discrecionária de moléculas, de micelas e de peptídeos.

SUMMARY

Analytical indexes (based on nitrogen determinations) to monitor proteolysis in cheese are fully explained. The extent of proteolysis includes soluble, high molecula weight compounds, broken down from caseins due to proteases; the depth of proteolysis gathers low molecular weight substances, such as aminoacids NPN etc, released by peptidases etc. and the relative casein content, which measures unbro ken casein in cheese. Typical figures for minas frescal – cheese made by lactic acid addition and by using starters, are comparatively given for 1,56 and 13-15 days after manufacture and related cheese consistency.

BIBLIOGRAFIA

Behnke, V. Zur biogene de Kasearoma. *Die Nahrung*, R.D.A *24*(1): 71-83, 1980.

Bonassi, I.A. Ácidos graxos livres voláteis em alguns queijos fabricados no Brasil. In: *Congresso Nacional de Laticínios, 4.*, Juiz de Fora, 1977 Anais... Juiz de Fora, EPAMIG, 1977.

Chikuma, G.; Yoshino, M. & Furukawa, S. Studies on the promotion of cheese ripening, III. Influence of bacterium and enzymes. *Bull. Nat. Inst. Anim, Ind., (35):* 146-7, 1979.

Desmazeaud, M.J.; Gripon, J.C., Le Bars, D. & Bergere, J.L. Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organisms. *Le Lait,* Paris, *56*(557): 379-96, 1976.

Gripon, J.C.; Desmazeaud, M.J. Le Bars, D. & Bergere, J.L. Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la presure commerciale. *Le Lait,* Paris, *55*(548): 502-16, 1975.

Kleter, G. The ripening of gouda cheese made under strictly aseptic conditions. 2. The comparison of the activity of different starters and the influence of certains lactobacillus strains. *Neth. Milk Dairu J.,* Netherlands, *31* (3): 177-87, 1977.

Law, B.A. The formation of aroma and flavour compounds in fermented dairy products. *Dairy Sci. Abstr.,* Inglaterra, *4* (3): 143-54, 1981.

Mogensen, M.T.S., *Meddlande Statens Majeriforsok, 21*:281-436, 1948.

Noomen, A. A rapid method for the estimation of the dissolued and the undissolued nitrogen compounds in cheese. *Neth. Milk Dairy J.,* Netherlands, *31*(3): 163-76, 1977.

Schormuller, J. The chemistry and biochemistry of cheese ripening. *Ad Food Res.,* New York, *16*:231-334, 1968.

Schylz, M.E. Der relative Kaseingehaft von kase. In: *International Dairy Congress,* 13, La Haye, 1953. p. 576-9.

Steffen, C. Kessiunabhangige kulturen - sonderbruck aus. *Schweiz. Milchzeitung, 103*(46): 334-5; (50):364; (52):380, 1977.

Visser, F.M.W. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in gouda cheese. 2. Development for bitterness and cheese flavour. *Neth. Milk Dairy J.,* Netherlands, *31*(3): 188-209, 1977.

Visser, F.M.W. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in gouda cheese. 3. Protein breakdown: analysis of the solube nitrogen and amino acid nitrogen fractions. *Neth. Milk Dairy J.,* Netherlands, *31*(3): 210-39, 1977.

Wandeck, F.A. Ácidos graxos livres durante a maturação de queijos brasileiros. *Rev. Inst. Latic. Cândidos Tostes,* Juiz de Fora, *28*(169):1-8, 1973.

Whitaker, J.R. Biochemical changes ocurring the fermantation of hight-protein foods. *Food Technol.,* Chicago, *32*(5): 175-80, 1978.

Wolfschoon-Pombo, A.F.; Furtado, M.M. & Munck, A.V. Estudo da fabricação do queijo minas frescal em ácido lático em substituição do fermento láctico. In: *Congresso Nacional de Laticínios, 5., Juiz de Fora, 1978, Anais...* Juiz de Fora, EPAMIG, 1978. p. 160-82

CENELAT central de negócios

R. Dr. Rubens Meireles, 307
CEP 01141 São Paulo Capital
Telefones: PABX (011) - 872.7388
Telex: (011) 35711 CCNL-BR
Telex: (011) 27179 DMSI-BR
Fax: (011) 872.5495

BALCÃO DE CONSULTAS
Por telefone ou pessoalmente solicite quaisquer informações sobre LATICÍNIOS, seja em relação a produtos, máquinas e equipamentos, produtos químicos etc.

MERCADO

MERCADO-PERCAÚDO	PARMESÃO sem cura	PARMESÃO curado	PRATO pequeno	PRATO grande	[illegible]	[illegible]
Produção	Estável	Estável	Estável	Estável	Estável	[illegible]
Cotação Cr$/Kg	350,00 410,00	460,00 550,00	310,00	330,00 380,00	410,00	[illegible]
Condições pag.	30 dd	30 dd	45 dd	30 dd	30 dd	[illegible]
Análise	Oferecido	Estável	Estável	Estável	Estável	[illegible]
Observações	ICMS AC CIF/SP	ICMS AC CIF/SP	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

OFERTA-OFERTA	OFERTA		OFERTA		OFERTA	
Quantidade	12 t	30 t				
Preço / kg	400,00	550,00				
Condições pag.	30 dd	30 dd				
Observações	ICMS 12% FOB	ICMS 12% FOB				

PROCURA-PROCURA	PROCURA		PROCURA		PROCURA	
Quantidade				15 t		
Preço / kg				330,00		
Condições pag.				30 dd		
Observações	S/C	S/C		ICMS 12% CIF/SP		

ATENÇÃO: A cotação é referente para atacadistas do Setor, para atos varejo, [illegible] Informações - para mais ou para menos [illegible]

CÓDIGO

2434 OE - Embaladeira de leite, marca Tec Pa[illegible]
Embaladeira de leite, mod. Massum [illegible]
Embaladeira de leite, mod. Prepac, [illegible]
Embaladeira de leite, mod. Braspak, [illegible]
Máquina p/ dosar e selar copos ou [illegible]

2436 OE - Caldeira, marca Navarra, mod. [illegible]
Batedeira queijomatic, marca Brasi[illegible]
Compressor de 10 HP, RA 24018, [illegible]
Compressor de 7,5 HP, RA 24016, [illegible]
Filadeira de mussarela cestari, mod. [illegible]
Máquina de embalar selocip, mod. [illegible]
Moldadeira de manteiga gasolli para [illegible]
Prensa blasinox com capac. para 240 [illegible]
Prensa blasinox com capac. para 120 [illegible]

2437 OE - Tubo p/ secagem polpa de fruta, 90 [illegible]
sem marca;
Homogenizador, marca Ranie, capac. [illegible]

2438 OE - Compressor completo, c/ forçador de [illegible]

2439 OE - Balança, marca Corball, capac. 1000 [illegible]
Máquina p/ embalar selovac, mod. 4,0 [illegible]

2440 OE - Pasteurizador Mix 110, marca Inadal, [illegible]
Tina de maturação 160 lts.
Batedeira [illegible]