Recebido em 19/06/9
OK LILACS

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

PROTEÓLISE EM QUEIJO TIPO PRATO DURANTE A MATURAÇÃO

VERA LÚCIA SIGNORELI BALDINI

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

ORIENTADOR: Prof. Dr. Franco Maria Lajolo

SÃO PAULO

1998

16031

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002349

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Baldini, Vera Lúcia Signoreli
B177p Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação / Vera Lúcia Signoreli Baldini. -- São Paulo, 1998.
208p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Lajolo, Franco Maria

1. Ciência dos alimentos 2. Bromatologia I. T. II. Lajolo, Franco Maria, orientador.

641 CDD

VERA LÚCIA SIGNORELI BALDINI

PROTEÓLISE EM QUEIJO TIPO PRATO DURANTE A MATURAÇÃO

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Prof. Dr. Franco Maria Lajolo (Presidente/Orientador)

Prof. Dr. José Leonardo Etore do Vale

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Prof. Dr. Ursula Maria Lanfer Marquez

Prof. Dr.Luiz Antônio Gioielli

São Paulo, 01 de Junho 1998

Aos meus pais, pelo exemplo de força e coragem.
Obrigada por me ensinarem que se pode chegar a qualquer lugar
quando se tem paciência. E para se chegar,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.
E acima de tudo, que é preciso querer.

Aos meus irmãos e aos meus sobrinhos,
pela amizade, união e constante incentivo.
Obrigada por fazerem tudo valer a pena.

AGRADECIMENTOS

A somatória de esforços para a concretização de um trabalho transcendem no tempo, acumulando-se dia após dia. Assim, na impossibilidade de agradecer a todos, gostaria de expressar gratidão em especial a:

Ao meu orientador Prof. Dr. Franco Maria Lajolo, pelo apoio, amizade e confiança na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Patrick F. Fox, da University College Cork (UCC), Irlanda, pela acolhida em seu laboratório, orientação e amizade.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, pela oportunidade e facilidades concedidas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) - Programa RHAE, pelo auxílio ao treinamento realizado na UCC e à FAPESP pelo apoio financeiro, que viabilizou a execução do trabalho.

À Professora Úrsula Lanfer Marquez, ao Professor Valdemiro Carlos Sgarbieri e ao Dr. José Leonardo Etore do Valle pelo exame prévio do trabalho e pelas valiosas sugestões.

Ao pessoal do TECNOLAT - ITAL, em especial à Ariene G. F. Van Dender e à Adriana T. Silva, pela grande colaboração na fabricação dos queijos e pela amizade.

Aos amigos do Department of Food Chemistry - UCC, em especial ao Eamon e ao Tanoj, pela ajuda e por terem tornado minha estadia na Irlanda tão agradável.

À estatística e quase Dra. Nilda Doris Montes Villanueva, pela amizade e pela orientação nas análises estatísticas.

À Moema R. dos Santos, pela atenção e revisão das referências bibliográficas.

Ao Pádraig e à Fionnuala. O tempo de descanso foi pequeno mas, em suas companhias, foi suficiente para conhecer a beleza de West Cork. Alguns momentos como as trilhas em direção ao "The Sheep's Head", Cliffs of Moher, The Burren, são inesquecíveis.

Aos colegas e amigos do ITAL e em especial do laboratório de Bioquímica, tanto aqueles que passaram como os que ainda estão por aqui, que de uma maneira ou de outra, me incentivaram em todos os momentos, fáceis ou difíceis. Aos estagiários, em especial à Carla D. Rosa, Luciana Barbaro, Roberta Roesler e Cláudia F. Giachero, pela convivência agradável e pela oportunidade de repartir experiências. Grande abraço!

À Denise Jardim, pela amizade, confiança e pelo encorajamento em todos os momentos.

À amiga Sônia Dedeca S. Campos, pela amizade e pelo incentivo à carreira científica. Se as palavras pudessem dizer o que vai no coração, ainda assim seria impossível traduzir em palavras tanto carinho, dedicação e amizade. O grande Milton, em sua arte eterna, traduziu bem: *"...Amigo é coisa pra se guardar debaixo de sete chaves, dentro do coração..."*.

A Deus, pela presença constante em minha vida.

A todos que, com seu apoio e compreensão, contribuíram para que este trabalho se efetivasse.

Muito obrigada!

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO....1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....4
2.1. Considerações sobre o queijo....4
2.1.1. Sistema protéico do leite....8
2.2. Fabricação de queijos....11
2.2.1. Seleção e pré-tratamento do leite....12
2.2.2. Acidificação....14
2.2.3. Coagulação....16
2.2.4. Operações pós-coagulação....18
2.3. Maturação de queijos....20
2.3.1. Alterações bioquímicas durante a maturação....21
2.3.1.1 Glicólise....21
2.3.1.2. Lipólise....25
2.3.1.3. Proteólise....28
2.4. Agentes proteolíticos no queijo....30
2.4.1. Coagulante....30
2.4.1.1. Contribuição do coagulante na maturação de queijos....32
2.4.2. Proteinases nativas do leite....35
2.4.2.1. Contribuição da plasmina na maturação de queijos....36
2.4.3. Enzimas proteolíticas do fermento....38
2.4.3.1. Contribuição das proteinases e peptidases do fermento na maturação de queijos....45
2.5. Significado da proteólise....48
2.5.1. Proteólise e textura....49
2.5.2. Contribuição da proteólise no "flavour" de queijos....52
2.6. Métodos utilizados para a avaliação da proteólise em queijos....56
2.6.1. Fracionamento das substâncias nitrogenadas em queijos....57
2.6.2. Métodos para a medida direta da proteólise em queijos....65

2.6.3. Técnicas para a separação dos peptídeos individuais....73
2.6.3.1. Análise eletroforética de queijos....73
2.6.3.2. Métodos cromatográficos para a avaliação da proteólise em queijos....76
2.7. Considerações sobre o queijo Prato....85
3. OBJETIVOS....91
4. MATERIAL E MÉTODOS....92
4.1. Matéria-prima....92
4.2. Amostragem....92
4.3. Determinações analíticas....93
4.3.1. Análises físicas e químicas....94
4.4. Fracionamento das substâncias nitrogenadas....96
4.4.1. Obtenção das frações para avaliação direta da proteólise....96
4.4.2. Obtenção das frações para análise por eletroforese e RP-HPLC....97
4.4.2.1. Nitrogênio solúvel em água e em pH 4,6....97
4.4.2.2. Fracionamento do extrato solúvel em água com etanol 70%....98
4.5. Métodos para avaliação direta da proteólise....98
4.5.1. Determinação dos índices de extensão (IEM) e de profundidade da maturação (IPM)....98
4.5.2. Determinação dos teores de tirosina e triptofano....99
4.5.3. Determinação dos teores de aminoácidos livres totais....99
4.5.3.1. Reação com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)....99
4.5.3.2. Reação com ninidrina-cádmio....100
4.6. Métodos para a separação dos peptídeos individuais....100
4.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE)....100
4.6.2. Análise de peptídeos por HPLC, em coluna de fase reversa (RP-HPLC)....103
4.6.3. Determinação dos aminoácidos livres individuais....103
4.7. Determinação instrumental do perfil de textura....104
4.7.1. Preparo das amostras para TPA....104
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO....105
5.1. Análises físicas e químicas do leite, soro e coalhada....105
5.2. Análises físicas e químicas dos queijos....106

5.3. Avaliação direta da proteólise 111
5.3.1. Extensão e profundidade da maturação 112
5.3.2. Teores de tirosina e triptofano 117
5.3.3. Formação de grupamentos amínicos em decorrência da proteólise. Reação com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e com ninidrina-cádmio 119
5.4. Métodos específicos para avaliação da proteólise 125
5.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) 130
5.4.2. Análise de peptídeos por HPLC, em coluna de fase reversa 143
5.4.3. Aminoácidos livres individuais 154
5.5. Perfil de textura 157
6. CONCLUSÕES 164
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 167
8. RESUMO 207
9. SUMMARY 208

1. INTRODUÇÃO

A maturação de queijos envolve um conjunto de modificações microbiológicas, bioquímicas e químicas, no qual se desenvolvem as características de aroma, sabor, textura e aparência próprias do tipo de queijo. As principais modificações que ocorrem durante este processo são proteólise, lipólise e glicólise, caracterizadas por transformar uma massa incolor, insípida e sem forma definida, em um produto com aroma, sabor, formato e coloração próprios. Além das modificações físicas facilmente perceptíveis, como aquelas responsáveis pela textura e plasticidade, existem outras que levam à degradação dos diversos componentes do leite, até a obtenção de compostos mais simples. Estas reações são catalisadas por enzimas de origem microbiana provenientes do próprio leite ou adicionadas ao meio (LAW, 1987). A maturação é geralmente um processo lento, variando desde apenas algumas semanas (queijo tipo Mussarela), até mais que dois anos (queijos tipo Cheddar e Parmesão).

A proteólise é provavelmente o fenômeno mais importante que ocorre durante a maturação da maioria dos tipos de queijos e influencia fortemente suas características de textura e "flavour" (GRAPPIN et al., 1985; RANK et al., 1985). No caso do queijo Prato, onde a maturação é um processo predominantemente proteolítico, é de se ressaltar a sua importância na definição de suas qualidades organolépticas (LAW, 1987).

Uma combinação de endopeptidases, provenientes do coalho, das bactérias do fermento láctico, do inóculo secundário, das proteinases nativas do leite (plasmina) e de eventuais contaminantes que resistem à pasteurização ou atingem o leite ou coalhada durante a fabricação do queijo, atuam nas proteínas do queijo, quebrando sua estrutura e originando mudanças no corpo e textura. Estas enzimas também fornecem peptídeos que atuam como substratos, principalmente para as enzimas intracelulares da microflora do queijo, responsáveis pela liberação de

aminoácidos. Supõe-se que os aminoácidos contribuam para o desenvolvimento do "flavour" característico no queijo e que sejam precursores de seus componentes voláteis (LAW, 1987).

Os agentes proteolíticos descritos anteriormente agem em conjunto, promovendo uma hidrólise parcial da para-caseína a peptídeos e aminoácidos. A principal via de degradação proteolítica parece envolver uma hidrólise primária limitada da para-caseína pelo coalho residual e/ou plasmina a polipeptídeos que, a seguir, são degradados pelo sistema proteinase/peptidase das bactérias do fermento e da contaminação eventual, a peptídeos e aminoácidos (FOX, 1989, 1993; LAW, 1987). Durante o processo de maturação as mudanças que ocorrem no corpo e textura de queijos são atribuídas principalmente à quebra de αs_1-caseína, uma vez que esta proteína apresenta fortes interações com outras caseínas, formando uma rede estrutural que é enfraquecida quando as ligações de αs_1-caseína são rompidas (CREAMER & OLSON, 1982).

A detecção e medida dos produtos de hidrólise das proteínas dos queijos são usadas como índices de maturação, uma vez que a proteólise está ligada ao desenvolvimento de textura e sabor característicos na maioria dos tipos de queijos. Os principais métodos para separação de proteínas intactas, dos peptídeos e dos aminoácidos provenientes da hidrólise se baseiam na precipitação fracionada (com ácidos ou solventes), eletroforese e cromatografia.

A precipitação fracionada ou a solubilização das proteínas pela ação de enzimas proteolíticas, oferece a base dos métodos mais simples e rápidos para a medida da quantidade de proteínas do queijo. A solubilidade em água ou em pH 4,6 são, provavelmente, os métodos mais usados para o fracionamento inicial dos compostos nitrogenados do queijo, ou como um índice bruto de proteólise.

Enquanto os métodos de fracionamento das proteínas medem apenas a proteólise geral dos queijos, as técnicas de eletroforese e de cromatografia, que se baseiam na separação de proteínas com base no peso molecular, permitem o acompanhamento da hidrólise da caseína em componentes menores, contribuindo dessa forma, para o melhor entendimento dos processos proteolíticos envolvidos na maturação.

Vários métodos espectrofotométricos têm sido usados para se medir as quantidades de nitrogênio amínico em frações de queijos, como alternativas ao método de Kjeldahl, geralmente trabalhoso e demorado.

No Brasil, praticamente não existem estudos sobre a proteólise em queijo tipo Prato e os conhecimentos das modificações bioquímicas relacionadas com a maturação das variedades de queijos são escassos. Assim sendo, torna-se importante um estudo mais aprofundado dos mecanismos de degradação dos macrocomponentes do leite, ao longo do processo de maturação do queijo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Considerações sobre o queijo

Queijo é o nome genérico dado a um grupo de alimentos fabricados a partir do leite, com mais de 500 variedades conhecidas e produzidas mundialmente, além da existência de outras menores e/ou locais (BURKHALTER, 1981; FOX, 1987).

A fabricação de queijos é uma atividade antiga; serve para concentrar seletivamente os constituintes mais importantes do leite (gorduras e proteínas), tornando-a um exemplo clássico de preservação de alimentos.

Acredita-se que o queijo tenha se originado a uns 8.000 anos atrás no Iraque, entre os rios Tigre e Eufrates. Sua produção provavelmente tenha surgido por acidente: o clima quente favorecia o crescimento de microrganismos produtores de ácidos, levando à acidificação do leite durante a estocagem, originando produtos fermentados ou queijos produzidos por ação de ácidos. Estes queijos provavelmente precederam aqueles feitos por coagulação enzímica, que atualmente são os predominantes. Também, é possível que os nômades árabes estocassem o leite em recipientes feitos de estômagos de animais; as enzimas eram extraídas dos tecidos pelo contato com o leite e a microflora produzia ácido. A produção de ácido por bactérias e a hidrólise enzímica das caseínas aconteciam pelas altas temperaturas, e resultavam na formação de géis. Agitação, por exemplo, durante a viagem, quebrava o coágulo dando origem à coalhada e ao soro (FOX, 1987).

Acredita-se que os nômades bebiam o soro e estocavam a coalhada para uso posterior, após secagem e salga. O Império Romano foi o primeiro maior

produtor de queijo e contribuiu consideravelmente para o desenvolvimento da tecnologia e sua difusão pelo mundo. Mais tarde, os mosteiros foram particularmente importantes para o desenvolvimento de muitos tipos de queijos.

A fabricação de queijos permaneceu mais como uma arte do que como uma ciência durante muito tempo. Com a aquisição gradual de conhecimentos sobre a bioquímica e a microbiologia do leite e do queijo, foi possível controlar melhor as mudanças envolvidas na fabricação, dando uma qualidade mais consistente às variedades existentes, e as novas foram desenvolvidas em conseqüência das pesquisas (FOX, 1987).

Apenas na metade do século XIX, a fabricação de queijos se tornou um processo de industrialização. Modernos avanços científicos e tecnológicos têm permitido a padronização de variedades, embora ainda existam consideráveis variações entre e dentro das fábricas.

O queijo é um alimento altamente nutritivo, uma vez que contém quase toda a proteína do leite, geralmente a maior parte da gordura, minerais (principalmente cálcio e fósforo) e vitaminas essenciais, especialmente A e D e outros nutrientes, numa forma concentrada. As diferenças entre os processos de fabricação influenciam consideravelmente a sua composição e, portanto, o seu valor energético. Os queijos frescos possuem um teor de gordura na faixa de 12%, enquanto os maturados em geral, contém entre 20 e 40% (RENNER, 1987). A preferência dos consumidores geralmente é por aqueles com altos teores de gordura, devido à sua contribuição no desenvolvimento das características do "flavour".

A importância nutricional dos queijos advém do elevado teor de proteínas com alto valor nutritivo. De um modo geral, a variação da quantidade de proteína nas diferentes variedades se situa na faixa de 20 a 35%. Durante o processo de

fabricação, a caseína do leite é incorporada ao queijo, enquanto a maioria das proteínas do soro, que são as de maior valor nutritivo, são perdidas no soro. Assim sendo, 75 a 80% do total das proteínas e cerca de 95% das caseínas são transferidas do leite para o queijo (ANTILA et al.,1982). Em queijos produzidos com leite pasteurizado, o teor de proteínas do soro em relação à proteína total do queijo é de 4 a 6% (RESMINI et al.,1982). Uma vez que as proteínas do soro são nutricionalmente superiores às caseínas, que são deficientes em aminoácidos sulfurados, o valor nutritivo das proteínas do queijo é menor que o das proteínas totais do leite, mas ainda é maior que o da caseína sozinha (FARRER, 1984; RENNER, 1987). KOTULA et al. (1987) observaram que os valores de PER em queijo Cheddar foram significativamente maiores que os da caseína (3,7 e 2,5, respectivamente). O valor nutritivo das proteínas não é diminuído pela ação do coalho ou de outras enzimas ativas durante a maturação dos queijos, e também não é afetado pela formação de ácidos na etapa de fabricação. A reação de Maillard não ocorre durante a fabricação e, assim, a disponibilidade de lisina no queijo é quase a mesma que no leite.

Quando se utiliza a ultrafiltração para a concentração do leite, as proteínas do soro são também incorporadas ao queijo, melhorando o seu valor nutritivo. Nestes queijos, as proteínas do soro representam em torno de 15% da proteína total.

O queijo também contribui significativamente no fornecimento de aminoácidos essenciais. Isto pode ser observado quando se compara a sua composição de aminoácidos com uma proteína de referência, que indica a concentração ideal de aminoácidos essenciais numa dieta protéica; nesta comparação, as proteínas do queijo se mostram deficientes apenas em metionina+cisteína (SCOTT, 1989; RENNER, 1987).

Durante a maturação, parte da caseína insolúvel é convertida em compostos nitrogenados solúveis em água, que incluem produtos intermediários de hidrólise

das proteínas como também aminoácidos livres. A maturação de queijos pode ser vista como uma espécie de pré-digestão, em que a digestibilidade das proteínas é aumentada. A digestibilidade verdadeira de vários tipos de queijos é de quase 100%; a digestibilidade das proteínas dos queijos é considerada mais alta que as do leite integral (96,2 a 97,5% e 91,9%, respectivamente) (DILLON, 1990).

Os níveis de cálcio e de fósforo do queijo são tão importantes quanto aqueles do leite; 100g de queijos frescos fornecem de 30 a 40% das necessidades diárias de cálcio e 12 a 20% das de fósforo, ao passo que 100g de um queijo duro contribui com 100% das necessidades diárias de cálcio e 40 a 50% das de fósforo (SCOTT, 1989; RENNER, 1987). Queijos produzidos por coagulação enzímica geralmente apresentam maiores teores de cálcio do que aqueles produzidos por coagulação ácida. As mudanças físico-químicas que ocorrem durante a fabricação e maturação de queijos não afetam a biodisponibilidade de cálcio; em ensaios com ratos, usando-se uma dieta com queijo Cheddar, a absorção de cálcio foi em torno de 76,8% (BUCHOWSKI & MILLER, 1990). Os níveis de sódio são dependentes das quantidades de cloreto de sódio adicionadas ao queijo.

A concentração de vitaminas lipossolúveis no queijo depende do teor de gordura. A maior parte da vitamina A (80-85%) contida no leite passa para o queijo. Quantidades variáveis de vitaminas hidrossolúveis do complexo B e vitamina C são perdidas no soro. Os valores para tiamina, ácido nicotínico, ácido fólico e ácido ascórbico no queijo são de 10 a 20%; para riboflavina e biotina, 20 a 30%; para piridoxina e ácido pantotênico, 25 a 45% e para cianocobalamina, 30 a 60%; o restante passa para o soro (REIF et al., 1976). As concentrações de vitaminas do complexo B mudam durante a maturação, uma vez que elas são utilizadas e sintetizadas pela microflora do queijo. A concentração de várias vitaminas do complexo B depende do tipo de fermento usado e aumenta com o tempo de estocagem; após um longo período de maturação, a concentração destas vitaminas é aumentada (DILLON, 1990; RENNER, 1987; SCOTT, 1989).

2.1.1. Sistema protéico do leite

Uma vez que a coagulação envolve uma modificação específica do sistema protéico do leite, o seu conhecimento é essencial para a compreensão do processo.

O leite bovino contém aproximadamente 3,0 a 3,5% de proteína, sendo que seu sistema protéico consiste de dois tipos principais, as caseínas e as proteínas do soro. As proteínas séricas são definidas como aquelas que permanecem no soro após precipitação das caseínas em pH 4,6 a 20°C, totalizando cerca de 0,5 a 0,7% de proteínas. As principais proteínas do soro são β-lactoglobulina, α-lactalbumina, soroalbumina bovina, imunoglobulinas e proteose-peptonas, embora estas últimas consistam principalmente de peptídeos produzidos a partir da β-caseína por ação da plasmina (SCOTT, 1989; RENNER, 1987).

As caseínas são fosfoproteínas, organizadas em micelas formando complexos solúveis (EIGEL et al., 1984; SCHMIDT, 1982), que precipitam quando o leite é acidificado a pH 4,6 a 20°C, e contribuem com cerca de 2,4 a 2,8% de proteínas, representando 80% do teor total de proteínas do leite. As micelas de caseínas são partículas quase esféricas, com diâmetro na faixa de 40 a 300nm, formadas pela associação das caseínas (αs_1, αs_2, β e κ), de fragmentos peptídicos (γ-caseínas) provenientes da proteólise da β-caseína e de componentes minerais, principalmente cálcio e fosfato (EIGEL et al., 1984). As proporções dos diferentes constituintes são de 92% para as caseínas, distribuídas da seguinte forma: 33% de αs_1-, 11% de αs_2-, 33% de β-, 11% de κ- e 4% de γ-caseínas e outras frações menores; essa classificação das caseínas é feita com base na composição e seqüência de aminoácidos. Os 8% restantes são elementos minerais como 2,9% de cálcio, 0,2% de magnésio, 4,3% de fosfato inorgânico e 0,5% de citrato (SCHMIDT, 1980).

As micelas são formadas de subunidades classificadas em dois tipos principais, submicelas com e sem κ-caseína, que são mantidas juntas pelo cálcio (fosfato de cálcio coloidal), interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. A κ-caseína se localiza predominantemente na porção externa da micela, enquanto as frações sensíveis ao cálcio, αs_1-, αs_2- e β-caseínas, interagem hidrofobicamente, formando a parte central da micela. A porção N-terminal da κ-caseína é hidrofóbica e reage hidrofobicamente com as proteínas da parte central (núcleo) da micela, deixando a porção C-terminal hidrofílica exposta na superfície. As submicelas contém quantidades variáveis de κ-caseína em sua superfície; agregados com submicelas ricas em κ-caseína são predominantes na superfície da micela, sendo que aquelas deficientes em κ-caseína são voltadas para dentro. As micelas são estabilizadas por um potencial zeta de cerca de -20 mV e por fatores estéricos causados pela projeção dos segmentos C-terminais da κ-caseína, que dão às micelas uma aparência "pilosa", conferindo-lhes estabilidade contra a agregação (WALSTRA, 1990). As propriedades das micelas determinam o comportamento do leite durante os processos tecnológicos como pasteurização, esterilização, concentração e coagulação para fabricação de queijos.

Devido ao alto teor de grupamentos fosfato, as frações αs_1-, αs_2- e β-caseínas se ligam fortemente ao cálcio e precipitam em concentrações do íon superiores a 6 mM. Entretanto, a κ-caseína se liga fracamente ao cálcio e é solúvel mesmo em altas concentrações; ela também reage hidrofobicamente com αs_1-, αs_2- e β-caseínas estabilizando estas caseínas sensíveis ao cálcio contra precipitação, formando agregados coloidais ou micelas (SCHMIDT, 1980).

As principais propriedades das quatro caseínas mais importantes são apresentadas na Tabela 1 (SCHMIDT, 1980). O grupo da αs_1-caseína, contendo 199 resíduos de aminoácidos, é uma mistura de αs_0 e αs_1, com predomínio desta última, contendo 9 e 8 resíduos fosfato, respectivamente. O grupo da αs_2-caseína,

contendo 207 resíduos de aminoácidos, é composto de 5 proteínas (αs_2, αs_3, αs_4, αs_6 e αs_5, sendo esta última um dímero da αs_3 e αs_4) com teores de fosfato na faixa de 10 a 13 grupos por molécula, o que lhe confere maior poder hidrofílico. A β-caseína, a mais hidrofóbica das caseínas, possui 209 resíduos de aminoácidos e 5 grupamentos fosfato e, por ação de proteases especialmente a plasmina, origina as γ-caseínas, identificadas como frações da β-caseína: γ_1 (29-209), γ_2 (106-209) e γ_3 (108-209). As κ-caseínas, com 169 resíduos de aminoácidos e apenas 1 resíduo fosfato, existem em 7 diferentes formas (κ_1 a κ_7), de acordo com o teor de carboidratos. Após a ação primária da quimosina, que cliva a ligação Phe_{105}-Met_{106}, somente o fragmento hidrofóbico da κ-caseína (1-105), chamado para-κ-caseína, permanece no precipitado ou coalhada (WALSTRA & JENNESS, 1984).

TABELA 1: Características físico-químicas das caseínas (SCHMIDT, 1980).

Características	αs_1-caseína	αs_2-caseína	β-caseína	κ-caseína
Peso molecular (Daltons)	23.600	25.200	24.000	19.000
Resíduos de aminoácidos*	199	207	209	169
Resíduos de prolina*	17	10	35	20
Resíduos de cisteína*	0	2	0	2
Grupos fosfoserina	8-9	10-13	5	1-2
Carboidratos	-	-	-	+
Hidrofobicidade (kJ/resíduo)	4,9	4,7	5,6	5,1
Sensibilidade à quimosina	+	-	+	+++
Sensibilidade ao cálcio	++	+++	+	-

*Resíduos/mol

2.2. Fabricação de queijos

A conversão do leite em queijo é provavelmente a maneira mais efetiva para a sua estocagem numa forma adequada, saborosa e nutritiva. Para a maioria das variedades, esta conversão pode ser dividida em duas fases bem definidas, fabricação e maturação.

$$\text{Leite} \xrightarrow{\text{Fabricação}} \underset{\text{(Queijo fresco)}}{\text{"Coalhada"}} \xrightarrow{\text{Maturação}} \text{Queijo Maturado}$$

O queijo representa um sistema biológico dinâmico: através dos processos de fabricação e de maturação, ocorre uma série conjunta e/ou sucessiva de eventos bioquímicos que, se balanceados, fornecem um produto com odor, sabor e textura desejáveis. Nunca dois queijos são idênticos, mesmo em lotes da mesma variedade (FOX, 1987).

FOX (1987) define a fase de fabricação como sendo as operações realizadas durante as primeiras 24 horas, apesar de que algumas delas como salga e desidratação possam continuar por um período maior. Embora os protocolos de fabricação para as variedades individuais sejam diferentes quanto aos detalhes, as etapas básicas são comuns para a maioria delas como acidificação, coagulação, desidratação (corte do gel, aquecimento/cozimento, agitação, drenagem/prensagem ou qualquer processo semelhante que promova a sinérese), enformagem e salga.

A fabricação de queijo é basicamente um processo de desidratação, em que os teores de caseína e gordura são concentrados de 6 a 12 vezes, dependendo da variedade. A quantidade de água retida no produto é regulada pela extensão e combinação das etapas básicas listadas anteriormente e pela composição do leite. As mudanças bioquímicas durante o período de maturação são controladas pelos teores de umidade e sal, pH e pela microflora. Esses fatores, por sua vez, levam ao desenvolvimento do sabor, odor e textura típicos do produto final (FOX, 1987).

2.2.1. Seleção e pré-tratamento do leite

A fabricação de queijos começa com a seleção de leites com alta qualidade microbiológica e química. Na prática, o leite deve ser resfriado à 4°C imediatamente após a ordenha e estocado nesta temperatura na fazenda ou na fábrica. Nesta temperatura ocorre a seleção e crescimento da microflora psicrotrófica (FOX, 1987). A homogeneização é usada principalmente na fabricação de queijos não maturados. Queijo Cheddar produzido a partir de leite homogeneizado não desenvolve um forte "flavour" característico de Cheddar e sua textura geralmente é classificada como muito firme (BANKS, 1991).

A termização do leite, isto é, o tratamento térmico em temperaturas de 63-65°C durante 15-20 segundos, não destrói os microrganismos patogênicos mas pode ser usada para aumentar o tempo de estocagem do leite antes da fabricação do queijo. O tratamento térmico em temperaturas superiores àquelas usadas na pasteurização causará mudanças nas características físico-químicas do leite. Por exemplo, na micela de κ-caseína, inibindo a ação da quimosina sobre a caseína, interferindo assim com a fase primária de formação de gel na fabricação de queijos. Também, mudanças no equilíbrio de cálcio e fosfato interferem com a fase secundária de formação de gel, isto é, a agregação das micelas de caseína coaguladas (BANKS, 1991).

Normalmente recomenda-se que o leite a ser usado para fabricação de queijos seja tratado termicamente usando-se uma combinação tempo-temperatura equivalente à usada na pasteurização, imediatamente antes do processo de fabricação. Este tratamento é suficiente para destruir a maioria das bactérias patogênicas e deteriorantes do leite, mas não afeta os parâmetros físico-químicos numa extensão tal que influencie o processo de fabricação. Contudo, o queijo Cheddar feito com leite pasteurizado leva aproximadamente o dobro do tempo

daquele feito com leite cru para desenvolver a mesma intensidade de "flavour" e matura mais lentamente do que o queijo feito com leite cru (FOX, 1987).

Num estudo relativamente recente, McSWEENEY et al. (1993a) compararam a qualidade de queijo Cheddar fabricado com leite cru, pasteurizado (72°C-15 segundos) e microfiltrado. Os queijos feitos com leite pasteurizado e microfiltrado se mostraram equivalentes e de boa qualidade; o queijo produzido com leite cru apresentou uma qualidade inferior, devido ao desenvolvimento de um "flavour" atípico, embora esse "flavour" tenha sido mais intenso e se desenvolvido mais rapidamente que nos outros queijos. Os perfis eletroforéticos dos 3 queijos não apresentaram diferenças entre si até 3 meses de maturação, e apenas ligeiras diferenças foram aparentes com 6 meses; no entanto, a velocidade de formação de nitrogênio solúvel em água foi mais alta no queijo feito com leite cru do que nos outros dois, e as espécies de lactobacilos também diferiram. Dos dados acima, os autores concluíram que os lactobacilos eram responsáveis pelas diferenças na proteólise nos queijos feitos com leite cru, particularmente com respeito à formação de peptídeos pequenos e aminoácidos livres. As espécies de lactobacilos envolvidas na maturação mais rápida e no desenvolvimento da intensidade de "flavour" em queijos feitos com leite cru parecem ser destruídas pela pasteurização.

Embora a maioria das bactérias psicrotróficas seja efetivamente eliminada pela pasteurização, esses microrganismos produzem enzimas extracelulares termoestáveis que podem resistir à pasteurização e afetar o "flavour" e a textura dos queijos (BANKS, 1991).

Num outro estudo, LYNCH et al. (1994) produziram queijos em condições assépticas, com espécies selecionadas de lactobacilos como fermento adjunto. Os queijos experimentais mostraram níveis ligeiramente mais altos de aminoácidos livres, mas nenhuma diferença significativa na intensidade de "flavour" e textura

foi observada entre os queijos controle e experimentais. Dos estudos acima, concluiu-se que a pasteurização do leite antes da fabricação de queijos parece influenciar a extensão e as características da proteólise durante a maturação do queijo Cheddar. A pasteurização do leite causa uma interação limitada entre as proteínas do soro e as caseínas, interação esta induzida pelo calor, e resulta na retenção adicional de proteína do soro, além da quantidade que é normalmente solúvel na fase aquosa do queijo. A presença no queijo de proteínas do soro desnaturadas pelo calor, pode influenciar o acesso das proteinases às caseínas durante a maturação (LAU et al., 1991).

2.2.2. Acidificação

A acidificação é um dos principais eventos na fabricação da maioria, se não de todas as variedades de queijos. Envolve a fermentação, *in situ*, de lactose a ácido láctico por bactérias lácticas selecionadas (fermento) ou pela microflora nativa. Em alguns casos, podem ser usados ácidos pré-formados ou acidógenos (ácido glucono-δ-lactona) para acidificar diretamente algumas variedades de queijos como Mussarela, Feta, Cottage, etc. É definida como o desenvolvimento de acidez durante a etapa de fabricação, e para algumas variedades, também nos estágios iniciais de maturação. A produção de ácido é a chave para a obtenção de queijo de boa qualidade (FOX, 1987).

Os tipos de fermentos usados variam para os diferentes queijos; por exemplo, linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* geralmente são usadas em queijos tipo Cheddar; *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus* spp. são usados na produção de queijos tipo suíço, como o Emmental. Culturas mesofílicas são usadas quando a fabricação envolve temperaturas de cozimento não superiores à 40°C, como os queijos Cheddar e holandeses, como Gouda e Edam (FOX, 1987).

Linhagens mesofílicas definidas são usadas em muitos países, freqüentemente constituídas de uma mistura selecionada de 2 a 6 linhagens, que permitem a reprodutibilidade nas taxas de produção de ácido, se selecionadas e mantidas adequadamente. Culturas de fermentos mesófilos geralmente contém *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e/ou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Culturas termofílicas são usadas na fabricação de queijos que necessitam altas temperaturas de cozimento, tais como os queijos italianos como o Parmesão e os queijos suiços como o Emmental. Os fermentos termofílicos geralmente consistem de uma mistura de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* ou *Lb. helveticus*; em alguns casos uma cultura isolada de *Lactobacillus* pode ser usada (FOX, 1993; HOLSINGER et al., 1995).

A produção de ácido é uma etapa muito importante na fabricação de queijos uma vez que ela afeta a atividade do coalho, desnaturação e retenção do coalho na coalhada, força do coágulo, sinérese, pH e controle do crescimento de microrganismos não relacionados com aqueles do fermento.

A atividade coagulante e a quantidade de coalho retido na coalhada afetam o grau e a extensão da proteólise no produto maturado. A força do coágulo afeta o rendimento; se o coágulo for muito frágil, ele se fragmenta, levando a uma perda significante de gordura e proteína no soro. A sinérese controla o teor de umidade, regulando o crescimento bacteriano e a atividade enzímica que, por sua vez, influencia a velocidade e o perfil de maturação. O pH afeta a taxa de solubilização do fosfato de cálcio coloidal, que afeta a susceptibilidade da caseína à proteólise e influencia as propriedades reológicas do queijo. O papel do pH na textura de queijos é particularmente importante, porque mudanças no pH estão relacionadas diretamente com mudanças químicas na rede protéica do coágulo. Como o pH da coalhada diminui, há uma perda concomitante de fosfato de cálcio coloidal, e há uma dissociação progressiva das submicelas em agregados menores (LAWRENCE et al., 1987).

Portanto, a produção de ácidos numa taxa e tempo apropriados é uma etapa fundamental na fabricação de queijos de boa qualidade. O pH final da coalhada depende da linhagem de fermento usada, mas geralmente fica entre 4,6 e 5,1. Isto leva de 5 a 6 horas para o queijo Cheddar e de 6 a 12 horas para os queijos tipo suiços, holandeses e azuis (FOX, 1987).

2.2.3. Coagulação

Uma etapa comum na fabricação de todas as variedades de queijos é a coagulação, que envolve mudanças físico-químicas nas caseínas levando à formação de um gel que retém a gordura. A coagulação pode ocorrer de três maneiras: por uma proteólise limitada através de aspartato-proteinases selecionadas (geralmente quimosina); acidificação até o ponto isoelétrico das caseínas (ao redor de pH 4,6) ou por associação de calor e pH ao redor de 5,2 (FOX, 1987).

Quase todos os queijos são produzidos por coagulação enzímica, geralmente por ação de uma proteinase ácida de origem animal ou microbiana. Existem algumas exceções como o queijo Serra da Estrela (Portugal), em que é usada uma protease vegetal extraída da *Cynara cardunculus*. Estes coalhos de origem vegetal são considerados muito proteolíticos, resultando em sérios defeitos no produto acabado, principalmente uma textura quebradiça e sabor amargo (FOX, 1987).

Coalhos de fontes animais geralmente são extratos do abomasso de bezerros ou de outros mamíferos jovens, consistindo em torno de 90 a 95% de quimosina e 5 a 10% de pepsina. Estes coalhos têm uma vantagem sobre a maioria das proteinases de origem vegetal e microbiana, em que sua atividade coagulante é alta em relação à atividade proteolítica geral. A quimosina (E.C. 3.4.23.4) é uma aspartato-proteinase de origem gástrica, secretada no estômago de bezerros; cliva especificamente a ligação Phe_{105}-Met_{106} da κ-caseína. Esta ligação é muito

mais sensível à ação da quimosina que qualquer outra ligação nas proteínas do leite (GREEN, 1977).

Os suprimentos limitados de coalho de bezerros, juntamente com o aumento global na produção de queijos, têm levado à pesquisa de substitutos para os coalhos (como as pepsinas bovina e suína e proteinases ácidas de origem microbiana). Proteinases ácidas extraídas de *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* entre outros, são amplamente usadas para a produção comercial de queijos em muitos países, com resultados mais ou menos satisfatórios (FOX et al., 1994; GREEN, 1977; NELSON, 1975; PHELAN, 1985).

A clonagem do gene da quimosina de bezerros em vários microrganismos como *Aspegillus niger* var. *awamori*, *Kluyveromyces maxiamus* var. *lactis* e *Escherichia coli*, leva à formação de quimosina recombinante que tem se mostrado muito satisfatória na fabricação de queijos. As qualidades exigidas para os substitutos de coalhos incluem:

- alta relação atividade coagulante/atividade proteolítica;
- especificidade adequada;
- boa atividade no leite;
- ser prontamente desnaturado, quando este for usado em processamentos posteriores, como por exemplo na produção de concentrados protéicos de soro.

Existem na literatura diversas revisões sobre o uso de coalhos e seus substitutos, incluindo entre eles os trabalhos de ERNSTRON (1974); GREEN (1977, 1984); GREEN et al. (1985); GUINEE & WILKINSON (1992); NELSON (1975); PHELAN (1985) e STERNBERG (1976).

A coagulação é um processo que ocorre em duas fases, a primeira envolvendo a formação enzímica de para-caseína e peptídeos e a segunda, onde há a agregação e coagulação das micelas alteradas pelo coalho.

A fase primária envolve a hidrólise enzímica da ligação Phe_{105}-Met_{106} da κ-caseína, resultando na liberação de para-κ-caseína e de um glicomacropeptídeo, que é o segmento hidrofílico C-terminal da κ-caseína (MERCIER et al., 1973). Esta ligação é particularmente sensível devido à natureza dos aminoácidos envolvidos e à presença de uma serina adjacente e grupos hidrofóbicos como leucina e isoleucina, próximos à ligação clivada (VISSER, 1981). Assim, a cadeia de κ-caseína é hidrolisada em duas porções, segmento 1-105 (κ-CN f1-105), conhecido como para-κ-caseína e segmento 106-169 (κ-CN f106-169), conhecido como caseínomacropeptídeo ou glicomacropeptídeo (DALGLEISH, 1987; DELFOUR et al., 1965; GRAPPIN et al., 1985; GREEN, 1977; 1984). Após a hidrólise, o caseínomacropeptídeo hidrofílico se difunde para o soro, enquanto a para-κ-caseína hidrofóbica permanece associada com a αs- e β-caseínas da micela (DALGLEISH, 1987).

A hidrólise da κ-caseína, o principal fator de estabilização nas micelas de caseína, causa a sua desestabilização. Isto leva à fase secundária da coagulação, uma etapa não-enzímica, que envolve essencialmente a coagulação das micelas de caseína desestabilizadas, na presença de cálcio e em temperaturas superiores a 20°C (McMAHON & BROWN, 1985; RANK et al., 1985).

2.2.4. Operações pós-coagulação

As etapas de fabricação após a coagulação são importantes na determinação das características individuais de cada queijo. Contudo, a composição do leite, especialmente as concentrações de cálcio e caseína, as quantidades e tipo de fermento e coalho também contribuem para as características individuais de cada variedade (FOX, 1987).

O principal objetivo nesta etapa de fabricação é promover a expulsão do soro. Quando o gel é cortado ou quebrado, os pedaços de coágulo se contraem e expelem soro, um processo conhecido como sinérese. O tamanho dos pedaços de coágulo depende do tipo de queijo a ser processado. O gel é cortado mais fino para queijos com baixos teores de umidade, do que para aqueles com altos teores. Se o coágulo for cortado antes de estar suficientemente firme, haverá uma perda excessiva de gordura e proteína no soro (CHAPMAN & SHARPE, 1990; WALSTRA et al., 1987b). Após o corte, a coalhada deve ser deixada em repouso para que haja contração das partículas e expulsão do soro. O soro livre permite que as partículas se movam livremente quando agitadas, o que previne a sedimentação dos pedaços de coágulo.

As etapas posteriores ao corte são a agitação e cozimento. O cozimento tem o objetivo de promover a contração da matriz protéica, liberando mais soro. O aumento na temperatura também serve para acelerar o metabolismo de produção de ácido láctico, resultando numa diminuição do pH, o que também aumenta a sinérese. Neste ponto da fabricação, a coalhada está pronta para as etapas finais de enformagem, prensagem e salga. A salga é importante pelo fato de aumentar o "flavour" dos queijos, controlar o crescimento de bactérias indesejáveis e a atividade enzímica, além das mudanças físicas nas proteínas do queijo, que influenciam a textura, a solubilidade e conformação das proteínas (FOX, 1987; HOLSINGER et al., 1995).

Uma vez completadas as etapas de fabricação, o queijo está pronto para o processo de maturação, que ocorre sob condições de umidade e temperatura controladas.

2.3. Maturação de queijos

A composição básica e estrutura dos queijos são determinadas pelas operações de fabricação, mas é durante a maturação que há o desenvolvimento das características individuais de cada variedade.

Enquanto alguns tipos são consumidos frescos, principalmente aqueles produzidos por coagulação ácida, a maioria requer um período de maturação que varia de algumas semanas até 2 anos ou mais. A extensão da maturação depende da variedade, sendo que a sua duração e a estabilidade dos queijos são inversamente relacionados ao teor de umidade. No caso de alguns tipos, ela é determinada pela preferência do consumidor e o uso a que se destina. O queijo Parmesão, por exemplo, pode ser consumido como um queijo "de mesa" após 1 ano de maturação ou maturado por mais que 2 anos e usado como queijo ralado.

A maturação é um processo complexo e essencialmente enzímico, catalisada pelos seguintes agentes:

- coagulante (quimosina ou seus substitutos);
- enzimas nativas do leite, como a plasmina;
- bactérias do fermento e suas enzimas;
- bactérias do fermento secundário e suas enzimas;
- bactérias que sobrevivem à pasteurização ou têm acesso ao leite pasteurizado ou coágulo durante a fabricação (ANDREWS, 1983; DULLEY, 1974; FARKYE & FOX, 1992; FOX, 1993; FOX & LAW, 1991; LAW, 1984).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

2.3.1. Alterações bioquímicas durante a maturação

A maturação de queijos é um processo lento, que envolve um conjunto de modificações microbiológicas, bioquímicas e químicas, no qual há o desenvolvimento de suas características individuais ou seja, aroma, sabor, textura, aparência.

As principais reações bioquímicas que ocorrem durante esse processo são glicólise, lipólise e proteólise, cuja importância relativa depende da variedade, e nos quais os constituintes principais do queijo, proteínas, lípides e lactose são degradados a produtos primários (Figura 1). Estas reações primárias são responsáveis principalmente pelas mudanças básicas na textura e "flavour" que ocorrem durante a maturação. No entanto, os produtos primários são degradados a produtos secundários, que determinam os aspectos mais refinados da textura e do "flavour".

Os principais compostos já isolados de vários tipos de queijos são peptídeos, aminoácidos, aminas, tióis, tioésteres (de proteínas), ácidos graxos, metilcetonas, lactonas, ésteres (de lípides), ácidos orgânicos especialmente láctico, mas também ácidos acético e propiônico, CO_2, ésteres e álcoois (de lactose). Em concentrações e proporções adequadas, estes compostos são responsáveis pelas características individuais dos vários tipos de queijos (FOX, 1989; LAW, 1984, 1987).

2.3.1.1. Glicólise

A fermentação da lactose a ácido láctico pelas bactérias lácticas do fermento é uma das reações mais importantes na fabricação de todos os tipos de queijos.

A maior parte da lactose do leite (cerca de 98%) passa para o soro como lactose ou lactato no final da fabricação; mesmo assim, a coalhada ainda contém 0,8 a 1,5% de lactose, que é metabolizada rapidamente a L-lactato por ação do fermento, durante as etapas iniciais da maturação (FOX et al., 1990). A extensão da fermentação da lactose residual depende da relação sal/umidade da coalhada. Culturas lácticas comerciais são estimuladas por baixos níveis de sal, mas são fortemente inibidas por concentrações de sal superiores a 2,5%. Assim, a atividade do fermento e sua capacidade de fermentar a lactose residual é fortemente dependente da proporção de sal/umidade na coalhada.

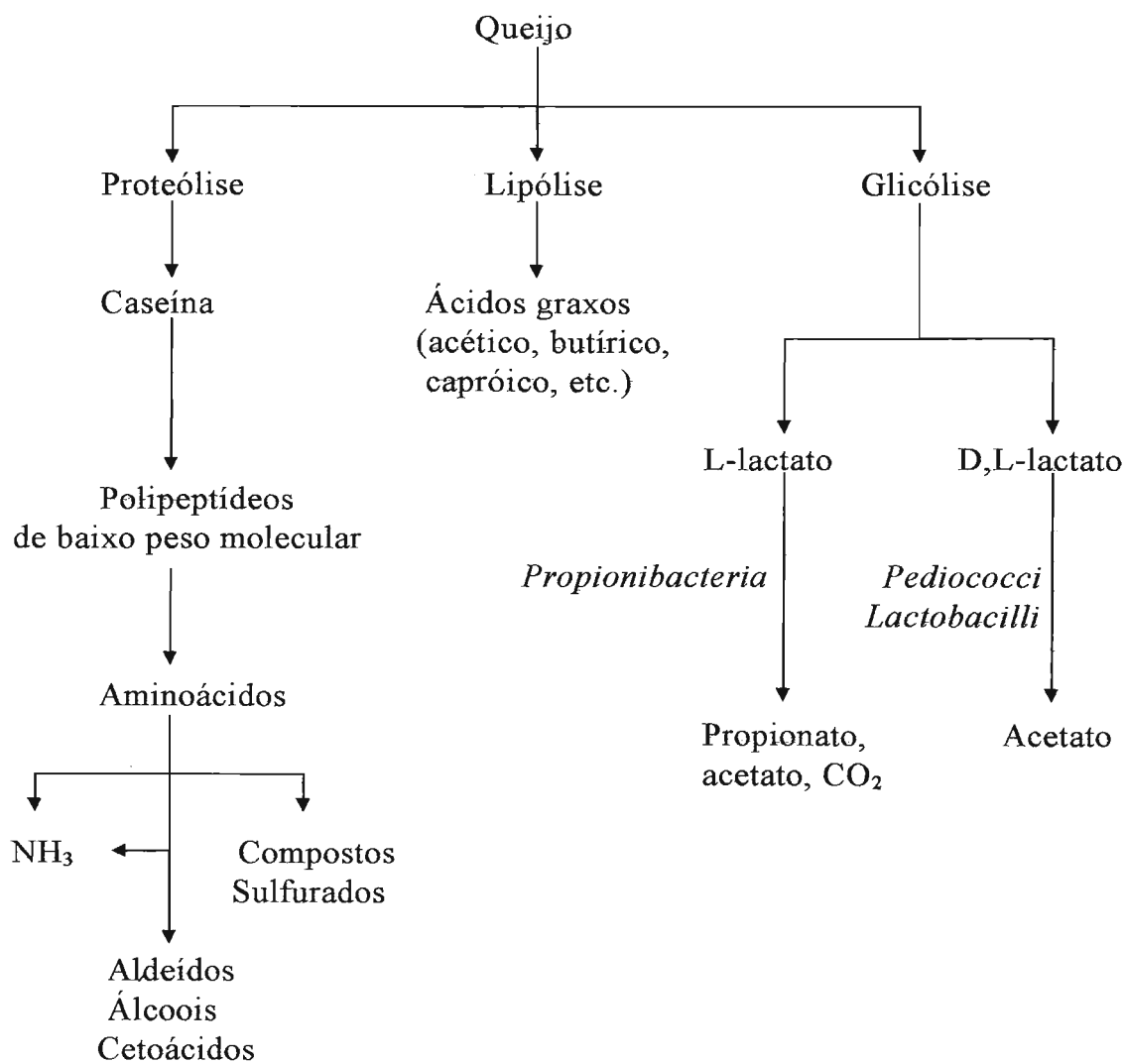


FIGURA 1: Modificações químicas durante a maturação de queijos.

Geralmente as bactérias não provenientes do fermento são mais resistentes ao sal que os lactococos (TURNER & THOMAS, 1980); desse modo, a relação sal/umidade também afeta os produtos de fermentação da lactose. Se a temperatura de estocagem e a relação sal/umidade estiverem um pouco mais altas que o normal, ocorrerá a formação de D-lactato, parcialmente pela fermentação da lactose residual e pela isomerização de L-lactato (TURNER & THOMAS, 1980). A racemização de L-lactato por pediococos e lactobacilos é dependente do pH, com um ótimo de 4,0 a 5,0, e é retardada pela presença de cloreto de sódio (THOMAS, 1986).

D-lactato pode ter conseqüências nutricionais indesejáveis, devido à sua menor solubilidade e absorção, especialmente em crianças. D-lactato de cálcio é menos solúvel que a forma L-lactato e pode cristalizar no queijo, causando manchas brancas indesejáveis, principalmente na superfície de corte (DYBING et al., 1988). THOMAS & CROW (1983) analisaram a extensão da racemização de L-lactato em queijo Cheddar inoculado com linhagens de pediococos e lactobacilos; eles concluíram que a racemização no queijo inoculado com pediococos foi completa em cerca de 19 dias, enquanto no queijo controle, com menores quantidades de pediococos, este tempo foi de aproximadamente 3 meses.

Também pode ocorrer a oxidação de lactato no queijo; durante este processo, o lactato é convertido a acetato e CO_2. Esta oxidação é dependente da população de bactérias não provenientes do fermento e da disponibilidade de oxigênio, que é determinada pelo tamanho dos blocos de queijo e a permeabilidade da embalagem ao oxigênio (THOMAS, 1987). ASTON & DULLEY (1982) observaram a presença de acetato em queijo Cheddar e consideraram a sua contribuição para o "flavour"; em altas concentrações o acetato pode causar "off-flavours".

A fermentação de lactose e lactato em queijos tipo suíço foi descrita de maneira detalhada por TURNER et al. (1983). O queijo Emmental contém cerca

de 0,4 e 1,2% de D- e L-lactato respectivamente, com cerca de 14 dias após a fabricação, tempo em que os açucares são metabolizados completamente. Com a transferência dos queijos para um ambiente quente (ao redor de 22°C), há o crescimento rápido de *Propionibacteria*, metabolizando preferencialmente L-lactato a proprionato, acetato e CO_2. O CO_2 produzido é responsável pelo desenvolvimento de olhaduras, características deste tipo de queijo. O metabolismo de lactose em queijos é resumido na Figura 2.

Embora o leite apresente concentrações relativamente baixas de citrato (ao redor de 8mM), o seu metabolismo é importante em queijos fabricados com fermentos mesofílicos (COGAN & DALY, 1987). O citrato é metabolizado por *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* e *Leuconostoc* spp., com a formação de diacetil e CO_2; contudo, estes microrganismos não utilizam citrato como fonte de energia, mas o metabolizam rapidamente na presença de carboidratos fermentáveis.

O metabolismo de citrato é importante pela formação de olhaduras características de queijos tipo holandeses, devido à produção de CO_2. O diacetil também contribui com o "flavour" de queijo Cheddar e tipo holandeses (ASTON & DULLEY, 1982; MANNING, 1979a, b). FRYER et al. (1970), usando queijo com microflora controlada, demonstraram que na fabricação de queijos usando *Lc. cremoris* sozinho, o citrato não era metabolizado em grande extensão. Contudo, o queijo feito com *Lc. cremoris* e *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* não apresentou citrato após 3 meses; os autores observaram também que *Lb. casei* não metaboliza citrato no queijo.

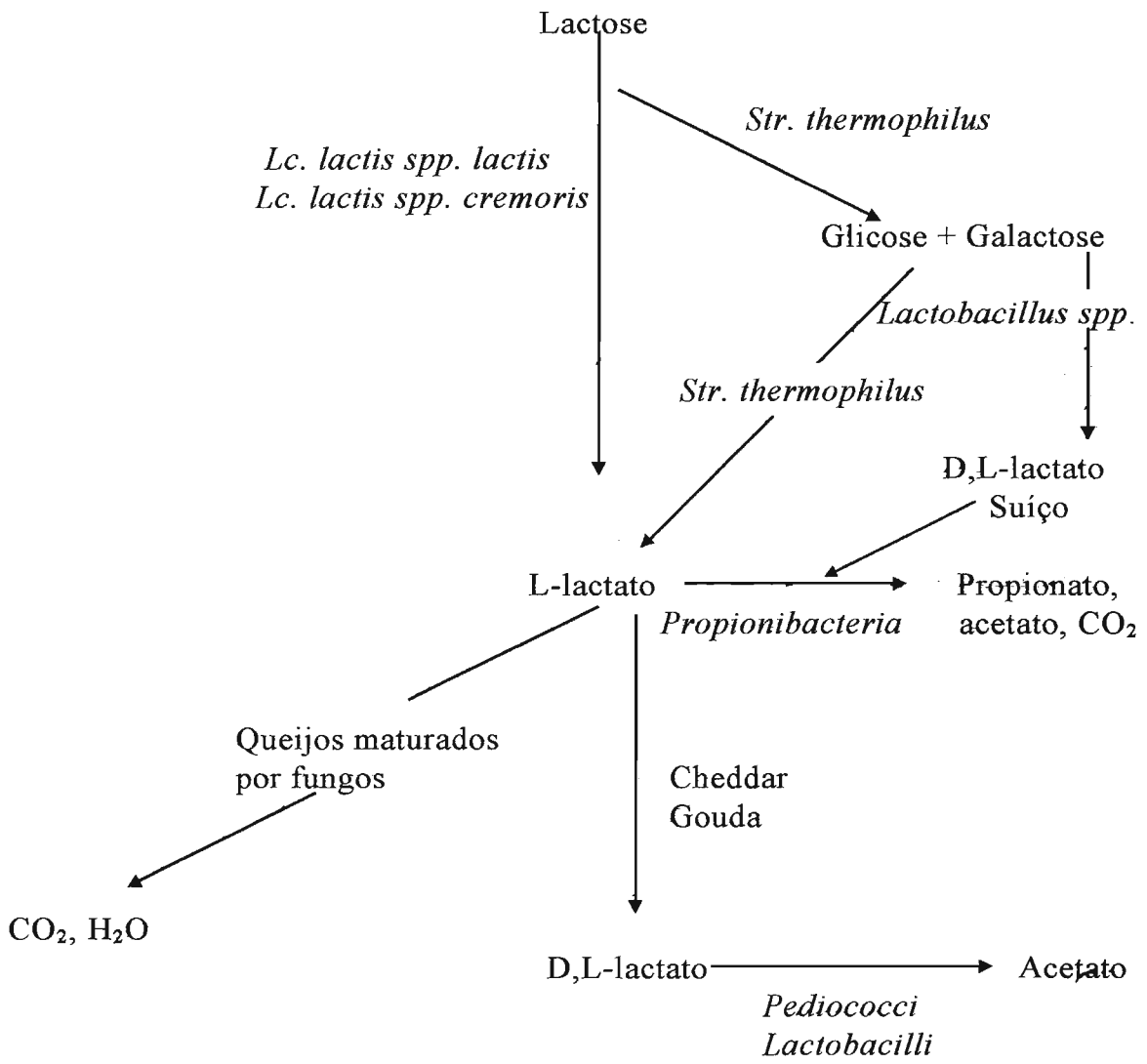


FIGURA 2: Esquema resumido do metabolismo de lactose em queijos.

2.3.1.2. Lipólise

O queijo é um alimento com alto teor de gordura, variando na faixa de 12% para queijos frescos (fabricados por coagulação ácida) e em geral, de 20 a 40% para aqueles maturados (RENNER, 1987).

OHERN & TUCKEY (1969) relataram que queijos Cheddar fabricados com leite desnatado não desenvolviam um "flavour" completo e característico, mesmo após 12 meses de maturação; apenas os queijos contendo 50% ou mais de gordura na matéria seca desenvolviam um "flavour" típico. Estes resultados indicam que a gordura, além das proteínas e lactose, tem um papel importante no "flavour" dos queijos.

FODA et al. (1974) substituíram a gordura do leite por adição de óleos vegetais ao leite desnatado e observaram uma melhora na percepção do "flavour" do queijo Cheddar; os dados obtidos sugerem a atuação da gordura como um solvente para a dissolução e transporte dos componentes do "flavour". Os autores sugeriram também que a composição de ácidos graxos e a emulsão natural da gordura do leite são importantes para o desenvolvimento do "flavour". Atualmente há um grande interesse na produção de queijos com baixos teores de gordura. A obtenção destes produtos com "flavour" e textura razoavelmente bons tem sido feita pelo uso de substitutos de gordura (Mc GREGOR & WHITE, 1990b).

Como em todos os tipos de alimentos com altos teores de gordura, no queijo ocorrem mudanças lipolíticas (enzímicas) e oxidativas (químicas). A lipólise durante a maturação é limitada e indesejável na maioria das variedades. Queijos Cheddar e tipos suíço e holandeses contendo baixas concentrações de ácidos graxos livres geralmente são classificados como rançosos. Contudo, ela é particularmente importante em queijos italianos como Romano e Parmesão, e em queijos azuis, onde é um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento e percepção do "flavour". A hidrólise de triglicérides por ação de lipases é uma das mais importantes transformações bioquímicas das gorduras durante a maturação. Isso leva à produção de ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos e possivelmente glicerol. Os ácidos graxos livres servem como substratos para as reações posteriores, que variam de acordo com os diferentes tipos de queijos.

Os principais agentes lipolíticos são as lipases nativas do leite, os fermentos primário e secundário ou as bactérias não provenientes do fermento e, em alguns casos, uma pasta de coalho.

A principal lipase nativa no leite é uma lipase lipoprotéica (LPL), que foi isolada e bem caracterizada a níveis moleculares e bioquímicos por OLIVECRONA et al. (1992). No leite bovino, quase toda a LPL está associada às micelas de caseína e provavelmente é incorporada ao queijo. Esta enzima hidrolisa mono, di e triglicérides nas posições 1 e 3, e glicerofosfolípides na posição 1. A lipase do leite pode causar uma lipólise significativa no leite cru e também pode contribuir com alguma lipólise no leite pasteurizado, uma vez que é necessário um tratamento térmico em temperaturas superiores a 78°C por 10 segundos, para a sua completa inativação (DRIESSEN, 1989). Esta lipase é altamente seletiva para ácidos graxos esterificados na posição 3; uma vez que a maior parte do ácido butírico presente na gordura do leite é esterificada na posição 3, esta especificidade possivelmente explique as altas concentrações de ácido butírico livre em queijos.

Extratos de coalho de boa qualidade não contém atividade de lipase. Ao contrário, as pastas de coalho usadas na fabricação de alguns queijos italianos contém uma lipase potente, a esterase pré-gástrica (PGE) que, em alguns países, é adicionada ao leite numa forma parcialmente purificada; esta esterase foi amplamente revisada por BERNBACK et al. (1985) e por NELSON et al. (1977). A PGE tem alta especificidade para ácidos graxos de cadeia curta esterificados na posição 3, resultando na liberação de ácidos graxos de cadeia curta e média, sendo responsável pelo "flavour" característico dos queijos italianos.

As bactérias lácticas possuem relativamente baixa atividade lipolítica (KAMALY & MARTH, 1989). SINGH et al. (1973) estudaram as lipases extra e intracelulares de lactococos e observaram que a lipase intracelular de *Lc. lactis* hidrolisava tributirina, mas tinha baixa atividade sobre tripalmitato e trioleína.

EL SODA et al. (1986) verificaram que várias espécies de *Lactobacillus* possuíam maior atividade lipolítica sobre triglicérides de cadeia curta que ácidos graxos de cadeias longas ou emulsões de gorduras do leite. As condições ótimas de hidrólise para tributirina e emulsões de gorduras do leite foram obtidas em pH neutro e a 40-50°C. KAMALY et al. (1990) descreveram algumas características das lipases de diversas linhagens de *Lc. lactis* e *Lc. cremoris*. De maneira geral, estas lipases foram mais ativas sobre tributirina, com atividade ótima a 37°C e pH 7,0 a 8,5. STADHOUDERS & VERINGA (1973) observaram que os ácidos graxos livres de queijos tipo Gouda eram provenientes da ação da lipase do leite sobre os triglicérides, com a formação de ácidos graxos livres e mono e diglicerídeos. As bactérias do fermento aumentaram ainda mais as concentrações de ácidos graxos livres, pela hidrólise de mono e diglicerídeos.

A atividade lipolítica de *Propionibacterium shermanii* é significativamente maior que de outras bactérias lácticas (DUPUIS et al., 1993). Isto sugere que as bactérias propiônicas têm um papel importante na lipólise e desenvolvimento do "flavour" em queijos suiços.

2.3.1.3. Proteólise

A proteólise é provavelmente o fenômeno mais importante que ocorre durante a maturação da maioria dos tipos de queijos, e influencia fortemente suas características de "flavour" e textura (FOX, 1989; FOX & LAW, 1991; GRAPPIN et al., 1985; LAW, 1987; RANK et al., 1985).

Durante a fabricação e maturação de queijos ocorre uma decomposição gradual das caseínas, devido à ação combinada de vários agentes proteolíticos. Em termos gerais, os agentes envolvidos são coagulante (coalho ou seus substitutos), enzimas nativas do leite (principalmente plasmina), bactérias do fermento e aquelas

provenientes de contaminação eventual e inóculo secundário. O fermento secundário, isto é , microrganismos adicionados ao leite ou coalhada com outros objetivos além da acidificação, exercem uma influência considerável na maturação das variedades de queijos onde elas são usadas.

A proteólise primária das caseínas (pelo coagulante e plasmina) produz peptídeos de médio e baixo peso molecular, que atuam como substratos para as proteinases e peptidases do fermento e das bactérias não relacionadas ao fermento, resultando na liberação de aminoácidos livres que são importantes precursores de compostos do "flavour" (FOX, 1989, 1993; LAW, 1987; VISSER, 1977a,b, 1993). Os compostos do catabolismo de aminoácidos livres também contribuem diretamente para o aroma e o sabor dos queijos.

A quantidade total e a composição da mistura de aminoácidos têm sido usadas como um índice de maturação de queijos. Em alguns casos, estes parâmetros se correlacionam com o desenvolvimento do "flavour" e da textura, mas fornecem poucas informações sobre o mecanismo da maturação; para isso, há necessidade de identificação das ligações peptídicas clivadas, que requer o isolamento dos produtos proteolíticos e a determinação de suas estruturas.

A extensão e a natureza da proteólise durante a maturação, como também a natureza e a quantidade dos produtos de degradação, variam de acordo com as enzimas envolvidas, o tipo de queijo e as condições ambientais de maturação (GRAPPIN et al., 1985). O grau de proteólise pode ser muito limitado em Mussarela, tornando-se muito extenso em queijos azuis. Os produtos desta transformação variam desde polipeptídeos de alto peso molecular até pequenos e médios peptídeos e aminoácidos livres. Reações secundárias durante a maturação envolvem modificações e interações entre os produtos primários (Figura 3).

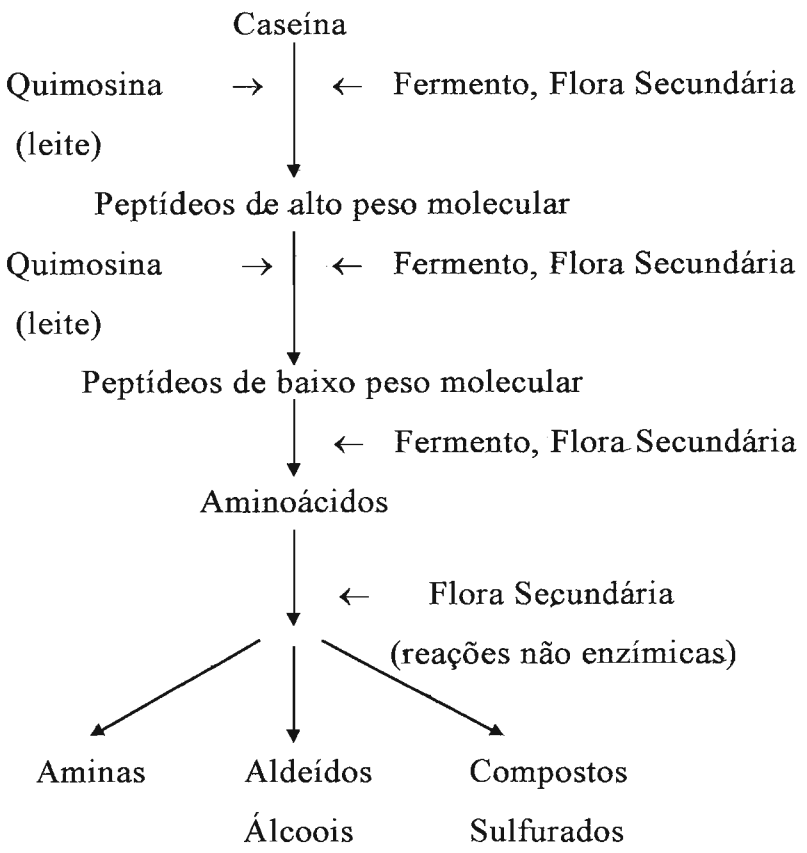


FIGURA 3: Hidrólise da caseína durante a maturação de queijos: envolvimento de proteases de várias fontes (LAW, 1987).

2.4. Agentes proteolíticos no queijo

2.4.1. Coagulante

O coalho tradicional usado na fabricação de queijos é o de bezerros, que é uma mistura de cerca de 90 a 95% de quimosina (E.C. 3.4.23.4) e 5 a 10% de pepsina bovina (E.C. 3.4.23.1) (ROTHE et al., 1977). Todos os principais coalhos comerciais são proteinases ácidas, que geralmente têm ação similar sobre a cadeia B da insulina, indicando uma especificidade semelhante para ligações peptídicas que possuem resíduos hidrofóbicos provenientes de grupos carboxílicos (GREEN, 1977).

Embora consideravelmente menos susceptíveis que a ligação Phe_{105}-Met_{106} da κ-caseína, as caseínas αs_1, αs_2 e β são prontamente hidrolisadas pela quimosina, sob condições apropriadas.

A especificidade da quimosina e da pepsina sobre a αs_1- e β-caseínas tem sido objeto de vários estudos. MULVIHILL & FOX (1977, 1979a) estudaram a especificidade destas enzimas sobre a αs_1-caseína em solução e também os efeitos de cloreto de sódio e do pH. Os autores relataram a produção de seis diferentes peptídeos, que foram detectados por eletroforese e identificados como sendo os seguintes fragmentos: αs_1-I f24/25-199, αs_1-II f24/25-169, αs_1-III e IV f24/25-149/150, αs_1-V f29/33-199 e αs_1-VI f56-179. O peptídeo αs_1-I é o primeiro produto de degradação e é, a seguir, hidrolisado pelo coalho, produzindo αs_1-II e αs_1-III/IV em pH 5,8 e 7,0, e αs_1-V em pH 4,0 a 5,2 na ausência de cloreto de sódio.

McSWEENEY et al. (1993b) demonstraram que em tampão fosfato 0,1M pH 6,5, os principais pontos de clivagem da αs_1-caseína pela quimosina eram Phe_{23}-Phe_{24}, Phe_{28}-Pro_{29}, Leu_{40}-Ser_{41}, Leu_{149}-Phe_{150}, Phe_{153}-Tyr_{154}, Leu_{156}-Asp_{157}, Tyr_{159}-Pro_{160} e Trp_{164}-Tyr_{165}. Em pH 5,2 contendo 5% de NaCl, além destas ligações, também foram clivadas Leu_{11}-Pro_{12}, Phe_{33}-Gly_{34}, Leu_{101}-Lys_{102}, Leu_{142}-Ala_{143} e Phe_{179}-Ser_{180}. A velocidade de clivagem de certas ligações parece ser dependente das condições iônicas e diferem entre pH 6,5 e 5,2 na presença de NaCl 5%. A ligação Leu_{101}-Lys_{102} foi clivada mais rapidamente em menores valores de pH. Os peptídeos menores produzidos a partir da αs_1-caseína por ação da quimosina são αs_1-f1-23, f165-199, f157-164, f154-158, f154-164, enquanto os peptídeos maiores são αs_1-f24-199, f24-164, f24-153, f24-158, que provavelmente correspondem a αs_1-I, αs_1-II, αs_1-III e αs_1-IV, respectivamente.

CREAMER & MILLS (1971) demonstraram que em pH 6,5, três ligações eram rapidamente rompidas na cadeia de β-caseína, por ação da quimosina. CREAMER (1976) e VISSER & SLANGEN (1977) identificaram esses peptídeos como sendo β-I f1-189/193, β-II f1-165/167 e β-III f1-139.

A hidrólise da β-caseína por quimosina e pepsina é fortemente inibida por NaCl 5% e completamente inibida por NaCl 10%, provavelmente devido a um dobramento ou agregação do substrato, mais em decorrência de interações hidrofóbicas intermoleculares, do que pela ação da enzima em si (FOX & WALLEY, 1971; MULVIHILL & FOX, 1978; THOMAS & PEARCE, 1981). Este efeito é diminuído quando o pH cai para 4,6. Ao contrário, a hidrólise de αs_1-caseína é ativada por concentrações de NaCl até 5%. Em pH 6,5, a quimosina cliva a αs_2-caseína nas regiões hidrofóbicas da molécula, ou seja, nos resíduos 90-120 e 160-207 (McSWEENEY et al., 1993c).

2.4.1.1. Contribuição do coagulante na maturação de queijos

A função principal da quimosina e de outros coalhos é dar inicio à formação de um coágulo; contudo, apenas uma pequena parte da quimosina (3-6%) adicionada ao leite é retida na coalhada e continua sua ação sobre as proteínas durante a maturação. A atividade coagulante residual é influenciada por diversos fatores, incluindo o tipo de coalho usado, o pH na fase de drenagem do soro, o pH final do queijo e a temperatura usada durante a fabricação. Segundo CREAMER et al. (1985) e HOLMES et al. (1977), a distribuição de quimosina entre o coágulo e o soro é dependente do pH, o que não ocorre com os coalhos microbianos. A proporção de quimosina retida no coágulo é fortemente influenciada pelo pH durante a drenagem do soro, aumentando quando o pH diminui.

Durante a maturação da maioria dos queijos, a ligação Phe_{23}-Phe_{24} da αs_1-caseína é clivada preferencialmente, com a formação de αs_1-f1-23 e αs_1-f124-199 (αs_1-I) (CREAMER & RICHARDSON, 1974).

MARCOS et al. (1979) encontraram αs_1-I, durante as etapas iniciais da maturação, em todas as variedades de queijos estudadas. O coalho tem uma ação importante durante a proteólise em queijos Cheddar e tipo Gouda, enquanto em queijos tipo suíço ele é quase totalmente desnaturado pelas altas temperaturas de cocção usadas durante a fabricação (MATHESON, 1981).

O'KEEFFE et al. (1978) e VISSER & de GROOT-MOSTERT (1977) estudaram a contribuição do coagulante na proteólise em queijos Cheddar e tipo Gouda, respectivamente. O'KEEFFE et al. (1978) relataram que em queijo Cheddar, o coagulante era responsável pela produção de peptídeos maiores. Em queijos tipo Gouda, fabricados sem adição de fermento, VISSER & de GROOT-MOSTERT (1977) encontraram que o coalho, quando presente em níveis normais, era responsável pela degradação observada nas caseínas αs_1 e β durante o primeiro mês de maturação.

VISSER (1977b) mostrou que a quantidade de coalho residual em queijo tipo Gouda contribuiu para o acúmulo de peptídeos solúveis, mas não de aminoácidos. Estas observações estão de acordo com O'KEEFFE et al. (1978), que mostraram que o coagulante era responsável principalmente pela formação de peptídeos maiores em queijo Cheddar.

CREAMER & OLSON (1982) demonstraram que o coalho contribuía para o amolecimento do queijo durante o início da maturação, via hidrólise da αs_1-caseína na ligação Phe_{23}-Phe_{24}. A proteólise do peptídeo resultante, αs_1-f24-199 pelo coagulante e outras proteinases, contribuiu para a modificação da textura do queijo (FOX, 1993). DE JONG (1976) também descreveu a relação entre proteólise

e textura, usando um queijo mole como exemplo. VISSER (1977a) relatou que o coalho em níveis normalmente presentes em queijo tipo Gouda, produzia peptídeos amargos lentamente durante a maturação, com amargor detectável por volta de 2 a 3 meses e definido aos 6 meses.

O nível de quimosina retido na coalhada aumenta com a diminuição do pH na fase de drenagem do soro; contudo, no caso de coalhos microbianos, uma menor proporção é retida na coalhada, e sua retenção é independente do pH (CREAMER et al.,1985). LAWRENCE et al. (1984) observaram maior retenção de quimosina na coalhada ácida do queijo Chesire que em Cheddar feito com o mesmo leite; além disso, houve maior atividade de quimosina em menores valores de pH.

Como já exposto, parece provável que o principal fator determinante do nível de quimosina residual seja o tratamento térmico durante a fabricação. MATHESON (1981) descreveu a ausência de atividade de quimosina em queijos submetidos a altas temperaturas durante o processamento, como os queijos suiços, Parmesão e Mussarela. Entretanto, é provável que uma pequena quantidade da enzima ativa cause proteólise sob as condições de pH, temperatura e concentração de sal usadas durante a fabricação e maturação de queijo tipo suíço. BOUDJELLAB et al. (1994) usaram imunoensaio (ELISA) para detectar quimosina residual em queijos; os autores observaram que no queijo Saint-Paulin, de massa não cozida, 22,5% da quantidade total de quimosina adicionada ao leite estava presente na coalhada e 73,5% no soro. Num queijo tipo suíço (Comte), apenas cerca de 14% da quimosina adicionada foi detectada na coalhada enquanto que no soro, estava totalmente inativada.

CREAMER (1975) mostrou que a αs1-caseína foi degradada mais rapidamente que a β-caseína em queijos Gouda e Cheddar, e que a αs1- e αs1-I foram degradadas mais rapidamente em Cheddar que em Gouda. A hidrólise mais rápida da αs1-caseína em Cheddar que em Gouda poderia ser devido à remoção

do soro e adição de água durante a fabricação de queijo Gouda, que pode reduzir a quantidade de coalho retido na coalhada deste queijo. Além disso, o menor pH do Cheddar poderia favorecer a atividade do coalho.

2.4.2. Proteinases nativas do leite

A plasmina é a principal proteinase nativa do leite, uma serina-proteinase com atividade semelhante à tripsina, com um pH ótimo ao redor de 7,5 e uma alta especificidade para ligações peptídicas envolvendo resíduos de lisina. É ativa sobre todas as caseínas, mas a αs_2- e β-caseínas são os substratos preferidos. Em queijos, a hidrólise da β-caseína por plasmina produz γ-caseínas (β-f29-209, β-f106-209 e β-f108-209) e proteoses-peptonas (β-f1-28, f1-105/107 e f29-105/107) (ANDREWS, 1983; ANDREWS & ALICHANIDIS, 1983). Quando em solução, a αs_1- e αs_2-caseínas são susceptíveis à hidrólise pela plasmina.

LE BARS & GRIPON (1989) estudaram a especificidade da plasmina sobre a αs_2-caseína em solução usando cromatografia líquida com coluna de fase reversa (RP-HPLC). Os autores observaram a ação da plasmina em oito sítios (Lys_{21}-Gly_{22}, Lys_{24}-Asn_{25}, Arg_{114}-Asn_{115}, Lys_{149}-Lys_{150}, Lys_{150}-Thr_{151}, Lys_{181}-Thr_{182}, Lys_{188}-Ala_{189} e Lys_{197}-Thr_{198}), com a produção de cerca de 14 peptídeos, três dos quais possivelmente amargos.

Embora a αs_1-caseína seja hidrolisada lentamente pela plasmina, a produção de λ-caseína tem sido atribuída a essa hidrólise. Le BARS & GRIPON (1993) descreveram a hidrólise da αs_1-caseína por plasmina bovina, resultando na formação de 15 peptídeos, devido à clivagem de 11 das 20 ligações peptídicas passíveis de hidrólise pela plasmina. McSWEENEY et al. (1993c) relataram que os principais sítios de clivagem da αs_1-caseína pela plasmina eram Arg_{22}-Phe_{23}, Arg_{90}-Tyr_{91}, Lys_{102}-Lys_{103}, Lys_{103}-Tyr_{104}, Lys_{105}-Val_{106}, Lys_{124}-Glu_{125} e Arg_{151}-Glu_{152}.

EIGEL (1977) observou que não havia hidrólise da κ-caseína pela plasmina nas condições que permitiam a hidrólise completa da fração αs_1. Contudo, ANDREWS & ALICHANIDIS (1983) relataram que a hidrólise da κ-caseína teve uma pequena contribuição na fração de proteose-peptona formada no leite por ação da plasmina. A resistência da κ-caseína à proteólise é importante devido ao papel desta fração na estabilização de outras caseínas, contra a precipitação no leite por influência do cálcio.

A catepsina D é outra proteinase nativa com um pH ótimo na faixa ácida. Embora sua especificidade nas frações de caseína ainda não tenha sido determinada, KAMINOGAWA & YAMAUCHI (1972) e McSWEENEY et al. (1994a) relataram que, estudos eletroforéticos de caseínas incubadas com proteinase ácida do leite ou catepsina D mostraram que têm uma especificidade semelhante à quimosina. Observaram também que a catepsina D tinha baixa especificidade pela κ-caseína e propriedades coagulantes muito baixas. McSWEENEY et al. (1994a) observaram que a ação da catepsina D sobre a αs_1-caseína tinha um pH ótimo ao redor de 4,0 e na presença de 1% de NaCl.

2.4.2.1 Contribuição da plasmina na maturação de queijos

Como já mencionado, a plasmina está associada com as micelas de caseína e está presente na coalhada. FARKYE & FOX (1990b), estudando o grau de atividade da plasmina em vários tipos de queijos, observaram que no Emmental esta proteinase possuia cerca de 2,5 vezes mais atividade que no Cheddar, o que está de acordo com os resultados obtidos por RICHARDSON & PEARCE (1981), que encontraram 6-13 e 3-4,5μg plasmina/g em queijo tipo Suíço e Cheddar, respectivamente.

LAWRENCE et al. (1987) atribuíram a maior atividade em queijo suíço que em Cheddar ao pH mais alto do queijo suíço. FOX (1989) sugeriu que o método de salga pudesse afetar a atividade de plasmina. Uma vez que a plasmina é dissociada das micelas de caseína pelo sal (GRUFFERTY & FOX, 1988), o queijo Cheddar que é salgado antes da prensagem, pode perder mais plasmina no soro que os queijos suíço e holandeses, que são salgados em salmoura. No entanto, FARKYE & FOX (1990b) observaram que o pH durante a drenagem tinha pouco efeito sobre a atividade da plasmina em queijos, o que está de acordo com as observações de GRUFFERTY & FOX (1988), nas quais a plasmina permanece associada às micelas de caseína em pH de 4,6 a 6,6; o método de salga também não influencia a sua retenção no queijo. Por outro lado, os autores concluíram que a atividade da plasmina era influenciada pelas temperaturas usadas durante a fabricação, o que explicava as diferenças entre o queijo suíço (cerca de 52°C) e Cheddar (em torno de 38°C).

A plasmina contribui em diferentes graus para a maturação de vários tipos de queijos (LAWRENCE et al., 1987; NOOMEN, 1978; OLLIKAINEN & KIVELA, 1989; VISSER & de GROOT-MOSTERT, 1977). Acredita-se que ela tenha relativamente pouca importância em queijos Cheddar e Gouda, que são cozidos em baixas temperaturas (37-39°C); sua contribuição é pequena em relação ao coalho e às bactérias do fermento (VISSER & de GROOT-MOSTERT, 1977). No entanto, as temperaturas de cozimento superiores a 50°C usadas na fabricação de queijo tipo suíço, causam a desnaturação da quimosina tornando a plasmina relativamente mais importante na maturação destes queijos (LAWRENCE et al., 1987).

CREAMER et al. (1985) apresentaram evidências para a atividade de plasmina em queijo tipo Gouda. A β-caseína foi degradada mais rapidamente em Gouda que em Cheddar, com acúmulo de γ-caseínas no primeiro. Ainda não está bem esclarecido porque a β-caseína em queijo Cheddar é degradada mais lentamente que em Gouda. Os valores de pH para os queijos Cheddar e Gouda

com 14 semanas foram de 4,95 e 5,38, respectivamente. Uma vez que a plasmina tem pH ótimo ao redor de 7,5, CREAMER et al. (1985) sugeriram que isto poderia explicar a maior atividade em queijo tipo Gouda; por outro lado, o valor de pH de 4,95 para o queijo Cheddar foi baixo em relação aos valores normalmente observados.

GRAPPIN et al. (1985) sugeriram que o pH do queijo Cheddar era desfavorável para a atividade de plasmina. FARKYE & FOX (1991) usaram um inibidor de plasmina, o ácido 6-aminohexanóico (AHA), e observaram que queijos contendo este inibidor apresentavam uma taxa reduzida de proteólise. Isto sugere que a atividade de plasmina em queijo Cheddar tenha sido subestimada, uma vez que estes resultados mostraram que a enzima realmente contribui na maturação do queijo Cheddar. Num estudo subseqüente, FARKYE & FOX (1992) mostraram que houve uma maior proteólise da β-caseína, com aumento das γ-caseínas, devido à maior atividade de plasmina no queijo.

VISSER et al. (1983) associaram o amargor do queijo com peptídeos hidrofóbicos. A hidrólise de αs_2- e β-caseína produz peptídeos, supostamente amargos; no entanto, os autores não encontraram amargor em nenhum dos queijos estudados. VISSER (1977a) também observou que a plasmina por si só não tinha uma contribuição significativa para o amargor em queijo tipo Gouda.

2.4.3. Enzimas proteolíticas do fermento

Como já mencionado anteriormente, os fermentos usados na fabricação de queijos incluem culturas mesofílicas de *Lactococcus* e *Leuconostoc* (usadas em queijos Cheddar e tipo Gouda) e culturas termofílicas de *Lactobacillus* e *Streptococcus* (usadas na fabricação de Parmesão e queijos suiços). Estas culturas devem crescer rapidamente, atingindo altas concentrações de células no leite e

produzir ácido láctico em proporções adequadas, de acordo com o processo de fabricação. A produção rápida de ácido, com o concomitante decréscimo do pH, é o principal fator de controle de crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes.

Embora fracamente proteolíticas, quando comparadas com outros gêneros de bactérias como *Bacillus, Proteus* e *Pseudomonas,* as bactérias lácticas possuem um sistema proteolítico complexo, composto por vários tipos de enzimas que podem hidrolisar completamente peptídeos derivados de caseína a aminoácidos (GRIPON et al., 1991). Os níveis de aminoácidos naturalmente presentes no leite são muito baixos e insuficientes para fornecer as condições adequadas para o crescimento das bactérias do fermento (THOMAS & MILLS, 1981). Entretanto, as proteinases e peptidases são capazes de hidrolisar as proteínas do leite, gerando peptídeos e aminoácidos, fornecendo assim os nutrientes essenciais e garantindo as condições ótimas de crescimento (THOMAS & PRITCHARD, 1987), além de gerar compostos envolvidos no desenvolvimento das características desejáveis de "flavour" e textura durante a maturação dos queijos.

A principal enzima no sistema proteolítico de *Lactococcus spp.* é uma serina-proteinase, associada à parede celular, localização essa que lhe dá fácil acesso às proteínas extracelulares. Possuem um peso molecular na faixa de 100 a 210 kDa, têm atividade ótima entre pH 6,0 e 7,0 e são ativadas ou estabilizadas por cálcio (LAAN et al., 1989; 1992).

As proteinases de *Lactococcus* podem ser classificadas de acordo com a sua especificidade (VISSER et al., 1986; 1988; 1991); sua atividade (EXTERKATE, 1976) e as suas características imunológicas (HUGENHOLTZ et al., 1984). A primeira classificação com base no pH e temperatura ótimos foi proposta por EXTERKATE (1976), com a identificação de três tipos, P_I e P_{III} com atividade ótima em pH ácido e a 30 e 40°C, respectivamente, e P_{II} com atividade ótima em pH neutro e a 30°C. VISSER et al. (1986) propuseram uma classificação com base

na especificidade ao substrato e reuniram em três grupos, P_I, P_{III} e P_I/P_{III}. As proteinases do tipo P_I, presentes em *Lc. lactis* subsp. *cremoris* HP e Wg2, degradam β-caseína, com ligeira ou nenhuma ação sobre αs_1-caseína, enquanto as do tipo P_{III}, presentes em *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM1 e SK11, hidrolisam prontamente αs_1-, αs_2- e β-caseínas; as do tipo P_I/P_{III} têm uma especificidade intermediária (VISSER et al., 1986). Estes três grupos de proteinases podem hidrolisar a fração αs_1-f1-23, que é produzida rapidamente por ação da quimosina (FOX et al., 1994).

A especificidade de várias proteinases ligadas à parede celular, em termos de ligações peptídicas clivadas nas αs_1- e β-caseínas, foi estudada e descrita por vários autores (MONNET et al., 1986; 1989; 1992; VISSER et al., 1988; 1991). MONNET et al. (1986) relataram que a proteinase ligada à parede celular de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763 produziu cinco peptídeos pequenos a partir da região hidrofóbica C-terminal da β-caseína (β-CN f176-182, f183-193, f194-207, f194-209 e f167-175), quatro dos quais considerados potencialmente amargos. A especificidade destas proteinases nas αs_1-, αs_2- e κ-caseína, αs_1-CN f1-23, cadeia B da insulina e no glicomacropeptídeo (κ-CN f106-169) foi estudada por MONNET et al. (1992). Estes autores observaram que a preferência aparente destas proteinases pela região hidrofóbica da β-caseína não foi confirmada para outras caseínas menos hidrofóbicas. Os autores relataram ainda que a especificidade aparente também depende do substrato usado; sua ação na αs_1-CN f1-23 parece ser do tipo P_{III}, na β-caseína do tipo P_I e aparentemente P_{III} na αs_1-caseína.

Embora a maioria das proteinases de *Lactococcus* esteja associada à parede celular, MUSET et al. (1989) e ZEVACO & DESMAZEAUD (1980) descreveram o isolamento e especificidade de proteinases intracelulares de duas espécies de Lactococcus. ZEVACO & DESMAZEAUD (1980) estudaram a especificidade de uma proteinase neutra intracelular de Lc. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis, capaz de clivar lentamente a β-caseína em Phe_{186}-Ile_{187} e Ala_{189}-Phe_{190}. MUSET et al. (1989)

isolaram uma metaloproteinase intracelular de uma linhagem mutante de *Lc. lactis* subsp. *lactis* NCDO 763, com especificidade diferente da proteinase ligada à parede celular.

As proteinases de *Lactobacillus* não têm sido tão extensivamente estudadas quanto as de *Lactococcus*. A maior parte dos trabalhos indica que as proteinases de *Lactobacillus* spp. são associadas à parede celular, capazes de hidrolisar αs_1- e β-caseínas (EZZAT et al., 1985).

Os oligopeptídeos produzidos a partir das caseínas por ação das proteinases são a seguir degradados por peptidases, formando peptídeos pequenos e aminoácidos. Os aminoácidos formados são necessários para a nutrição celular e além disso, atuam como precursores dos compostos responsáveis pelo desenvolvimento do "flavour" em queijos.

Existem vários estudos realizados com as peptidases sobre o seu isolamento, purificação e caracterização com respeito a subunidades, ponto isoelétrico, pH e temperatura ótimos, sensibilidade a vários reagentes químicos e especificidade de substrato (TAN et al., 1992, 1993). Em comparação com as peptidases de Lactococcus, as informações sobre estas enzimas em Lactobacillus são muito limitadas.

As principais peptidases encontradas em *Lactococcus* são exopeptidases, que liberam aminoácidos da porção N-terminal dos peptídeos. As endopeptidases hidrolisam peptídeos maiores, atuando em ligações peptídicas dentro da cadeia, em pontos que se distanciam das extremidades amínica e carboxílica; possuem uma especificidade aos substratos muito ampla.

A atividade das endopeptidases é essencial para a degradação completa dos peptídeos originados da caseína por ação de proteinases. YAN et al. (1987 a,b) identificaram duas endopeptidases, LEP I e LEP II em *Lc. lactis* subsp. *cremoris* H61. Ambas as enzimas foram classificadas como metalopeptidases, uma vez que

foram inativadas por EDTA. A atividade de LEP I foi totalmente recuperada por Mn^{2+}, enquanto a LEP II foi regenerada por quantidades micromoleculares de Zn^{2+}.

A enzima LEP I mostrou alta afinidade por ligações Glu-Asn e atividade ótima em pH 7,0 e 40°C. A LEP II apresentou especificidade de substrato mais ampla, porém mostrou uma preferência por ligações peptídicas contendo grupamentos amínicos provenientes de aminoácidos hidrofóbicos. Esta enzima apresentou atividade ótima em pH 6,0 e 37°C. Estas endopeptidases também podem hidrolisar a αs_1-CN f1-23 mas não αs_1- ou β-caseínas.

TAN et al. (1991) isolaram e purificaram uma outra endopeptidase (Pep O) de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Esta enzima foi inibida por EDTA e reativada por Co^{2+}; apresentou um pH ótimo de 6,3 e uma grande especificidade de substrato. Mostrou-se ativa sobre glucagon, cadeia B da insulina e dois peptídeos derivados da β-caseína. A Pep O também foi isolada de *Lc. lactis* subsp. *lactis* MG1363 e caracterizada por STEPANIAK & FOX (1995). Esta enzima foi capaz de hidrolisar rapidamente a αs_1-CN f1-23, αs_1-CN f165-199 e três dos cinco peptídeos menores liberados pela ação da quimosina sobre a αs_1-caseína.

A Pep F, uma endopeptidase de *Lc. lactis* foi caracterizada por MONNET et al. (1994). É uma oligopeptidase típica, uma vez que hidrolisa somente peptídeos contendo mais que sete e menos que dezessete resíduos de aminoácidos. A Pep F é semelhante à LEP I e diferente da LEP II, que é capaz de hidrolisar tanto peptídeos menores (cinco aminoácidos) como maiores (trinta aminoácidos).

As exopeptidases intracelulares isoladas de *Lactococcus* incluem aminopeptidases com especificidade ampla (Pep N) e mais restrita (Pep A, Pep C), dipeptidil aminopeptidases (Pep X), di- e tripeptidases e peptidases prolina-específicas, mas aparentemente nenhuma carboxipeptidase (FOX et al., 1994; TAN et al., 1993).

TAN & KONINGS (1990) purificaram e caracterizaram a Pep N de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Esta enzima é uma metalopeptidase com peso molecular de 95 kDa, atividade ótima a pH 7,0 e 40°C. Embora sua especificidade aos substratos seja grande, não se mostrou ativa sobre dipeptídeos contendo alanina como aminoácido N-terminal, enquanto tri-, tetra-, penta- e hexa alanina e tripeptídeos contendo alanina na posição N-terminal foram hidrolisados, sugerindo que esta enzima tenha uma ação preferencial sobre unidades maiores que dipeptídeos.

A Pep C purificada de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 (NEVIANI et al., 1989) não é uma metaloproteína, mas é semelhante à Pep N quanto à ampla especificidade de substrato, sendo capaz de hidrolisar di- e tripeptídeos.

A Pep A foi purificada a partir de *Lc. cremoris* HP por EXTERKATE & VAN DE VEER (1987) e de *Lc. lactis* NCDO 716 por NIVEN (1991). É uma aminopeptidase que exibe especificidade para peptídeos com resíduos glutamil e aspartil na posição N-terminal.

As aminopeptidases de *Lactobacillus* spp. também têm sido purificadas e caracterizadas, como por exemplo a partir de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (BOCKELMANN et al., 1992), de *Lb. lactis* (EGGIMANN & BACHMANN, 1980) e de *Lb. acidophilus* R-26 (MACHUGA & IVES, 1984). Estas enzimas são classificadas como metalopeptidases, com um pH ótimo ao redor de 7,0. As aminopeptidases de fermentos termófilos de *Lactobacillus* spp. possuem atividade ótima em temperaturas maiores que aquelas de *Lactococcus*, ou seja 48°C para as enzimas de *Lb. lactis* e 50°C para as de *Lb. bulgaricus*.

As caseínas contém uma alta proporção de resíduos de prolina. A hidrólise destas caseínas, particularmente a fração β, que apresenta 35 resíduos de prolina, leva à formação de oligopeptídeos ricos em prolina, cuja degradação requer peptidases prolina-específicas.

MOU et al. (1975) encontraram três destas enzimas, aminopeptidase P, prolinase e prolina iminopeptidase em *Lc. cremoris* SK11, *Lc. lactis* C2 e *Lc. lactis* DRC1. Uma outra enzima, a prolil-dipeptidil aminopeptidase (Pep X) foi purificada a partir de *Lc. lactis* NCDO 763 (ZEVACO et al., 1990). É uma serina-peptidase, com atividade ótima em pH 8,5 e 40-45°C. A Pep X também foi isolada e caracterizada a partir de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 por BOOTH et al. (1990b).

Os produtos liberados da ação da Pep X podem ser hidrolisados pela prolidase. Esta enzima foi detectada em *Lc. lactis* subsp. *cremoris* H61 (KAMINOGAWA et al., 1984) e em *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 (BOOTH et al., 1990a). Ambas as enzimas foram inibidas por EDTA, indicando tratar-se de metaloenzimas. A prolidase de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 teve um pH ótimo na faixa de 7,3 a 8,25, foi ativa em todos os substratos aminoacil-prolina testados, exceto em Gly-Pro; também apresentou atividade sobre o dipeptídeo Pro-Pro.

As peptidases prolina-específicas também têm sido detectadas em bactérias lácticas termófilas. CASEY & MEYER (1985) observaram a presença de Pep X em várias linhagens de *Lactobacillus* e *Streptococcus*. MEYER & JORDI (1987) isolaram e caracterizaram a Pep X de *Lb. casei* e *Str. thermophilus*, que se mostraram muito semelhantes às Pep X de lactococos. A Pep X também foi isolada de *Lb. helveticus* (KHALID & MARTH, 1990) e de *Lb. bulgaricus* e *Lb. acidophilus* (BOCKELMANN et al., 1991).

As di- e tripeptidases são necessárias para a liberação de aminoácidos a partir de peptídeos pequenos, ou seja, di- e tripeptídeos. BOSMAN et al. (1990) caracterizaram uma tripeptidase de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Esta enzima mostrou uma ampla especificidade de substrato mas não hidrolisou tripeptídeos contendo uma prolina como penúltimo aminoácido. DESMAZEAUD & ZEVACO (1979)

purificaram parcialmente uma tripeptidase de *Lc. lactis* CNRZ 267 com propriedades semelhantes às tripeptidases isoladas de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* Wg2.

Dipeptidases de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* H61 e de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 foram purificadas e caracterizadas por HWANG et al. (1981) e por VAN BOVEN et al. (1988). Estas enzimas possuem uma ampla especificidade de substrato, necessitam de íons metálicos para a sua atividade e são inibidas por agentes redutores.

WOHLRAB & BOCKELMANN (1992) purificaram e caracterizaram uma dipeptidase de *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus* B14. Apesar de algumas diferenças, esta dipeptidase apresentou várias características em comum com aquelas de *Lactococcus*.

2.4.3.1. Contribuição das proteinases e peptidases do fermento na maturação de queijos.

Vários estudos têm sido realizados em queijos Cheddar e Gouda para determinar o papel destas enzimas na proteólise durante a maturação (KLETER, 1976; O'KEEFFE et al., 1976, 1978; VISSER, 1977a,b; VISSER & de GROOT-MOSTERT, 1977). Os resultados destes estudos mostram que, enquanto o coagulante é responsável pela formação de peptídeos maiores, os peptídeos menores e aminoácidos livres são produzidos principalmente pelas peptidases do fermento.

O'KEEFFE et al. (1978) relataram que em queijo Cheddar, as proteinases do fermento têm uma contribuição significativa na formação de peptídeos pequenos ou seja, a fração nitrogenada solúvel em ácido tricloroacético (TCA). Os autores observaram níveis mais altos de nitrogênio solúvel em TCA 12% em queijos produzidos com fermento do que naqueles fabricados por acidificação química.

KLETER (1976) estudou a maturação de queijo Gouda produzido por acidificação química; o queijo isento de enzimas provenientes de bactérias apresentou níveis mais baixos de aminoácidos quando comparado com o produzido com fermento, estabelecendo a contribuição das proteinases e peptidases do fermento na formação de peptídeos pequenos e aminoácidos em queijo tipo Gouda.

FARKYE et al. (1990) estudaram a proteólise e a qualidade organoléptica de queijos Cheddar feitos com variantes Prt^+ e Prt^- da mesma linhagem de *Lactococcus*. Os perfis eletroforéticos dos queijos foram idênticos, enquanto os das frações solúveis em água foram visivelmente diferentes, indicando que as proteinases do fermento atuam na hidrólise de peptídeos produzidos a partir das caseínas pelo coalho ou por proteinases nativas. Os queijos feitos com a variante Prt^+ receberam pontuações ligeiramente maiores para o "flavour" que os feitos com a variante Prt^-; contudo, a qualidade de todos os queijos foi considerada boa. Os autores observaram que estes resultados sugerem que as peptidases do fermento podem ser mais importantes que as proteinases no desenvolvimento do "flavour" durante a maturação. STADHOUDERS et al. (1988) relataram que queijos tipo Gouda feitos exclusivamente com linhagens Prt^- apresentaram níveis reduzidos de proteólise e sem "flavour" definido, quando comparados com os feitos com linhagens Prt^+.

A atividade de proteinase em queijo tipo Gouda foi estudada por KAMINOGAWA et al. (1986). Os três principais peptídeos isolados foram αs_1-CN f1-9, f1-13 e f1-14, produzidos a partir de αs_1-CN f1-23. A hidrólise da fração 1-23 produziu vários outros peptídeos além destes três. Entretanto, eles não foram detectados e provavelmente foram quebrados em peptídeos menores e aminoácidos, por aminopeptidases de bactérias lácticas. Os três peptídeos, αs_1-CN f1-9, f1-13 e f1-14 contém a seqüência N-terminal H-Arg-Pro-Lys-His-Pro... e seriam susceptíveis à clivagem por Pep X, liberando Arg-Pro. Contudo, o acúmulo destes peptídeos sugere que

a Pep X esteja inativa no queijo. Talvez isto ocorra porque a Pep X não é liberada de células mortas ou a enzima é inativa ou instável no queijo (FOX et al., 1994).

SINGH et al. (1994) isolaram e identificaram os dois principais peptídeos no extrato solúvel em água ultrafiltrado de queijo Cheddar como αs_1-CN f1-9 e αs_1-CN f1-13. Pode-se assumir que estes dois peptídeos sejam produzidos a partir de αs_1-CN f1-23, pela ação da proteinase do tipo P_I de *Lactococcus*. De acordo com EXTERKATE et al. (1991), as proteinases do tipo P_I de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* HP hidrolisam a αs_1-CN f1-23 nas posições His_8-Gln_9, Gln_9-Gln_{10}, Gln_{13}-Gln_{14}. Contudo, os peptídeos não contribuiram significativamente para o "flavour" do Cheddar, uma vez que foi demonstrado que queijos Cheddar de alta qualidade podiam ser produzidos usando um fermento Prt^- (FARKYE et al., 1990).

A β-caseína é hidrolisada preferencialmente pelas proteinases associadas à parede celular de *Lactococcus*; a especificidade das proteinases P_I e P_{III} sobre a β-caseína foi determinada por MONNET et al. (1988) e por REID et al. (1991). Os principais sítios de clivagem estão na região C-terminal da β-caseína. McSWEENEY et al. (1993d) estudaram a importância destas proteases na proteólise primária da β-caseína em queijos Cheddar. A análise eletroforética dos queijos com 6 meses mostrou a ausência dos peptídeos produzidos a partir da β-caseína por proteinases, sugerindo que estas enzimas não sejam significativas na proteólise primária destes queijos. SINGH et al. (1995) identificaram nove peptídeos no retentado ultrafiltrado de Cheddar. Estes peptídeos poderiam ser formados pela ação das proteinases sobre a β-caseína intacta, ou mais provavelmente sobre uma proteose-peptona, resultante da hidrólise por plasmina.

A contribuição dos fermentos termófilos na proteólise em queijos não tem sido estudada com a mesma intensidade que os fermentos mesófilos. Uma proteólise mais extensa ocorre em variedades de queijos suiços e italianos duros como o Parmesão, e o "flavour" característico destes queijos é fortemente

influenciado pelos produtos de proteólise. ADDEO et al. (1992) identificaram os peptídeos de baixo peso molecular em queijo Parmegiano-Reggiano. A análise por HPLC indicou uma diminuição nos níveis de peptídeos com baixa hidrofobicidade, enquanto a concentração de peptídeos hidrofóbicos não foi afetada com o tempo. Durante a maturação, há um aumento na concentração de aminoácidos livres, sugerindo que os peptídeos de baixa hidrofobicidade foram degradados a aminoácidos livres ou peptídeos solúveis em TCA 12%.

ADDEO et al. (1994) observaram que a maioria dos peptídeos na fração solúvel em TCA 12% do queijo Parmesão era produzida a partir da β-caseína. Esta fração desapareceu do queijo antes que qualquer outra caseína; porém, durante a maturação, seus peptídeos se mostraram mais resistentes à hidrólise que aqueles produzidos a partir de outras caseínas.

2.5. Significado da proteólise

A proteólise é o fator fundamental que influencia o grau de desenvolvimento da textura e do "flavour" na maioria das variedades de queijos. A contribuição da proteólise na maturação de queijos ocorre pela ação de pelo menos quatro fatores: (1) pela contribuição direta no "flavour", através de peptídeos e aminoácidos, sendo que alguns deles podem causar "off-flavours", como por exemplo amargor, ou indiretamente via catabolismo de aminoácidos a aminas, ácidos, tióis, tioésteres, etc.; (2) pelo aumento na liberação de compostos com sabor durante a mastigação; (3) por alterações no pH, via formação de NH_3 e, (4) por modificações na textura devido à quebra da rede protéica, aumento do pH e maior ligação de água pelos novos grupamentos amínicos e carboxílicos formados (FOX, 1989; VISSER, 1993).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

2.5.1. Proteólise e textura

O desenvolvimento de uma textura adequada é um aspecto importante na maturação de queijos.

O queijo fresco consiste numa matriz protéica esponjosa contendo glóbulos de gordura e uma fase aquosa em que vários compostos estão dissolvidos. As propriedades iniciais da matriz protéica são fortemente dependentes do pH em que o soro é drenado, e afeta tanto o nível de cálcio como a umidade da matriz. Quando o pH cai, uma grande parte do fosfato de cálcio e parte das caseínas nas micelas se tornam solúveis (ROEFS et al., 1985) e cálcio e fosfato são perdidos no soro.

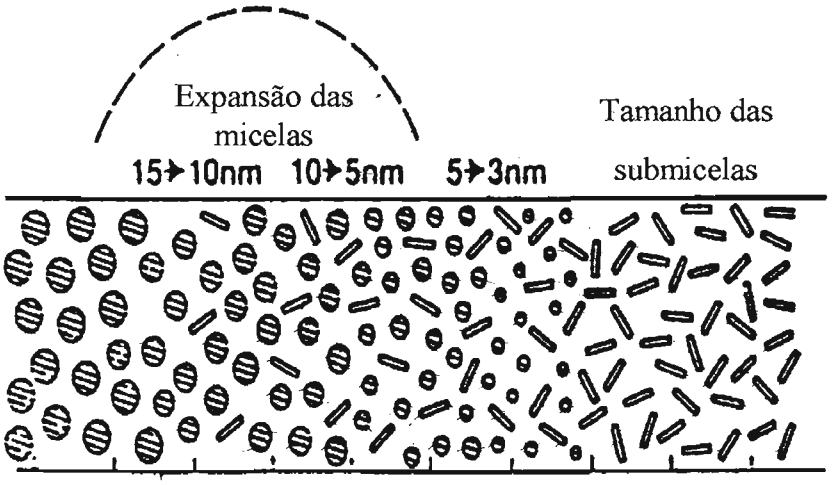
As mudanças resultantes no tamanho e natureza das micelas permitem que elas absorvam mais água (CREAMER et al., 1985; ROEFS et al., 1985; SNOEREN et al., 1984) e a hidratação máxima ocorre em pH 5,35. A hidratação da caseína também aumenta na presença de cloreto de sódio entre pH 5,0 e 5,4. Da mesma forma, num determinado valor de pH, a solubilização das micelas pelo cloreto de sódio diminui quando a concentração de cálcio em solução aumenta (CREAMER et al.,1985). Isto explica as observações de que uma relação mais alta de Ca^{++}/Na^{++} resulta num queijo mais firme (WALSTRA & VAN VLIET, 1982).

Na maioria dos tipos de queijos, quando o pH cai abaixo de 5,5, há uma dissociação progressiva das micelas em agregados menores de caseínas (HALL & CREAMER, 1972; DE JONG, 1978; ROEFS et al., 1985). Entretanto, o queijo Gouda que tem um pH de 5,2 após a salga, as unidades estruturais na matriz protéica parecem ser semelhantes às micelas originais (DE JONG, 1978; HALL & CREAMER, 1972).

As caseínas em pH baixo (próximo ao ponto isoiônico), estabilizadas por ligações iônicas fortes e interações hidrofóbicas, são mais intimamente associadas em agregados e portanto, o teor de umidade da matriz de caseína é baixo, e o queijo adquire uma textura friável (Figura 4). Em valores mais elevados de pH, há menor dissociação do fosfato de cálcio na micela de caseína e a coalhada apresenta maior concentração de cálcio e fosfato. As caseínas em maiores valores de pH, têm uma carga líquida negativa e absorvem umidade, resultando numa matriz protéica com alto teor de umidade (CREAMER & OLSON, 1982; LAWRENCE et al., 1987).

Nos estágios iniciais da maturação, para a maioria das variedades de queijos, a ação do coalho sobre a αs_1-caseína é o principal evento. Em queijos submetidos a temperaturas moderadas (< 40°C) durante a fabricação, a maior parte da αs_1-caseína é hidrolisada pelo coalho residual que permanece ativo, fornecendo αs_1-I-caseína num período de dois meses. Há uma relação próxima entre a quantidade de αs_1-caseína hidrolisada e a consistência do queijo (CREAMER & OLSON, 1982; DE JONG, 1976, 1977; JOHNSTON et al., 1994).

Como já discutido anteriormente, o efeito da proteólise na consistência do queijo está intimamente relacionado com o pH na fase de drenagem, que determina os seus teores de minerais e umidade. Os valores mais altos de pH em queijos como os suíços ou Gouda (com seus maiores teores de umidade e cálcio) permitem o amolecimento da massa elástica à medida que a proteólise progride. Os valores de pH e os teores de cálcio e umidade do queijo Cheddar (intermediários entre aqueles do Gouda e Chesire) permitem a desintegração da rede de caseína durante a proteólise e o queijo adquire uma textura mais macia e com pequenos coágulos. Queijos com baixos valores de pH como o Chesire (com seus baixos teores de umidade e cálcio) se tornam mais frágeis e quebradiços, à medida que a proteólise evolui e a matriz protéica é quebrada.



pH	5,5	5,4	5,3	5,2	5,1	5,0	4,9	4,8	4,7	4,6
Cálcio (mmol/kg)		220		200		180		160		140
Textura (14 dias)		Elástico		"Cheddary"			Friável			
			Maleável			Farinhento			Não-coesivo	
Queijos típicos			Gouda		Cheddar			Chesire		Stilton

FIGURA 4: Representação esquemática do efeito do pH e cálcio na microestrutura e textura de queijos (Adaptado de LAWRENCE et al., 1987).

O baixo pH de queijos como Chesire, que está próximo do ponto isoelétrico das caseínas, combinado com o baixo teor de umidade impede que as caseínas se tornem solúveis (CREAMER & OLSON, 1982; CREAMER et al., 1988; LAWRENCE et al., 1987). O gradiente de pH estabelecido na superfície de queijos como o Camembert, é responsável pela difusão do fosfato de cálcio para a superfície (LE GRAET et al., 1983; NOOMEN, 1983). A perda de proteína estabilizada por cálcio e fosfato de cálcio permite que o queijo amoleça.

De uma maneira objetiva, pode-se resumir que o efeito da proteólise na textura de queijos é determinado pelo pH e teores de cálcio, fosfato e de umidade. No decorrer da maturação ocorrem as seguintes mudanças na textura: o módulo de elasticidade aparente do queijo aumenta, a deformação até o ponto onde a fratura ocorre diminui e a intensidade da força no ponto de fratura inicialmente diminui e então, aumenta novamente. De acordo com WALSTRA et al.(1987a), somente a deformação até o ponto onde a fratura ocorre apresenta uma boa correlação com a maturação.

2.5.2. Contribuição da proteólise para o "flavour" de queijos

A proteólise tem um papel importante no desenvolvimento do "flavour" de queijos seja diretamente, pela formação de aminoácidos e peptídeos ou indiretamente, via catabolismo de aminoácidos (FOX, 1989). Vários trabalhos têm mostrado que a fração não volátil, solúvel em água, é importante no desenvolvimento do "flavour" (ASTON et al., 1983; ASTON & CREAMER, 1986; CLIFFE et al., 1993; ENGELS & VISSER, 1994; McGUGAN et al.,1979).

McGUGAN et al. (1979) observaram que a fração solúvel em água tinha um grande impacto na intensidade do "flavour" de queijo Cheddar, sugerindo que o efeito direto dos produtos de proteólise no "flavour" era mais importante que os efeitos indiretos como precursores de compostos voláteis. Contudo, LAW et al. (1976) observaram que mesmo quando os níveis de aminoácidos livres eram substancialmente aumentados, não se observava nenhum aumento no "flavour", sugerindo que os aminoácidos livres sozinhos não são responsáveis pelo "flavour" do Cheddar. ASTON et al. (1983) estabeleceram uma relação entre o grau de proteólise e o desenvolvimento do "flavour" em queijo Cheddar; os níveis de nitrogênio solúvel em ácido fosfotúngstico (PTA), ou seja nitrogênio amínico, foram um bom indicador da extensão do seu desenvolvimento.

"flavour" entre queijos como Cheddar, Maasdam e Gouda, que apresentaram quase a mesma concentração de aminoácidos livres. Acredita-se que os peptídeos menores e aminoácidos sejam responsáveis principalmente pelo "flavour" básico, mas os compostos formados a partir dos aminoácidos por ação enzímica ou química, são sobrepostos a este primeiro, conferindo o "flavour" global do queijo.

Os produtos finais da proteólise são os aminoácidos, e a sua degradação resulta na produção de vários compostos responsáveis pelo aroma, que provavelmente contribuem com o "flavour" da maioria dos tipos de queijos. A primeira fase do catabolismo de aminoácidos envolve reações de descarboxilação, desaminação, transaminação e clivagem da cadeia lateral dos aminoácidos. Os compostos resultantes, ou seja aminas, α-cetoácidos e também aminoácidos, são convertidos em aldeídos, principalmente pela ação de desaminases sobre as aminas. Estes aldeídos são convertidos em álcoois e ácidos após redução ou oxidação (HEMME et al., 1982; LAW, 1987; VISSER, 1993). Um esquema geral do catabolismo de aminoácidos durante a maturação de queijos é apresentado na Figura 5.

A ação de descarboxilases leva à liberação de CO_2 a partir de aminoácidos e formação das aminas correspondentes. A maioria destas descarboxilases têm atividade ótima em pH 5,5 e assim, têm um papel importante na maturação de queijos (LAW, 1987).

Geralmente as aminas têm um aroma muito forte e freqüentemente desagradável. Algumas destas aminas presentes em queijos são biologicamente ativas como tiramina, histamina, putrescina, cadaverina e feniletilamina. Estas aminas biogênicas podem exercer efeitos fisiológicos importantes em pessoas sensíveis, causando enxaqueca e hipertensão.

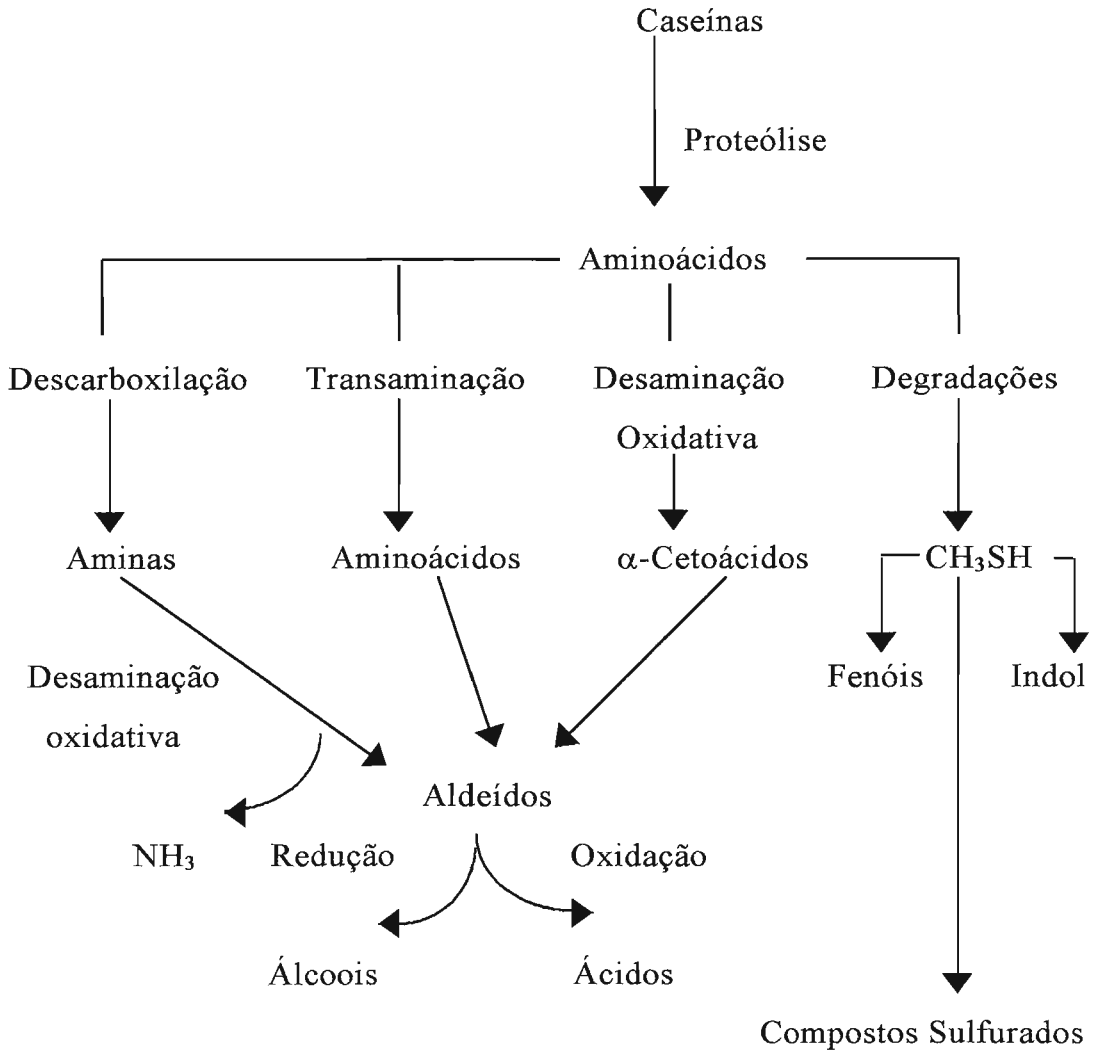


FIGURA 5: Representação esquemática do catabolismo de aminoácidos durante a maturação de queijos (HEMME et al., 1982).

A ação de transaminases resulta na formação de outros aminoácidos. Sua desaminação leva à produção de amônia e formação de α-cetoácidos ou de aldeídos. A amônia é um constituinte importante em vários queijos como Camembert e Gruyere (HEMME et al., 1982).

As cadeias laterais dos aminoácidos também podem ser modificadas. As hidrolases podem liberar amônia a partir de asparagina ou glutamina, ou por hidrólise parcial do grupo guanidínico da arginina, formando citrulina ou ornitina (HEMME et al., 1982). Fenol e indol, além de piruvato e amônia, podem ser produzidos pela ação de C-C liases sobre tirosina e triptofano.

Os compostos produzidos pela degradação de aminoácidos sulfurados, principalmente metanotiol e outros derivados sulfurados, são importantes constituintes do "flavour" do queijo Cheddar e de outras variedades. MANNING (1979a,b) detectou a presença de 2-pentanona, metanotiol e metanol em queijos Cheddar; estudos posteriores demonstraram a importância de H_2S e metanotiol (CH_3SH) no "flavour" de Cheddar, e que compostos importantes podem ser produzidos na maturação, simplesmente por reações químicas (MANNING, 1979b). Acredita-se que os aminoácidos cistina e metionina sejam a origem da formação destes compostos (LAW, 1987). Como a cistina é rara nas caseínas, ocorrendo em baixos níveis apenas em αs_2- e κ-caseínas, a origem destes compostos se deve principalmente à metionina.

2.6. Métodos utilizados para a avaliação da proteólise em queijos

A detecção e medida dos produtos de hidrólise das proteínas dos queijos são usadas como índices de maturação, uma vez que a proteólise está associada com o desenvolvimento de uma textura e sabor característicos na maioria dos tipos de queijos (LAW, 1987). Vários métodos têm sido desenvolvidos para se estudar a proteólise durante a maturação de queijos, podendo ser agrupados em métodos não-específicos, que incluem a determinação da fração nitrogenada solúvel em vários solventes, a medida de grupamentos reativos e técnicas mais específicas para a separação dos peptídeos individuais como os métodos eletroforéticos e cromatográficos. Os métodos não-específicos são adequados para se obter informações da extensão da proteólise e a

contribuição dos vários agentes (proteinases e peptidases do leite, coagulante, fermento, fermento adjunto e microrganismos resultantes de contaminação eventual) na proteólise.

Geralmente estas técnicas são simples e úteis para a avaliação rotineira da maturação de queijos, uma vez que a proteólise se correlaciona bem com a idade do queijo e em menor extensão com a qualidade. Os peptídeos resultantes da degradação de proteínas podem se acumular ou serem degradados. Para o estudo completo da proteólise há necessidade do isolamento e identificação desses peptídeos e assim, técnicas de separação como eletroforese e cromatografia passam a ser ferramentas analíticas muito úteis.

Devido à sua importância na maturação de queijos, as técnicas para avaliação da proteólise têm sido objeto de várias revisões, entre elas as de FOX (1989), INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1991) e RANK et al. (1985).

2.6.1. Fracionamento das substâncias nitrogenadas em queijos

Uma vez que as proteínas e peptídeos em queijos diferem entre si em relação ao tamanho, solubilidade e conformação, geralmente torna-se necessário a separação dos seus componentes nitrogenados em frações mais homogêneas, antes da análise.

As proteínas são insolúveis em muitos solventes; porém, os peptídeos produzidos em decorrência da proteólise podem ser solúveis. Portanto, o aumento na solubilidade da fração nitrogenada dos queijos em um dos vários solventes, é um princípio clássico para o monitoramento da proteólise em queijos. Geralmente esses extratos são a primeira etapa no isolamento e identificação dos peptídeos individuais e aminoácidos livres.

Usando-se diferentes precipitantes é possível separar os componentes nitrogenados com base na solubilidade (CHRISTENSEN et al., 1991). A concentração desses compostos nas frações solúveis é determinada pelo método de Kjeldahl. Vários solventes e precipitantes de proteínas têm sido usados para a extração e/ou fracionamento dos compostos nitrogenados em queijos; alguns deles estão resumidos na Tabela 2.

A maneira mais fácil de fracionar os compostos nitrogenados em queijos é por extração com água. Este procedimento tem sido amplamente utilizado por vários pesquisadores (ASTON & CREAMER, 1986; CLIFFE et al., 1993; KUCHROO & FOX, 1982a; McSWEENEY et al., 1993a; O'SULLIVAN & FOX, 1990, 1991; SINGH et al., 1994).

TABELA 2: Composição das frações nitrogenadas obtidas por diferentes técnicas de extração/precipitação (CHRISTENSEN et al., 1991).

Solvente usado para extração/fracionamento	Compostos nitrogenados na fração solúvel
• Água • Ácido (até pH 4,6) • Soluções salinas (Cloreto de cálcio e Cloreto de sódio)	Proteínas, peptídeos e aminoácidos
• Clorofórmio-metanol • Metanol-Cloreto de metileno	Peptídeos hidrofóbicos e aminoácidos
• Ácido tricloroacético (TCA) • Etanol • Ácido sulfosalicílico (SSA)	Peptídeos e aminoácidos
• Ácido fosfotúngstico (PTA) • Ácido pícrico	Peptídeos muito pequenos e aminoácidos

Diferentes técnicas podem ser empregadas na preparação do extrato solúvel em água. KUCHROO & FOX (1982a) compararam a influência de vários parâmetros como equipamentos, temperatura e tempo de homogeneização, na eficiência de preparação desses extratos em queijo Cheddar. Com base nos resultados obtidos, os autores sugeriram o seguinte procedimento: homogeneização de uma mistura queijo-água na proporção de 1:2, a 20°C, utilizando-se um Stomacher; a seguir, a mistura deve ser mantida a 40°C durante 1 hora e submetida à centrifugação. Maiores rendimentos podem ser obtidos repetindo-se o procedimento de extração no resíduo. Esse e outros procedimentos semelhantes têm sido usados em diversos trabalhos (FARKYE et al.,1990; FARKYE & FOX, 1991, 1992; FOLKERTSMA & FOX, 1992; GUINEE et al., 1991; KUCHROO & FOX, 1982b, 1983a,b; KUCHROO et al., 1983; LAW et al., 1992; O'SULLIVAN & FOX, 1990).

A fração solúvel em água é muito heterogênea, contendo peptídeos de pequeno e médio peso molecular, aminoácidos livres e seus produtos de degradação, ácidos orgânicos e seus sais. No entanto, o fracionamento com água é um procedimento eficiente para a separação, em queijos, de peptídeos maiores e proteínas dos peptídeos menores (O'SULLIVAN & FOX, 1990).

McSWEENEY et al. (1994) isolaram e identificaram os peptídeos insolúveis em água, e observaram que todos os principais peptídeos nesta fração eram produzidos a partir da αs_1-caseína pela quimosina ou plasmina, ou a partir da β-caseína pela plasmina. Sendo assim, a formação dos principais peptídeos solúveis em água deve ter origem pela ação destas enzimas, embora possam ser hidrolisados, especialmente por proteinases e endopeptidases do fermento e de bactérias resultantes de contaminação eventual.

O pH aproximado do extrato aquoso de queijos maturados internamente por bactérias, como Cheddar, suíços e holandeses é de 5,2, e há pouca diferença entre os níveis de nitrogênio solúvel em água ou em pH 4,6 nesses queijos (KUCHROO

& FOX, 1982a). Contudo, no caso de queijos em que há um aumento significativo do pH durante a maturação, como o Camembert, Brie e queijos azuis, o nitrogênio solúvel em água é muito maior do que aquele solúvel em pH 4,6.

DAHLBERG & KOSIKOWSKI (1947) fracionaram queijo Cheddar com tampão acetato pH 4,6, contendo 0,08M de cloreto de cálcio. Existem alguns trabalhos que sugerem a homogeneização do queijo em solução de citrato de sódio pH 9,0, com o posterior ajuste do pH da dispersão a 4,4 - 4,6 com ácido clorídrico (ADDEO et al., 1992; FURTADO & PARTRIDGE, 1988; LAU et al., 1991; VAKALERIS & PRICE, 1959; VAKALERIS et al., 1960). Este método dá valores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 um pouco maiores do que aqueles obtidos pela extração com tampão pH 4,6, provavelmente devido à precipitação de alguns peptídeos por ação do cloreto de cálcio. Esta diferença também pode ser atribuída à melhor dispersão do queijo em pH 7,0 - 8,0 (CHRISTENSEN et al., 1991).

KUCHROO & FOX (1982a) analisaram queijo Cheddar por ambos os métodos, e observaram que os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 foram de 23% com o procedimento de VAKALERIS & PRICE (1959) e 10% com o método descrito por DAHLBERG & KOSIKOWSKI (1947). Os mesmos autores também observaram que a extração inicial com solução de citrato de sódio e ajuste do pH para 4,6 dava valores menores para nitrogênio solúvel do que a extração com água e, embora seja mais trabalhosa, pode ser facilmente padronizada (FOX, 1989).

A fração solúvel em pH 4,6 é heterogênea, e a maioria dos compostos nitrogenados são produzidos pela ação do coalho (DESMAZEAUD & GRIPON, 1977; O'KEEFFE et al., 1976, 1978). Esta fração contém proteínas do soro, proteoses-peptonas (formadas pela ação da plasmina), peptídeos de baixo peso molecular derivados da hidrólise da caseína e aminoácidos livres. A fração insolúvel em pH 4,6 contém caseínas e peptídeos de alto peso molecular (CHRISTENSEN et al., 1991; O'KEEFFE et al., 1978).

O fracionamento com cloreto de cálcio tem sido descrito em vários trabalhos (DAHLBERG & KOSIKOWSKI, 1947; HAASNOOT et al., 1989; NOOMEN, 1977; VENEMA et al., 1987; VISSER, 1977b). NOOMEN (1977) obteve um bom fracionamento pela homogeneização do queijo a 30°C, usando 0,037M de cloreto de cálcio. KUCHROO & FOX (1982a) observaram que apenas 42% da fração solúvel em água era solúvel em cloreto de cálcio 0,1M, o que corresponde a 14% do nitrogênio total. Concentrações mais altas de cloreto de cálcio tiveram pouca ou nenhuma influência nos níveis de nitrogênio solúvel (NOOMEN, 1977).

A extração com cloreto de sódio a 5% solubiliza quase que completamente as proteínas de queijos. REVILLE & FOX (1978) encontraram que, em queijo Cheddar com 12 meses de maturação, as proteínas foram quase totalmente solubilizadas com cloreto de sódio a 5% (cerca de 93% do nitrogênio total), e concluíram que este método não separa as proteínas e os peptídeos em diferentes frações; uma análise desta fração juntamente com uma amostra de queijo não fracionada, indica que ambas contém caseínas e seus produtos hidrolíticos, e não diferem muito entre si.

O fracionamento com solventes orgânicos, entre eles metanol, clorofórmio e cloreto de metileno, é usado no isolamento de peptídeos hidrofóbicos, que correspondem aos peptídeos amargos e adstringentes em queijos (CHAMPION & STANLEY, 1982; HARWALKAR & ELLIOTT, 1971; McGUGAN et al., 1979; VISSER, 1983).

Os métodos de fracionamento com água, em pH 4,6 e com cloreto de cálcio descritos anteriormente, produzem extratos muito heterogêneos, contendo os mesmos tipos de produtos.

O ácido tricloroacético (TCA) é amplamente utilizado no fracionamento da porção nitrogenada em queijos, principalmente a partir dos extratos solúveis em água e em pH 4,6 (KUCHROO & FOX, 1982a; O'KEEFFE et al., 1976; REITER et al., 1969;

REVILLE & FOX, 1978). A concentração usada pode variar de 2, 2,5 ou 3% a 12% (ADDEO et al., 1992; CLIFFE & LAW, 1991; FOLKERTSMA & FOX, 1992; HAASNOOT et al., 1989; KUCHROO & FOX, 1982a,b; O'KEEFFE et al., 1978; VENEMA et al., 1987). As menores concentrações de TCA precipitam principalmente peptídeos maiores, deixando na fração solúvel aqueles de tamanho médio e pequeno e os aminoácidos (REVILLE & FOX, 1978). A fração solúvel em TCA 12% contém peptídeos pequenos (2 a 20 resíduos) e aminoácidos, enquanto os peptídeos grandes e médios são precipitados (ADDEO et al., 1992, 1994; KUCHROO & FOX, 1982b; REVILLE & FOX, 1978; YVON et al., 1989).

YVON et al. (1989) estudando a solubilidade de peptídeos obtidos a partir de αs_1-, β- e κ-caseína em diferentes concentrações de TCA, concluíram que este reagente, pela interação com peptídeos, induz a um aumento na hidrofobicidade de peptídeos, podendo levar a uma agregação, através de interações hidrofóbicas. Estes autores observaram ainda, a solubilidade de peptídeos com menos de 7 resíduos de aminoácidos na fração solúvel em TCA 12%, independente de outros parâmetros que influenciam a solubilidade em TCA, como a hidrofobicidade. Estas observações indicam a importância da extração com TCA, demonstrando que esta técnica pode ser usada para subfracionar as porções solúveis em água e em pH 4,6 (CHRISTENSEN et al., 1991).

A fração solúvel em TCA é usada como um indicador da maturação de queijos. VENEMA et al. (1987) trabalhando com queijo Gouda, observaram que a relação N-solúvel em TCA 12% / N-total se correlacionava melhor com o grau de maturação que a relação N-solúvel em água / N-total.

O coalho é responsável pela produção de parte da fração solúvel em TCA 12%, mas os níveis de nitrogênio nesta fração são mais altos em queijos acidificados com fermentos do que naqueles acidificados quimicamente (O'KEEFFE et al., 1976; REITER et al., 1969), indicando que as proteinases e

peptidases do fermento são responsáveis pela formação de parte do nitrogênio solúvel em TCA 12%.

Uma das principais desvantagens do TCA é a necessidade de sua remoção antes da análise das frações por eletroforese ou cromatografia. A diálise ou exclusão molecular removem o TCA, mas há a perda de alguns peptídeos; a extração sucessiva com éter etílico é mais útil para a sua eliminação. Este problema pode ser superado pelo fracionamento com etanol, que é um procedimento muito útil para a precipitação de proteínas e peptídeos, sendo facilmente removido por evaporação (CHRISTENSEN et al., 1991).

Várias concentrações de etanol podem ser usadas, com resultados supostamente diferentes, mas a precipitação a 70% é a mais usada (KUCHROO & FOX, 1982a,b; 1983b; REVILLE & FOX, 1978). A fração solúvel em etanol contém peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos, enquanto a fração insolúvel possui peptídeos grandes e médios e proteínas. Níveis de extração aproximadamente semelhantes são obtidos com TCA 12% ou etanol 70%, mas existem diferenças nas frações insolúveis; o etanol 70% precipita mais peptídeos de baixo peso molecular que o TCA 12% (KUCHROO & FOX, 1982b).

Vários outros agentes precipitantes de proteínas, além do TCA e do etanol, são usados para o fracionamento das porções solúveis em água e em pH 4,6, como o ácido fosfotúngstico (PTA), ácido sulfosalicílico (SSA) e o ácido pícrico.

O fracionamento com PTA é considerado um método muito seletivo, onde somente os aminoácidos livres, com exceção de lisina e arginina, e peptídeos com pesos moleculares menores que 600 Da são solubilizados; a fração insolúvel em PTA 5% contém proteínas e peptídeos com pesos moleculares maiores que 600 Da (JARRET et al.,1982). O teor de nitrogênio solúvel em PTA aumenta com a idade do queijo e é produzido principalmente pela ação de peptidases microbianas.

ASTON et al. (1983) demonstraram, com extratos de queijo Cheddar, que as quantidades de peptídeos e aminoácidos solúveis em PTA apresentavam correlações significativas com o desenvolvimento do "flavour". FERNANDEZ del POZO et al. (1988) verificaram que os níveis de nitrogênio solúvel em PTA 5% e em TCA 12% em queijos La Serena mostravam uma correlação significativa para a αs_1-caseína residual durante a maturação; no entanto, esta correlação não foi observada para a β-caseína residual.

O ácido sulfosalicílico (SSA) precipita proteínas e peptídeos (LAW, 1987; REITER et al., 1969), sendo usado na separação de amostras para análise de aminoácidos, a partir de extratos aquosos (RAMOS et al., 1987). Por outro lado, KUCHROO & FOX (1982a) verificaram que 90% do nitrogênio solúvel em água permanecia solúvel após precipitação desta fração com SSA a 2,5%. Resultados semelhantes foram obtidos por YVON et al. (1989), que observaram que a solubilidade de peptídeos em SSA 4,5% era muito parecida com aquela obtida com TCA 2%.

Entre os agentes precipitantes de proteínas, o ácido pícrico é considerado o mais seletivo, precipitando todos os compostos nitrogenados, com exceção dos aminoácidos e alguns peptídeos menores. Contudo, este reagente interfere na determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl ou por métodos espectrofotométricos (FOX, 1989; REVILLE & FOX, 1978).

Outros reagentes têm sido utilizados no fracionamento da porção nitrogenada em queijos, porém com menor freqüência. Entre eles podem ser citadas as extrações com hidróxido de bário/sulfato de zinco, cloreto de bário, etileno diamina tetracetato de sódio (EDTA).

2.6.2. Métodos para a medida direta da proteólise em queijos

Várias tentativas têm sido feitas no sentido de se substituir os métodos utilizados para a avaliação do grau de proteólise, como as determinações dos teores de nitrogênio nas diversas frações do queijo, geralmente trabalhosos e demorados. Estas técnicas incluem a estimativa dos teores de tirosina e triptofano, ligação com corantes específicos, liberação de nitrogênio amoniacal e determinação de grupamentos amínicos livres por métodos como titulação com formol, reação com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), ninidrina, fluorescamina ou o-ftalaldeído (OPT) (Tabela 3). Existe uma demanda crescente para estes métodos rápidos, para a avaliação do grau de proteólise em queijos (ARDO & MEISEL, 1991).

A medida dos teores de tirosina e triptofano "solúveis" em frações de queijos é um método rápido e adequado para a avaliação da proteólise. Estes dois aminoácidos possuem absorbância máxima ao redor de 280nm. VAKALERIS & PRICE (1959) desenvolveram um método para a avaliação da proteólise, pela medida da absorbância na região do ultravioleta (270 e 290nm), em extratos de queijos preparados com citrato de sódio-ácido clorídrico (pH 4,6). Os teores desses aminoácidos também podem ser determinados pelo método de HULL, utilizando-se o reagente fenólico de Folin (HULL, 1947), que reage com aminoácidos aromáticos.

Corantes aniônicos como Negro de Amido, Orange G e Orange ácido 12 podem ser usados para a estimativa da proteólise. Esses corantes, em pH ao redor de 2,0, reagem com resíduos de lisina e arginina das proteínas e peptídeos em frações de queijos, levando à sua precipitação; o excesso de corante que permanece em solução é determinado espectrofotometricamente, e a quantidade de corante ligado é proporcional à concentração de proteínas. Entretanto, proteínas de baixo peso molecular e peptídeos reagem muito lentamente e não precipitam, podendo permanecer em solução , tornando-a turva. A capacidade de

TABELA 3: Alguns métodos para a estimativa rápida da proteólise em queijos (ARDO & MEISEL, 1991).

Método	Compostos determinados
• Kjeldahl	Nitrogênio
• Absorbância a 280nm • Método de HULL (Reagente fenólico de Folin)	Tirosina e triptofano
• Negro de Amido • Orange G • Orange ácido 12	Incerto Proteínas e peptídeos são precipitados
• Titulação com formol • Titulação • TNBS (absorbância) • Ninidrina (absorbância) • OPA (absorbância) • Fluorescamina (fluorimetria)	Grupamentos amínicos livres

TNBS: Ácido trinitrobenzeno sulfônico
OPA: orto-ftalaldeído

ligação das proteínas dos queijos com o corante diminui durante a maturação e poderia ser usada como um índice de proteólise em queijos.

O método de BRADFORD (1976) para a determinação de proteínas, que se baseia na mudança de cor do Coomassie Blue G-250, pela interação com proteínas, pode ser útil para a quantificação da proteólise em queijos.

O aumento na quantidade de grupamentos amínicos livres em queijos é um resultado direto da proteólise. A titulação desses grupamentos com hidróxido de sódio, na presença de excesso de formaldeído, pode ser usada para a medida da

extensão e do grau de proteólise. Este procedimento foi usado na avaliação da proteólise em queijos por VAKALERIS et al. (1960), mas atualmente é considerado obsoleto, devido às dificuldades causadas pelas variações na capacidade tamponante dos queijos (ARDO & MEISEL, 1991). Esta capacidade tamponante aumenta durante a maturação, devido à formação de amônia, grupamentos amínicos, imínicos e carboxílicos. Este princípio também foi usado por OLLIKAINEN (1990) para a avaliação da proteólise em queijos suiços.

O ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) reage, estequiometricamente com aminas primárias em pH alcalino, produzindo um cromóforo que possui absorbância máxima a 340 e 420nm, e que permanece ligado aos aminoácidos, peptídeos e proteínas. O TNBS reage lentamente com grupamentos hidroxílicos, uma reação que é catalisada pela luz. Uma vez que o nitrogênio amoniacal produz apenas 20% dos grupamentos amínicos quando reage em concentrações equimolares com TNBS (CLEGG et al., 1982), este reagente pode subestimar a proteólise em queijos onde ocorre uma desaminação significativa.

CLEGG et al. (1982) observaram que o TNBS não é tão sensível quanto a ninidrina na avaliação da proteólise em queijos, mas é um procedimento analítico simples; estes autores propuseram um fator de correção para o nitrogênio amoniacal. Segundo ARDO & MEISEL (1991), a desvantagem deste método é que o TNBS em pó é explosivo e suas soluções não podem ser estocadas por muito tempo, porque o branco adquire leituras muito altas; este problema pode ser superado com preparações recentes das soluções.

SAMPLES et al. (1984) usaram o TNBS na análise do nitrogênio solúvel em TCA e verificaram que este procedimento era mais adequado que o método de HULL (1947) para a detecção da proteólise em queijos. JARRET et al. (1982) utilizaram o TNBS para quantificar os aminoácidos livres em frações de queijos solúveis em PTA 5%. O TNBS mostrou-se reprodutível no monitoramento da proteólise em queijos

(KUCHROO et al., 1983); embora o queijo não fracionado possa ser analisado, ele é mais sensível se aplicado às frações solúveis em pH 4,6 e em TCA 12%, devido à coloração de fundo causada pela reação do TNBS com grupamentos ε-amínicos. MADKOR et al. (1984) encontraram uma forte correlação entre o nitrogênio solúvel em água e a absorbância a 420nm do complexo de TNBS, para um extrato aquoso de queijo Stilton.

HABEEB (1966) e ADLER-NISSEN (1979) mediram a absorbância do complexo TNBS-grupamento amínico a 340nm; no procedimento de FIELDS (1971) a absorbância do complexo sulfito-TNBS-grupamento amínico é medida a 420nm, evitando-se assim, a absorbância máxima referente ao TNBS a 335-340nm. ADLER-NISSEN (1979) desenvolveram um procedimento para avaliação do grau de hidrólise de proteínas alimentares usando TNBS. Algumas das modificações básicas deste método foram a dispersão das amostras em dodecil sulfato de sódio (SDS), melhorando a solubilidade das proteínas; o uso de tampão com pH menos alcalino, diminuindo assim, a coloração do branco; um tempo de reação de 1 hora para melhorar a sensibilidade de reação e a escolha do comprimento de onda de 340nm, devido à maior sensibilidade e reprodutibilidade. Observou-se uma relação linear entre a concentração de α-amino grupos e a absorbância a 340nm, mas a relação variou entre as proteínas, devido às variações na concentração de ε-amino grupos.

BARLOW et al. (1986) consideraram que a aplicação do método do TNBS descrito por FIELDS (1971) num extrato aquoso, preparado de acordo com KUCHROO & FOX (1982a), seria um método de rotina simples para a quantificação do nitrogênio solúvel em queijos. POLYCHRONIADOU (1988) analisou o queijo sem fracionamento, e encontrou uma boa correlação entre os resultados do método do TNBS e a relação nitrogênio solúvel em água/nitrogênio total, quando determinada pelo método de Kjeldahl. HUMBERT et al. (1990) utilizaram um novo solvente (uma mistura patenteada de ácidos orgânicos e detergentes) para a clarificação de amostras após a reação com TNBS.

O uso da ninidrina na avaliação da proteólise em queijos se baseia na medida espectrofotométrica do cromóforo formado, quando ela reage com grupamentos amínicos livres. Este cromóforo, chamado púrpura de Ruhemann, não permanece ligado às proteínas, peptídeos e aminoácidos e, portanto, não é precipitado juntamente com estes compostos, durante a etapa de clarificação das amostras (ARDO & MEISEL, 1991). Isto é considerado uma das maiores vantagens desta técnica (PEARCE et al., 1988). A absorbância máxima do cromóforo é desviada para comprimentos de onda menores (em torno de 507nm) com a redução da quantidade de água da mistura reativa (DOI et al., 1981).

A ninidrina reage com amônia e dá aproximadamente a mesma intensidade de coloração que aquela obtida com aminoácidos; neste caso, os valores obtidos são maiores do que os encontrados na reação com TNBS, sendo a discrepância atribuída à amônia (CLEGG et al., 1982). O método da ninidrina é mais sensível que o do TNBS; no entanto, CLEGG et al. (1982) optaram pela reação com TNBS por ser um procedimento analítico mais simples. A ninidrina é um reagente amplamente usado e tem sido empregada por vários autores para a quantificação de grupamentos amínicos, particularmente na análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica, seguida de derivatização pós-coluna.

DOI et al. (1981) testaram vários ensaios com ninidrina para a avaliação da atividade de peptidase; dois deles eram modificações dos métodos de MOORE & STEIN (1947, 1954a,b), e dois se baseavam na reação com ninidrina-cádmio de TSARICHENKO (citado por FOLKERTSMA & FOX, 1992). O reagente de ninidrina-cádmio mostrou-se mais seletivo para os grupamentos amínicos de aminoácidos livres que os dos peptídeos ou proteínas, e foi mais sensível que várias preparações contendo ninidrina, incluindo ninidrina-estanho.

A medida da lisina reativa com ninidrina em proteínas alimentares foi otimizada por FRIEDMAN et al. (1984). PEARCE et al. (1988) desenvolveram um

ensaio com ninidrina-lítio para proteólise em queijos, tendo como base o método de FRIEDMAN et al. (1984); os aminoácidos livres totais determinados por este método apresentaram boa correlação com a análise convencional de aminoácidos. Estes autores sugeriram que os reagentes de TNBS e de ninidrina-lítio apresentavam sensibilidades semelhantes como indicadores da proteólise em queijos.

FOLKERTSMA & FOX (1992) aplicaram o ensaio com ninidrina-cádmio de DOI et al. (1981) na avaliação da proteólise em queijos. Este reagente mostrou-se cinco vezes mais sensível que o TNBS na medida de nitrogênio amínico, podendo ser usado nas frações solúveis em citrato (que contém a maior parte do nitrogênio total), em água e em PTA (ácido fosfotúngstico), mas não com TCA (ácido tricloroacético), uma vez que este reagente parece interferir no desenvolvimento da coloração.

O orto-ftalaldeído (OPA) reage com β-mercaptoetanol e aminas primárias, formando um complexo fluorescente, que também possui uma forte absorbância a 340nm. CHURCH et al. (1983) usaram o OPA para quantificar a proteólise no sistema protéico do leite e observaram que este método era mais sensível que a medida da absorbância a 280nm e mais conveniente que os procedimentos com ninidrina, TNBS ou fluorescamina. LEMIEUX et al. (1990) sugeriram que o OPA era um método mais rápido e simples para a estimativa dos aminoácidos livres em queijos e, se o tempo de reação fosse rigorosamente controlado, haveria menores variações do que no método do TNBS; no entanto, além dos aminoácidos livres, este reagente também é capaz de detectar peptídeos com pesos moleculares menores que 6000 Da.

A fluorescamina é usada para quantificar aminoácidos e peptídeos na faixa de picomoles. Ela reage com grupamentos amínicos primários, produzindo um fluoróforo que é medido a 390nm (excitação) e a 475nm (emissão); a reação ocorre à temperatura ambiente com água ou aminas primárias, sendo esta última mais rápida.

PEARCE (1979) usou a fluorescamina para medir a liberação do glicomacropeptídeo formado a partir da κ-caseína por ação do coalho, em extratos solúveis em TCA 10%. Alíquotas do filtrado foram misturadas com borato de sódio 4% e uma solução de fluorescamina em acetona foi adicionada rapidamente. O produto de reação foi protegido da luz para prevenir a decomposição antes da leitura da intensidade de fluorescência a 480nm (comprimento de onda de excitação: 395nm). A fluorescamina também foi usada por CREAMER et al. (1985) para a quantificação em queijos, das proteínas, peptídeos e aminoácidos solúveis em ácidos; os resultados pareceram mais consintentes do que os obtidos com TNBS.

O ácido L-glutâmico é um dos principais aminoácidos presente nas caseínas, e está associado ao "flavour" de queijos (ASTON & DULLEY, 1982). As concentrações relativamente altas e o papel importante deste aminoácido em relação ao "flavour", sugerem que ele possa ser um parâmetro importante na avaliação da proteólise e da maturação de queijos.

Um ensaio enzímico para ácido glutâmico utilizando glutamato desidrogenase imobilizada foi desenvolvido por PUCHADES et al. (1989); a atividade da enzima foi determinada pela redução do NAD^+, que foi monitorado fluorimetricamente. A aplicação de um ensaio enzímico para a medida direta do teor de ácido glutâmico livre, com leitura na região do ultravioleta em queijo Cheddar, é relativamente nova. FRITSCH et al. (1992) utilizaram um teste enzímico padronizado para a determinação de ácido glutâmico em alimentos, desenvolvido pela BOEHRINGER MANNHEIM. Os autores observaram uma forte correlação entre esta determinação e as avaliações de nitrogênio amínico por reação com OPA e nitrogênio solúvel pelo método de Kjedahl, e sugeriram a utilização dos teores de ácido glutâmico livre e do nitrogênio amínico medido com OPA, por serem mais rápidos e mais adequados para uso rotineiro, necessitando apenas de equipamentos simples, como um fotômetro.

McSWEENEY et al. (1993b) mediram o ácido glutâmico em extratos aquosos de queijo Cheddar usando um conjunto para reação contendo glutamato desidrogenase. De modo diferente do procedimento de PUCHADES et al. (1989), em que o NADH foi medido diretamente, este procedimento utilizou a diaforase para catalisar a reação do cloreto de iodonitro tetrazólio com NADH, cujo produto foi analisado espectrofotometricamente a 492nm. Os teores de ácido glutâmico livre em queijos aumentaram com a idade e variaram entre os queijos com diferentes populações de bactérias provenientes de contaminação eventual.

Dentre os métodos descritos, aqueles que utilizam a ninidrina e o TNBS podem ser empregados no queijo não fracionado, enquanto os outros necessitam pelo menos de uma etapa inicial de fracionamento. Uma vantagem disso é a eliminação dos efeitos indiretos da diferença de solubilidade nas soluções usadas no fracionamento. Por outro lado, o uso do queijo não fracionado pode gerar problemas quanto à representatividade da amostragem, uma vez que são tomadas amostras muito pequenas para os ensaios. Um outro problema é a diminuição na sensibilidade devido à turbidez das amostras. Este problema pode ser superado com o método da ninidrina, por precipitação do material turvo após incubação, uma vez que o cromóforo não permanece ligado às cadeias peptídicas como ocorre com o TNBS.

Estes métodos, que se baseiam na análise do número de grupamentos amínicos livres e não nos teores de nitrogênio total, fornecem mais informações sobre o grau de proteólise em queijos, além de serem mais simples e mais rápidos que o método de Kjeldahl.

2.6.3. Técnicas para separação dos peptídeos individuais

2.6.3.1. Análise eletroforética de queijos

A eletroforese tem sido amplamente usada no estudo da proteólise primária em queijos. Uma vez que somente as proteínas e peptídeos maiores podem ser visualizados pelos procedimentos de coloração, a técnica é limitada ao monitoramento da hidrólise das caseínas e à formação e subseqüente hidrólise de seus principais produtos proteolíticos. Entretanto, é uma ferramenta analítica muito importante para o acompanhamento da hidrólise de ligações individuais nas moléculas de caseínas, durante as etapas iniciais da maturação de queijos, e para comparação do perfil de hidrólise numa série de queijos. Isto pode ser útil quando se utiliza diferentes coagulantes ou leites de diferentes espécies na fabricação de queijos (EDWARDS & KOSIKOWSKI, 1969; MARCOS et al., 1979).

As primeiras aplicações desta técnica no estudo da maturação de queijos foram feitas por LINDQVIST et al. (1953) usando eletroforese em papel, e por LINDQVIST & STORGARDS (1959) com a eletroforese de frente móvel. Para os padrões atuais, estes métodos não são eficientes, apresentam baixa resolução e consomem muito tempo. A eletroforese em papel, utilizando alta voltagem, também tem valor e aplicação limitados (FOX,1989; KUCHROO & FOX, 1982b).

Embora a eletroforese em gel de amido tenha sido usada por alguns pesquisadores, a técnica em gel de poliacrilamida (PAGE) possui uma aplicação mais ampla, tendo sido utilizada pela primeira vez em queijos por LEDFORD et al. (1966). As vantagens da poliacrilamida sobre o amido são a maior coerência na porosidade dos géis entre diferentes lotes, a transparência natural dos géis que os torna mais adequados para análise densitométrica, o menor fluxo endo-osmótico dos tampões e a maior resistência mecânica dos géis. Contudo, os géis de poliacrilamida têm a desvantagem da forma monomérica da acrilamida ser um

agente neurotóxico, facilmente absorvido através da pele. A literatura sobre as aplicações da eletroforese em queijos foi bem revisada nos trabalhos de CREAMER (1991), FOX (1989), SHALABI & FOX (1987) e STRANGE et al. (1992).

Quase todas as técnicas eletroforéticas monodimensionais que têm sido usadas recentemente para análise de queijos, usam um sistema tampão descontínuo, que tem como base Tris-cloreto/glicina e as formulações de géis descritas primeiramente por DAVIS (1964) e por ORNSTEIN (1964). O negro de amido (Amido Black 10) e o Coomassie Brilliant Blue (CBB) são os corantes mais usados. Géis contendo uréia e com pH ácido têm sido usados em alguns estudos (CREAMER, 1991), mas a maioria dos pesquisadores utiliza o sistema alcalino contendo uréia. SHALABI & FOX (1987) compararam vários procedimentos eletroforéticos para análise de queijos e recomendaram o sistema descrito por ANDREWS (1983), que utiliza um gel para concentração das amostras ("stacking gel"), em pH alcalino (pH 8,9), contendo de 4,5 a 6,0M de uréia. A coloração direta descrita por BLAKESLEY & BOEZI (1977) com Coomassie Brilliant Blue G-250 deu resultados muito bons.

A eletroforese em géis de poliacrilamida com pH alcalino e contendo uréia, seguida de coloração com Coomassie Brilliant Blue tem sido amplamente usada para monitorar a proteólise em queijos (CREAMER, 1991; FOX, 1989; SHALABI & FOX, 1987; STRANGE et al., 1992).

LEDFORD et al. (1966) e MARCOS et al. (1979) mostraram diferenças entre os perfis eletroforéticos de 7 e 34 variedades de queijos, usando o sistema uréia-PAGE; em ambos os estudos foram utilizadas apenas uma amostra de cada variedade e com idade desconhecida.

A análise por uréia-PAGE revelou-se insuficiente para mostrar diferenças substanciais entre queijos Cheddar produzidos com leite cru, pasteurizado ou microfiltrado, embora o "flavour" do queijo feito com leite cru tenha sido mais intenso que o dos outros (McSWEENEY et al., 1993a).

SHALABI & FOX (1987) concluíram que a técnica de SDS-PAGE era inferior à de uréia-PAGE para análise de queijos, que apresenta melhor resolução para peptídeos pequenos produzidos a partir das caseínas, não recomendando portanto, o seu uso. A mobilidade eletroforética no sistema SDS-PAGE é inversamente proporcional ao logarítmo do peso molecular do peptídeo. Uma vez que quase todas as caseínas possuem pesos moleculares semelhantes (19 a 25 kDa), elas não apresentam resolução tão boa em SDS-PAGE como em uréia-PAGE em condições alcalinas. Entretanto, STRANGE et al. (1992) consideraram que o sistema SDS-PAGE fornece informações muito úteis sobre os pesos moleculares dos produtos de degradação das caseínas, especialmente quando complementadas pela análise densitométrica. Esta técnica tem sido usada em vários trabalhos (BASCH et al., 1989; BHOWMIK et al., 1990; TUNICK et al., 1993).

SHALABI & FOX (1987) consideraram também, que o gel contendo SDS com 20% de acrilamida era mais adequado do que aquele descrito no método de LAEMMLI (1970), que utiliza 12% de acrilamida. No entanto, CREAMER (1991) relatou que o gel com 20% de acrilamida separa as caseínas de uma forma incompleta (todas as caseínas migram como duas bandas), mas é eficiente para a separação de peptídeos com pesos moleculares na faixa de 10 kDa.

A eletrofocalização e a eletroforese bidimensional têm sido usadas por alguns pesquisadores, como TRIEU-CUOT & GRIPON (1982), que utilizaram SDS-PAGE numa dimensão e eletrofocalização na outra, para estudar a proteólise em queijo Camembert. Embora a eletroforese bidimensional possa ser útil como uma ferramenta de pesquisa, ela não se aplica às análises de rotina porque

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

consome muito tempo, e existem dificuldades com relação à reprodutibilidade e na obtenção de dados quantitativos (CREAMER, 1991).

O registro dos resultados é uma parte importante da análise eletroforética. Após coloração, os géis são geralmente fotografados, embora a densitometria ou o corte e eluição das bandas coradas, seguida por quantificação espectrofotométrica também sejam usados (CREAMER, 1991). A dificuldade na obtenção de dados quantitativos é uma limitação da eletroforese. CREAMER (1991) recomenda a inclusão de várias amostras controle em cada gel, e que as comparações sejam feitas apenas entre amostras no mesmo gel. O autor salienta ainda, que as dimensões das bandas são críticas para a análise densitométrica, e que a visualização das bandas coradas é uma função da proteína, como também do protocolo de coloração e de descoloração. Entretanto, de JONG (1975) considerou que a eletroforese com uréia e em meio alcalino (pH 8,9), corada com Negro de amido (Amido Black 10) e avaliada por densitometria, deu bons resultados quantitativos.

2.6.3.2. Métodos cromatográficos para avaliação da proteólise em queijos

Praticamente todas as técnicas cromatográficas conhecidas têm sido empregadas na separação de peptídeos, como aquelas baseadas no peso molecular (cromatografia de permeação em gel), na carga (cromatografia de troca iônica), na hidrofobicidade (cromatografia de fase reversa) e na interação hidrofóbica (cromatografia de interação hidrofóbica) e também uma combinação de todos estes métodos.

A cromatografia em papel foi usada por muitos autores na quantificação de aminoácidos livres em queijos e também para a separação e caracterização de peptídeos na fração solúvel em água em queijo Cheddar (FOX, 1989; KUCHROO & FOX, 1983a). Atualmente esta técnica quase não é usada devido à baixa resolução e ao tempo envolvido na sua execução.

A cromatografia em camada delgada em sílica gel, usando diferentes solventes, tem sido usada para a caracterização de peptídeos em frações de queijos obtidas por permeação em gel ou troca iônica (EDWARDS & KOSIKOWSKI, 1983; KUCHROO & FOX; 1982b; 1983a,b; VISSER et al., 1983). É um método simples e direto para a separação de peptídeos e, normalmente superior à cromatografia em papel; fornece uma noção grosseira da composição de peptídeos, mas nem sempre apresenta a resolução desejada.

VISSER et al. (1975) usaram cromatografia em coluna de sílicagel para estudar os peptídeos amargos formados a partir da caseína após tratamento com coalho, monitorando as frações eluídas por espectrofotometria na região do ultravioleta.

A cromatografia de permeação em gel tem sido amplamente usada no fracionamento de peptídeos e proteínas em queijos. Quando a coluna é calibrada com padrões de diferentes pesos moleculares, esta técnica permite a determinação dos pesos moleculares das proteínas e peptídeos submetidos à separação. A maioria dos pesquisadores prefere usar géis de Sephadex® (Pharmacia), com porosidades variadas, sendo que Sephadex G-10, que separa moléculas com peso molecular na faixa de 700 a 1.500 Da; G-25, de 1.000 a 5.000 Da; G-50, de 1.500 a 30.000 Da e G-75, de 3.000 a 80.000 Da são os suportes mais comumente usados (RANK et al., 1985). As frações eluídas são quantificadas na região do ultravioleta. Geralmente usa-se 280nm que é adequada para proteínas e peptídeos maiores; mas, para frações contendo peptídeos menores, é mais conveniente usar um comprimento de onda menor como 206 a 220nm, para medir a absorbância de grupamentos carbonílicos na ligação peptídica (ARDO & GRIPON, 1991). A medida de grupamentos amínicos por reação com ninidrina ou TNBS tem sido usada em paralelo às medidas de absorbância na faixa do ultravioleta. Uma das principais desvantagens desta técnica é o tempo, uma vez que se utiliza colunas abertas com baixa pressão, associado a uma resolução pobre devido à agregação das caseínas e/ou interação de peptídeos pequenos com a matriz da coluna. Este problema pode ser

superado com o desenvolvimento de novos géis e também com a utilização de colunas fechadas e alta pressão. Na Tabela 4 estão resumidas algumas aplicações da permeação em gel em estudos com proteínas e peptídeos de queijos.

Embora a cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose seja usada para fracionar as proteínas do leite, este meio tem tido um uso limitado no fracionamento dos peptídeos de queijos (FOX, 1989). CREAMER & RICHARDSON (1974) isolaram e identificaram a αs_1-CN f 24-199 (αs_1-I caseína), o principal produto de degradação da αs_1-caseína pela ação da quimosina, em queijo Cheddar, usando DEAE-Celulose e cromatografia de permeação em gel em Sepharose 6B como uma segunda etapa. O'SULLIVAN & FOX (1990), usando coluna de DEAE-Celulose, fracionaram as porções solúvel e insolúvel em TCA 2% obtidas por ultrafiltração, de um extrato aquoso de queijo Cheddar. BREEN et al. (1995) e McSWEENEY et al. (1994) também utilizaram esta resina e fracionaram os peptídeos presentes na fração insolúvel em água obtida a partir de queijo Cheddar.

MABBITT (1955) usou a cromatografia de troca iônica em colunas de DOWEX-50 para quantificar os aminoácidos em queijo Cheddar. ALI & MULDER (1961) usaram um método semelhante àquele descrito por MOORE & STEIN (1954a,b) para separar os aminoácidos em DOWEX-50. Eles observaram que o perfil de aminoácidos livres do queijo Edam não variava substancialmente entre amostras da mesma idade, que os aminoácidos contribuiam apenas com o sabor básico e que o "flavour" do Edam não poderia ser atribuído somente aos aminoácidos livres.

A cromatografia de troca iônica clássica é trabalhosa e tem sido substituída pelos analisadores automáticos de aminoácidos, que se baseiam na cromatografia de troca iônica, e muito tem facilitado a análise de aminoácidos livres em queijos. É uma análise relativamente simples, precisa, quantitativa e o preparo da amostra não é muito trabalhoso. Os procedimentos usados no preparo das amostras para

TABELA 4: Aplicação da cromatografia de permeação em gel na separação de peptídeos em queijos.

Queijo	Meio[1]	Fração estudada	Eluente	Detecção	Referência
Cheddar	G-25, G-50	Fração amarga	Água	UV, 280nm	HARWALKAR & ELLIOT (1971)
Cheddar	Sepharose 6B	Peptídeos de alto peso molecular	Guanidina 6M-HCL	UV, 280nm	CREAMER & RICHARDSON (1974)
Cheddar	G-50	N solúvel em água	Piridina-ácido acético	UV, 280nm	O'KEEFFE et al. (1976)
Cheddar	G-10, G-25, G-50, G-150	N solúvel em água, liofilizada	Água	UV, 280nm	KUCHROO & FOX (1983a)
Cheddar	G-10, G-25	N solúvel em água, frações dialisadas	Água	UV, 280nm	KUCHROO & FOX (1983b)
Cheddar	G-25	Fração amarga	NH_4OH 0,1N	UV, 254nm	EDWARDS & KOSIKOWSKI (1983)
Cheddar	G-25	Extrato aquoso, tratado com etanol	Água	UV, 280nm	CLIFFE et al. (1993)
Cheddar	G-25	Extrato aquoso, permeado da ultrafiltração	Água	UV, 280nm	SINGH et al. (1994)
Queijo "asséptico"	G-25	N solúvel em pH 4,6	Ácido acético 1M	UV, 280nm; ninidrina	GRIPON et al. (1977)
Provolone	G-10, G-25, G-50, G-150, Sepharose 6B	N solúvel em água, liofilizado	Água	UV, 280nm	SANTORO et al. (1987)
Cabrales	G-10	N solúvel em PTA	Água	UV, 280nm	GONZALEZ de LLANO et al. (1987)

1 - Géis de Sephadex® ou outro especificado

análise de aminoácidos incluem desproteinização do extrato obtido pela dispersão do queijo com citrato de sódio ou da fração solúvel em água com ácido sulfosalicílico (REITER et al., 1969), etanol (VISSER, 1977b), ácido pícrico (WEAVER et al., 1978) ou por dispersão do queijo diretamente em $Ba(OH)_2/ZnSO_4$ (HICKEY et al., 1983).

Nas Tabelas 5 e 6 estão reunidos alguns exemplos de trabalhos em que se utilizou a cromatografia de troca iônica clássica e a quantificação dos aminoácidos livres em queijos.

A utilização dos princípios de cromatografia de permeação em gel e de troca iônica, juntamente com a cromatografia de alta eficiência (HPLC), tem reduzido consideravelmente o trabalho envolvido nestas formas de cromatografia, embora estes métodos não sejam propriamente preparativos.

É crescente o uso da cromatografia de alta eficiência com colunas de fase reversa (RP-HPLC) para separar e caracterizar peptídeos em hidrolisados de caseínas (ASTON & CREAMER, 1986; BICAN & SPAHNI, 1991; CHAMPION & STANLEY, 1982; CHRISTENSEN et al., 1989; CLIFFE et al., 1989; CLIFFE & LAW, 1991; HAASNOOT et al., 1989; LAU et al., 1991; LAW et al., 1992; PHAM & NAKAI, 1984). Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária é apolar, enquanto a fase móvel é polar. A análise de peptídeos por RP-HLPC normalmente requer um gradiente de eluição, embora separações isocráticas também sejam realizadas (POLO et al., 1985).

A hidrólise da αs_1- e β-caseína durante a maturação de queijos foi estudada usando RP-HPLC na fração insolúvel em pH 4,6 por CHRISTENSEN et al. (1989). Na metodologia empregada houve a separação das frações αs_1-, αs_1-I e αs_2-caseína.

CHAMPION & STANLEY (1982) usaram RP-HPLC numa coluna C18 com gradiente de água/metanol, para a separação de peptídeos em amostras de queijo Cheddar coagulado com pepsina. Nesta separação, os autores obtiveram em torno de 71

TABELA 5: Aplicação da cromatografia de troca iônica na separação de peptídeos em queijos.

Queijo	Meio	Fração estudada	Eluente	Detecção	Referência
Cheddar	DEAE-celulose	Queijo disperso em citrato de sódio, desengordurado	Uréia 4,5M, pH 5,5, gradiente de NACL	UV, 280nm	CREAMER & RICHARDSON (1974)
Cheddar	DEAE-celulose	Frações solúveis e insolúveis em etanol 70%	Tampão fosfato 0,02N, pH 6,5, gradiente de NACL	UV, 280nm	KUCHROO & FOX (1983b)
Cheddar	DEAE-celulose	Frações solúveis em TCA 2%	Tampão fosfato 0,02M, pH 6,4, gradiente de NACL	UV, 280nm	O'SULLIVAN & FOX (1990)
Cheddar	DEAE-celulose	Fração insolúvel em água	Uréia 4,5M, TRIS 0,02M, pH 8,6, gradiente de NACL	UV, 280nm	McSWEENEY et al. (1993b)
Cheddar Gouda	DE 52	Queijo disperso em uréia 6M	Uréia 6M, pH 7,0, gradiente de NACL	UV, 280nm	CREAMER (1975)
Cheddar Gouda	DE 52	Frações da cromatografia de troca iônica	Uréia 6M, pH 8,5, gradiente de NACL	UV, 254nm	CREAMER (1975)
Provolone	Resina catiônica, autoanalisador	Frações da cromatografia de permeação em gel	Gradiente de piridina 0,2 a 2M, pH 2,8 a 6,5	Ninidrina	SANTORO et al. (1987)

compostos, alguns deles amargos. Os peptídeos menores foram eluídos na terça parte inicial do cromatograma, os maiores no final da separação, enquanto na porção média foram eluídos os picos contendo compostos amargos. Os autores observaram uma correlação entre o tempo de eluição e a hidrofobicidade média das frações; os peptídeos mais hidrofóbicos foram eluídos em maiores concentrações de metanol.

TABELA 6: Estudos envolvendo as técnicas cromatográficas para análise de aminoácidos livres em queijos.

Queijo	Método analítico	Referência
Cheddar	Cromatografia em papel	KOSIKOWSKY (1951)
Cheddar	Cromatografia de troca iônica	MABBITT (1955)
Cheddar	Analisador de aminoácidos	O'KEEFFE et al. (1976)
Cheddar	Analisador de aminoácidos	WEAVER et al. (1978)
Cheddar	Analisador de aminoácidos	HICKEY et al. (1983)
Cheddar	HPLC	MARSILI (1985)
Cheddar	HPLC	PUCHADES et al. (1989)
Cheddar	HPLC	LEMIEUX et al. (1989)
Cheddar, Edam	Analisador de aminoácidos	REITER et al. (1969)
Gouda	Analisador de aminoácidos	VISSER (1977b)
Gouda, Jarlsberg, Cheddar	Cromatografia gasosa (capilar)	LALEYE et al. (1987)
Cabrales	HPLC	RAMOS et al. (1987)
Emmental, Gorgonzola, Blue, Roquefort, Provolone Gouda, Limburger, Camembert, , etc.	Cromatografia em papel	KOSIKOWSKY & DAHLBERG (1954)
Mahon	Analisador de aminoácidos	POLO et al. (1985)

PHAM & NAKAI (1984) separaram a fração solúvel em água do queijo Cheddar com vários estágios de maturação em 13 picos, dos quais 6 aumentaram, 2 diminuíram e 4 permaneceram constantes com a idade. Um pico adicional apareceu no queijo com maior tempo de maturação. Usando RP-HPLC, KAMINOGAWA et al. (1986) purificaram e identificaram os principais peptídeos de baixo peso molecular no queijo Gouda. Os cromatogramas variaram de acordo com o tempo de maturação, com o aumento da altura dos picos de acordo com a idade.

CLIFFE & LAW (1991) usaram RP-HPLC e eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para monitorar a proteólise de queijo Cheddar com maturação normal e acelerada por adição de enzimas. A fração solúvel em água analisada por RP-HPLC mostrou diferenças mais significativas que a análise por eletroforese. Na Tabela 7 estão exemplificadas algumas aplicações da RP-HPLC no estudo de peptídeos em queijos.

A cromatografia líquida em colunas de fase reversa (RP-HPLC) é um método muito útil para o estudo da degradação de proteínas em queijos durante a maturação, devido ao alto poder de resolução, reprodutibilidade e também porque não consome muito tempo. Uma associação da técnica de RP-HPLC com a análise estatística dos dados pode ser muito útil na classificação de queijos de acordo com a idade, podendo servir como um índice de maturação. Esta técnica é excelente para a separação e identificação dos principais peptídeos que aparecem durante a maturação de vários tipos de queijos (ARDO & GRIPON, 1991).

A cromatografia líquida preparativa, com baixa pressão (FPLC®, Pharmacia) em colunas de troca iônica como Mono-S ou Mono-Q dá melhor resolução que a cromatografia clássica em DEAE-Celulose. A cromatografia de troca aniônica numa coluna Mono-Q, de um extrato contendo uréia, foi usada por HAASNOOT et al. (1989), para estudar a proteólise de queijo Gouda. Deste estudo concluiu-se

TABELA 7: Aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência, em coluna de fase reversa (RP-HPLC), na separação de peptídeos em queijos.

Queijo	Extrato	Coluna	Condições de eluição	Detecção	Referência
Cheddar	Extrato aquoso	Adsobosphere C8; Spherisorb S_5 C8; Vydac C18	Isocrática, tampão fosfato 0,1M, pH 6,0	UV, 220nm	PHAM & NAKAI (1984)
Cheddar, Chesire e Gouda	Extrato aquoso	Spheri-5 RP18	Gradiente: TFA: H_2O: CH_3CN	UV, 214nm UV, 280nm	ASTON & CREAMER (1986) CREAMER et al. (1988)
Edam, Gouda, Suiço, Cheddar, Parmesão	Extratos de acordo com McGUGAN et al. (1979)	Adsorbosphere C8	Gradiente ternário 0,1% TFA: CH_3CN: CH_3OH	UV, 220nm	SMITH & NAKAI (1990)
Gouda	Extrato solúvel em pH 4,6	Zorbax ODS	Gradiente: TFA: H_2O: CH_3CN	UV, 230nm	KAMINOGAWA et al. (1986)
Cheddar	Frações da permeação em gel	Waters RP18	Isocrática: tampão fosfato 0,01M, pH 4,3	UV, 200nm	KUCHROO & FOX (1983b)

que a relação das áreas dos picos de γ- e β-caseína poderia servir como um indicador da maturidade de queijo Gouda maturado por mais que 10 meses, enquanto a relação das áreas dos picos representados por αs_1-caseína e αs_1-CN f29-199 foi um índice adequado para queijos muito jovens (< 4 semanas). A utilização desta técnica torna-se útil em estudos para a quantificação do decréscimo de caseína e formação de produtos de alto peso molecular.

2.7. Considerações sobre o queijo Prato

Do ponto de vista industrial, a fabricação de queijos no Brasil é relativamente recente, remontando ao início deste século e, sobretudo, a partir da década de 20, com o estabelecimento de imigrantes dinamarqueses e holandeses na região sul de Minas Gerais (FURTADO, 1991).

O queijo tipo Prato foi introduzido no Brasil por imigrantes dinamarqueses, e acredita-se que tenha se originado a partir dos queijos Danbo dinamarquês e Gouda holandês. Sua tecnologia foi adaptada às condições locais, o que poderia explicar as diferenças de sabor e textura observadas no queijo Prato em relação àqueles que lhe deram origem.

Enquanto os queijos Danbo e Gouda apresentam-se com uma textura mais aberta, com olhaduras regulares e pequenas, o Prato pode ser encontrado tanto com olhaduras regulares e irregulares, como também totalmente fechado (FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994).

Dentre os queijos produzidos e comercializados no Brasil, o Prato ocupa lugar de destaque, com cerca de 75.100 toneladas produzidas em 1997, segundo informações fornecidas pela ABIQ (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO, 1998). Sob a denominação Prato estão as variedades

Lanche, Estepe, Cobocó e Esférico ou Bola, que possuem as mesmas características, diferindo somente quanto ao formato e ao peso (FURTADO, 1991; SCHIFTAN & KOMATSU, 1980). A variedade Lanche, é a que praticamente domina o mercado em quantidade produzida.

O queijo tipo Prato é fabricado a partir do leite pasteurizado, por coagulação enzímica, adicionado de uma pequena quantidade de corante, visando dar a tonalidade amarela característica (OLIVEIRA, 1986). É de massa semi-cozida, o que lhe confere uma característica elástica, prensado e maturado por um período mínimo de 20 dias.

Apresenta-se moldado na forma de um tijolo ou paralelepípedo, constituindo a variedade Lanche, ou na forma de um cilindro baixo, que é a variedade Cobocó, com pesos entre 0,5 e 3,0Kg (OLIVEIRA, 1986). O aumento de temperatura no tanque para a realização do pré-cozimento da massa pode ser efetuado pela retirada de uma parte do soro e adição de água a 75-80°C diretamente sobre a massa, ou através do aumento da temperatura do meio de aquecimento do tanque de coagulação.

É classificado como um queijo semi-gordo, semi-duro, de consistência macia e compacta e textura própria, ou seja, com presença de pequenas olhaduras redondas ou ovais, regularmente distribuídas, pouco numerosas e bem formadas.

O fermento láctico usado na fabricação do queijo Prato pode ser exclusivamente acidificante ou acidificante e aromatizante. Além do sabor característico, este queijo deve apresentar algumas olhaduras pequenas e regulares e, para a obtenção destas características, deve-se utilizar um fermento misto de bactérias lácticas acidificantes e aromatizantes. Normalmente, o fermento utilizado é constituído de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris,* organismos acidificantes e homofermentativos, acrescido das bactérias *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc*

mesenteroides subsp. cremoris que, pela fermentação do citrato do leite, produzem compostos aromáticos como o diacetil e o acetaldeído, além de pequena quantidade de CO_2, responsável pelas olhaduras típicas deste queijo (OLIVEIRA, 1986).

De acordo com HOSKEN & GAUDERETO (1973), a maioria dos queijos tipo Prato elaborados no Brasil não apresenta as características ideais de sabor, aroma, textura e olhaduras. Isto pode ser atribuído em parte, às deficiências dos fermentos lácticos utilizados.

Dos queijos nacionais, o Prato é o que apresenta melhor padronização tecnológica, sendo portanto, melhor caracterizado comercialmente (OLIVEIRA, 1986).

Segundo a definição legal (MERCOSUL, 1997), o queijo Prato deverá apresentar as seguintes características organolépticas e físico-químicas:

- **Consistência**: semi-dura, elástica;
- **Textura**: compacta, lisa, fechada, com alguns olhos pequenos arredondados e/ou olhaduras mecânnicas;
- **Cor**: amarelado ou amarelo-palha;
- **Sabor**: característico;
- **Odor**: característico;
- **Crosta**: não possui, ou com crosta fina, lisa, sem trincas;
- **Olhaduras**: algumas olhaduras pequenas, bem distribuídas, ou sem olhaduras;

A composição média esperada de um queijo Prato maturado é de 42-44% de umidade, 26-29% de gordura, pH de 5,2 a 5,4 e um teor de sal 1,6 a 1,9% (FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994). SCHIFTAN & KOMATSU (1980) estudaram a composição do queijo Prato usando 50 amostras comerciais e obtiveram valores médios de 40% de umidade, 47,5% de gordura no extrato seco,

1,7% de sal e 3,5% de cinzas. FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978, 1979) apresentaram a composição média do queijo Prato como sendo de: 53 a 59,2% de extrato seco; 40,8 a 47,0% de umidade; 25,3 a 30,5% de gordura e de 47,7 a 51,5% de gordura no extrato seco.

O teor de umidade do queijo Prato é significativamente afetado pelo tamanho dos grãos após o corte da coalhada e pela intensidade de aquecimento da massa. Sob a influência do corte da coalhada, agitação, acidificação e aquecimento, a maior parte da água sai dos grãos; a pré-prensagem no tanque e a prensagem final vêm apenas complementar esta saída de água (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

O rendimento médio obtido na fabricação de um queijo Prato é de 1 Kg de queijo para cada 9,0-9,5 litros de leite (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1979). Um método eficiente para se estimar o rendimento da produção de queijos baseia-se nas cifras de transição dos principais constituintes do leite para o queijo. Estabelecendo-se índices ideais de recuperação para gordura e caseína, é possível fazer-se uma estimativa do rendimento em queijo para uma determinada quantidade de leite cru.

Na determinação das cifras de transição dos componentes do leite para o queijo, FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1979) obtiveram os seguintes valores médios: 83,80% de gordura, 80,39% de proteína, 7,39% de lactose, 36,81% de cinzas, 50,03% para extrato seco total e 37,78% para o extrato seco desengordurado. Os autores observaram ainda que a caseína do leite tem um papel essencial no rendimento da fabricação de queijo, com sua capacidade de adsorver os demais elementos no momento da coagulação, principalmente a gordura. O aumento no teor de proteínas, sobretudo caseínas, implica no aumento da transição, durante a coagulação, de todos os demais componentes do leite. Variando-se o teor de proteínas do leite, o rendimento dos queijos é proporcional a esta variação.

A maturação do queijo Prato ocorre em câmaras a 12-14°C, onde devem permanecer por um período ao redor de 60 dias para o desenvolvimento da consistência e sabor ideais. Na prática, este queijo é maturado por apenas algumas semanas, sendo comercializado quase sempre com o processo de maturação incompleto.

O perfil de maturação do queijo Prato é um processo predominantemente proteolítico. Sendo a proteólise provavelmente o fenômeno mais marcante que ocorre durante a maturação da maioria dos tipos de queijos, é de se ressaltar a sua importância na definição da qualidade organoléptica do queijo Prato (LAW, 1987).

O uso da proteólise como um índice de maturação é geralmente adotado para muitas variedades de queijos, e envolve a separação, quantificação e caracterização dos componentes nitrogenados do queijo durante o período de maturação (FARKYE & FOX, 1990a).

De um modo geral, os estudos sobre a maturação das variedades brasileiras de queijos, e especialmente do queijo Prato, limitam-se à determinação dos teores de nitrogênio na fração solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6) e na fração de nitrogênio não-protéico (NNP). Estes valores são utilizados para se calcular os índices de extensão e de profundidade da maturação.

Os termos "extensão" e "profundidade" da maturação foram sugeridos em 1894 por BONDZYNSKI, conforme citação feita por WOLFSCHOON-POMBO (1983). A extensão da proteólise ou índice de maturação (IEM), caracteriza-se pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis (NS), acumuladas durante o processo de degradação das caseínas e expressas como percentagem do nitrogênio total (NT).

A determinação analítica da extensão da proteólise é baseada na precipitação isoelétrica (pH 4,6) das caseínas em uma amostra diluída de queijo, seguida pela quantificação do nitrogênio solúvel, usando-se o método de Kjeldahl. DESMAZEAUD & GRIPON (1977) descreveram que, de maneira geral, 28% da fração solúvel em pH 4,6 é composta por peptídeos com pesos moleculares inferiores a 3.000 Da; 50% por peptídeos entre 3.000 e 5.000 Da e 20% por peptídeos com pesos moleculares superiores a 5.000 Da.

A profundidade da proteólise abrange as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, acumuladas durante o processo, principalmente pela ação de enzimas proteolíticas do fermento sobre os componentes nitrogenados provenientes da degradação das caseínas. O índice de profundidade pode ser calculado pelo teor de nitrogênio não-protéico (NNP), solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a 12% e expresso como percentagem do nitrogênio total (NT).

3. OBJETIVOS

Considerando-se que o queijo Prato é um dos queijos de maior produção e consumo no Brasil e que seu perfil de maturação é predominado pela proteólise, este trabalho teve como objetivo a avaliação dos processos de degradação dos componentes protéicos do leite durante a maturação do queijo, visando o conhecimento das mudanças que ocorrem neste período, a fim de aprimorar e uniformizar a qualidade deste queijo.

Este estudo tem sua importância caracterizada pelo fato de que, no Brasil, praticamente não existem estudos sobre os processos bioquímicos relacionados com a maturação das variedades de queijos brasileiros e, que a maioria de nossas indústrias queijeiras coloca o produto no mercado de acordo com a demanda, sem a observância dos intervalos de tempo para a maturação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima

Para o processamento do queijo Prato, o leite de vaca tipo B cru, não padronizado quanto ao teor de gordura, foi fornecido pela Cia. Agropecuária Tuiuti (Shefa), situada no município de Amparo, Estado de São Paulo.

Foram realizados seis ensaios utilizando-se em cada um deles, 300 litros de leite tipo B cru. O método de fabricação foi executado de acordo com protocolo descrito por OLIVEIRA (1986) e VAN DENDER et al. (1986), empregando-se os seguintes coadjuvantes: coalho líquido comercial (constituído por uma mistura de cerca de 80% de pepsina bovina e 20 % de renina), corante vegetal (Anato) e solução de cloreto de cálcio 50% da marca Chr Hansen's; cloreto de sódio (salmoura a 20%); e fermento láctico DVS tipo LD constituído pelas seguintes bactérias lácticas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis; Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* variedade *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. De modo geral, as etapas do processamento podem ser resumidas na Figura 6.

4.2. Amostragem

As amostras do leite, soro e coágulo foram retiradas diretamente dos recipientes, após uma pequena agitação visando homogeneizar o produto. As amostras do queijo foram trituradas e homogeneizadas em um multiprocessador. Cada amostra foi coletada em duplicata.

Recepção do leite a 4°C

↓

Pasteurização lenta (62°C/30 minutos)

Resfriamento a 32°C

↓

Cloreto de cálcio (50 mL/100 L)
Fermento láctico (LD - 1%)
Corante vegetal (5 mL/100 L)
Coalho (20 mL/100 L)

↓

Coagulação do leite a 32°C/45 minutos

↓

Corte com grão 3 (0,3 - 0,5 cm^3)

↓

1ª dessora (30% do volume)

↓

1ª agitação (20-25 minutos)

↓

Aquecimento: 17% de água a 80°C até atingir 40°C (1°C/3 minutos)-24 minutos

↓

2ª agitação (40 minutos)

↓

Dessorar e pré-prensar durante 20-30 min. com o dobro do peso da massa

↓

Cortar, enformar

↓

Prensagem 1ª prensa pneumática - 30 minutos - 25 libras pressão
2ª prensa mecânica - até dia seguinte

↓

Desenformar, salgar, secar, embalar, curar

FIGURA 6: Fluxograma das principais etapas do processo de fabricação de queijo tipo Prato.

4.3. Determinações analíticas

As análises físicas e químicas da matéria-prima (leite), do fermento láctico, do soro e da massa nas diversas etapas do processamento, bem como dos queijos com 1 dia de fabricação e durante a estocagem refrigerada (13°C), foram realizadas de acordo com os métodos descritos a seguir. As análises foram feitas em triplicata.

O leite cru foi analisado quanto ao pH, acidez, densidade, gordura, nitrogênio total e não-protéico, lactose, ponto crioscópico, cálcio, fósforo e magnésio. O fermento láctico foi avaliado quanto ao pH e à acidez. O soro e a coalhada nas diversas etapas do processamento foram analisados quanto ao pH, acidez e umidade. Os queijos foram submtetidos às seguintes avaliações físicas e químicas: pH, acidez, extrato seco total (EST), gordura, nitrogênio total, solúvel e não-protéico, cloreto de sódio, cinzas, cálcio, fósforo e magnésio.

4.3.1. Análises físicas e químicas

pH: o pH do leite, soro, fermento láctico e queijo foi determinado por meio de potenciômetro pH-Metro Micronal B375.

Densidade: Foi determinada no leite por meio do termolactodensímetro de Quevenne (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Extrato seco total (EST): O teor de extrato seco total do leite, do soro e do queijo foi determinado pelo método de secagem das amostras mais areia tratada até peso constante (7 horas), em estufa à 102°C (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1982).

Gordura: Para as determinações do teor de gordura presente no leite e no soro, foi utilizado o método de Gerber; no queijo foi empregado o método de Gerber-van Gulik (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Acidez: A acidez dos queijos foi determinada por titulação com NaOH 0,1N, sendo expressa em percentagem de ácido láctico. A acidez do leite, soro e fermento láctico foi determinada pelo método de Dornic (NaOH 0,11N) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Lactose: A determinação de lactose foi realizada de acordo com o método de ACTON (1977), sendo utilizados 0,25g de amostra para o leite e 0,5g e 2,0g para os queijos.

Cloreto de sódio: O teor de sal do queijo foi determinado pela titulação do excesso de nitrato de prata adicionado, usando-se tiocianato de amônio (SERRES et al., 1973).

Gordura no extrato seco (GES): O teor de gordura no extrato seco para o queijo foi calculado pela fórmula:

$$GES = (\% \text{ de gordura} / \% \text{ E.S.T}) \times 100$$

Umidade na substância desengordurada (USD): O teor de umidade no extrato seco desengordurado para os queijos foi calculado pela fórmula:

$$USD = (\% \text{ de umidade} / 100 - \% \text{ de gordura}) \times 100$$

Cinzas: As cinzas foram determinadas em mufla regulada para a temperatura de 550 ± 5°C (HORWITZ, 1975, Proc. 16223).

Teor de cálcio total, de magnésio e de fósforo: Os teores de cálcio total, de magnésio e de fósforo foram determinados em espectrofotômetro de emissão-plasma por argônio (BAIARD), conforme recomendações do fabricante (IMO INDUSTRIES INC. ICP, 1990).

Ponto crioscópico: O abaixamento do ponto de congelamento do leite foi avaliado por meio de um crioscópio digital microprocessado modelo M-90 da Laktron, sendo expresso em graus Hortvet (°H).

Nitrogênio total (NT): O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método oficial de Kjeldahl. O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o valor do nitrogênio total por 6,38 (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1962; 1964).

Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6): O teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 foi determinado pela dosagem do nitrogênio no sobrenadante obtido após precipitação isoelétrica das caseínas (VAKALERIS & PRICE, 1959).

Nitrogênio solúvel em TCA 12% ou Nitrogênio não-protéico (NNP): O teor de nitrogênio solúvel em TCA 12% foi determinado pela dosagem do nitrogênio no sobrenadante obtido após precipitação das proteínas em presença de ácido tricloroacético a 12%, segundo o método descrito por ASCHAFFENBURG & DREWRY (1959).

4.4. Fracionamento das substâncias nitrogenadas

4.4.1. Obtenção das frações para avaliação direta da proteólise

A matéria nitrogenada nos queijos com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias foi fracionada de acordo com o protocolo descrito a seguir.

- Homogeneização de 10g de queijo com 40mL de solução de citrato de sódio 0,5M e cerca de 80mL de água, usando-se homogeneizador Virtis. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 200mL e o volume foi completado com água destilada (Fração 1 - Nitrogênio total).

- Uma alíquota de 100mL desta solução (fração 1) foi misturada com 10mL de HCL 1,41N e o volume foi completado para 125mL com água destilada. A mistura foi filtrada em papel Whatman n°42, obtendo-se uma solução cristalina, contendo a porção de nitrogênio solúvel no ponto isoelétrico (Fração 2 - Nitrogênio solúvel - pH 4,6).

- Uma alíquota da fração 2 foi tratada com igual volume de TCA (ácido tricloroacético) 24% e filtrada em papel Whatman n°42, obtendo-se uma solução límpida contendo a porção nitrogenada não-protéica (Fração 3 - Nitrogênio solúvel em TCA 12%).

- Uma alíquota de 5mL do extrato 2 foi tratada com 3,5mL de ácido sulfúrico 3,95M e 1,5mL de PTA (ácido fosfotúngstico) 33,3%. A mistura foi deixada durante uma noite sob refrigeração e, a seguir, filtrada em papel Whatman n°42. Uma alíquota de 4mL desse filtrado foi diluída para 25mL com NaOH 0,6N (Fração 4 - Nitrogênio - aminoácidos).

4.4.2. Obtenção das frações para análise por eletroforese e RP-HPLC

4.4.2.1. Nitrogênio solúvel em água e em pH 4,6

Para a obtenção destas frações, utilizou-se amostras liofilizadas, eliminando-se assim, as possíveis interferências causadas pelas diferenças nos teores de umidade. As frações solúveis em água, dos queijos com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação, foram preparadas de acordo com o método descrito por KUCHROO & FOX (1982b), mediante homogeneização de 1 parte de queijo com 2 partes de água destilada durante 5 minutos, usando-se um Stomacher. A solução resultante foi mantida a 40°C durante 1 hora e centrifugada a 3.300x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em lã de vidro e, em seguida, em papel Whatman n°113. Esta fração, contendo a porção nitrogenada solúvel em água, foi denominada Fração 5.

Parte desta fração foi utilizada na avaliação direta da proteólise e uma alíquota foi liofilizada para as análises posteriores por eletroforese e cromatografia líquida em coluna de fase reversa (RP-HPLC). A fração insolúvel em água foi liofilizada e reservada para análise por eletroforese em Uréia-PAGE.

Os extratos contendo o nitrogênio solúvel em pH 4,6 foram preparados da mesma forma que os extratos solúveis em água, com o ajuste do pH a 4,6 usando-se HCL 1N antes da centrifugação. Alíquotas deste extrato foram liofilizadas para posterior análise eletroforética.

4.4.2.2. Fracionamento do extrato solúvel em água com etanol 70%.

O fracionamento com etanol 70% foi feito segundo metodologia proposta por REVILLE & FOX (1978). Etanol absoluto foi adicionado ao extrato solúvel em água para uma concentração final de 70% (v/v). A suspensão foi mantida à temperatura ambiente durante 30 minutos e então centrifugada a 3.300x g por 30 minutos a 20°C. O sobrenadante foi filtrado em papel Whatman n°1 e o etanol evaporado num rotavapor a 30-35°C. Após a remoção completa do etanol, as frações solúvel e insolúvel foram liofilizadas e reservadas para análises posteriores.

4.5. Métodos para avaliação direta da proteólise

4.5.1. Determinação dos índices de extensão (IEM) e de profundidade da maturação (IPM)

Estes índices foram obtidos em função dos teores de nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6) e nitrogênio solúvel em TCA 12% ou nitrogênio não-protéico (NNP) relacionados pelas fórmulas (a) e (b), respectivamente (VAKALERIS & PRICE, 1959; WOLFSCHOON-POMBO, 1983, 1989).

(a) IEM = (NS-pH 4,6 / NT) x 100

(b) IPM = (NNP / NT) x 100

4.5.2. Determinação dos teores de tirosina e triptofano

Os teores de tirosina e de triptofano solúveis foram determinados seguindo-se método espectrofotométrico descrito por VAKALERIS & PRICE (1959), na fração obtida após precipitação isoelétrica das caseínas (Nitrogênio solúvel - pH 4,6). Após leitura espectrofotométrica a 270 e 290nm, as concentrações de tirosina e triptofano foram calculadas usando-se as seguintes fórmulas:

Tirosina: $Tyr\ (mM/L) = (0{,}95 \times A_{270} - 1{,}31 \times A_{290}) \times 2$

$Tyr\ (mg/100g\ de\ queijo) = mM/L \times 453$

Triptofano: $Trp\ (mM/L) = (0{,}307 \times A_{290} - 0{,}020 \times A_{270}) \times 2$

$Trp\ (mg/100g\ de\ queijo) = mM/L \times 510{,}5.$

4.5.3. Determinação dos teores de aminoácidos livres totais

4.5.3.1 Reação com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)

A determinação de α-aminonitrogênio (aminoácidos livres totais) nas frações nitrogenadas 1 a 4 obtidas no ítem 4.4.1. foi feita pela reação com TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico), segundo metodologia descrita por ADLER-NISSEN (1979) e CLEGG et al. (1982). Este método fundamenta-se na leitura espectrofotométrica do cromóforo formado pela reação do TNBS com aminas primárias. A reação ocorre em meio ligeiramente alcalino e é interrompida pela diminuição do pH. A reação colorimétrica foi realizada tomando-se 0,25mL de amostra, 2,0mL de solução tampão fosfato 0,2125M pH 8,2 e 2,0mL de solução de TNBS a 0,1%. A mistura foi incubada durante 1 hora a 50°C, ao abrigo da luz. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 4,0mL de HCL 0,1N e deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos. A absorbância foi lida a 340nm contra o branco. A concentração de $\alpha\text{-}NH_2$ foi calculada usando-se uma curva padrão de L-leucina, feita a partir de uma solução contendo 1,5μmoles/mL desse aminoácido.

4.5.3.2. Reação com ninidrina-cádmio

As frações 2 e 5 foram analisadas quanto ao teor de aminoácidos livres totais usando-se uma modificação do método de ninidrina-cádmio, descrito por FOLKERTSMA & FOX (1992). O reagente de ninidrina foi preparado dissolvendo-se 0,8 g de ninidrina numa mistura contendo 80mL de etanol absoluto e 10mL de ácido acético glacial. À solução resultante adicionou-se 1g de cloreto de cádmio dissolvido em 1mL de água destilada. Este reagente deve ser preparado na hora de usar. A reação colorimétrica foi realizada tomando-se alíquotas de 10 a 100μL de amostra (para um volume final de 1mL) e adicionando-se 2,0 mL do reagente de ninidrina. A mistura resultante foi incubada a 84°C durante 5 minutos, resfriada e a absorbância lida num espectrofotômetro a 507nm contra o branco. A concentração de α-NH_2 foi calculada usando-se uma curva padrão de L-leucina.

4.6. Métodos para a separação dos peptídeos individuais

4.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (géis de separação a 12,5% e de concentração a 4%) foi realizada usando-se uma unidade vertical Protean II xi (Bio-Rad), de acordo com uma modificação do método descrito por ANDREWS (1983). Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue (CBB), seguindo-se metodologia descrita por BLAKESLEY & BOEZI (1977).

Os extratos para eletroforese foram preparados dissolvendo-se 20mg de amostra liofilizada em 1mL de tampão, com aquecimento a 40°C durante 1 hora. O tampão para dissolução da amostra foi preparado usando-se 1,5g de trishidroximetil aminometano (TRIS), 98g de uréia, 0,8mL de ácido clorídrico concentrado, 1,4mL de 2-mercaptoetanol, 0,3g de azul de bromofenol, para um volume final de 200mL com água destilada.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Os reagentes utilizados na preparação dos géis foram:

- Solução de acrilamida a 40%.
- Tampão para o gel de concentração ("Stacking gel"): Dissolver 7,5g de TRIS, 4,0mL de ácido clorídrico concentrado e 270g de uréia em água destilada. Ajustar o pH a 7,6 e completar o volume para 1 litro com água destilada.
- Tampão para o gel de separação ("Separating gel"): Dissolver 46g de TRIS, 4,0mL de ácido clorídrico concentrado e 270g de uréia em água destilada. Ajustar o pH a 8,9 e completar o volume para 1 litro com água destilada.
- Tampão do eletrodo: Dissolver 6g de TRIS e 29,2g de glicina em água destilada e completar o volume para 2 litros.
- Solução de persulfato de amônio a 10%.
- Solução corante: preparar uma solução aquosa a 0,2% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250 e adicionar igual volume de solução de ácido sulfúrico 1M. Misturar bem e deixar em repouso durante uma noite. Filtrar a solução em papel Whatman n° 1 e misturar 9 partes do filtrado com 1 parte de solução de hidróxido de potássio 10M. Adicionar ácido tricloroacético (TCA) para uma concentração final de 12%.

Os géis foram preparados com as seguintes proporções:

- Solução para o gel de concentração ("Stacking gel")

5mL de solução de acrilamida

45mL de tampão para o gel de concentração ("Stacking gel")

0,1g N,N,N',N' metilenobisacrilamida (BIS)

Estas soluções foram misturadas e filtradas em papel Whatman n° 1. Ao filtrado, adicionou-se 25 μL de N,N,N',N' tetrametileno diamina (TEMED).

- Solução para o gel de separação ("Separating gel")

22,5mL de solução de acrilamida

52,5mL de tampão "Separating gel"

0,1g N,N,N',N' metilenobisacrilamida (BIS)

Estas soluções foram misturadas e filtradas em papel Whatman n° 1. Ao filtrado, adicionou-se 37,5 μL de TEMED.

- Preparo e corrida do gel

As placas foram montadas de acordo com as instruções do fabricante. Imediatamente antes do uso, foram adicionados 282 μL de solução de persulfato de amônio à solução para o gel de separação ("Separating gel") e esta mistura foi colocada nas placas. Os géis foram cobertos com uma camada de água e deixados em repouso por 40 a 60 minutos para haver a polimerização. Após esta etapa, a camada de água foi removida. À solução para o gel de concentração ("Stacking gel") foram adicionados 300μL de solução de persulfato de amônio. Esta mistura foi colocada nas placas e a seguir coberta com um pente para haver a formação de "poços" para aplicação das amostras. Após polimerização (ao redor de 60 minutos), os pentes foram removidos e as placas foram colocadas em cubas apropriadas, contendo o tampão do eletrodo.

Inicialmente os géis sofreram uma pré-corrida a 280V durante 30 a 40 minutos, fazendo-se o resfriamento do sistema com circulação de água. A separação das amostras foi feita inicialmente a 280V e depois a 300V, até o corante indicador (azul de bromofenol) atingir o final do gel (cerca de 4 a 5 horas). Os géis foram corados por imersão na solução corante durante 1 noite e descorados com água destilada.

4.6.2. Análise de peptídeos por HPLC, em coluna de fase reversa (RP-HPLC)

As amostras foram analisadas por RP-HPLC num cromatógrafo líquido WATERS, usando-se uma coluna de guarda Nucleosil C_8 (4,6mm x 1cm) e uma coluna analítica Nucleosil C_8, com partículas de 5μm e porosidade de 300Å (4,6mm x 25cm). Os solventes utilizados foram: A: Ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% v/v, em água Milli-Q; B: Ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% v/v, em acetonitrila (grau HPLC)

Uma alíquota de 10mg de amostra liofilizada foi dissolvida em 1mL de solvente A, centrifugada a 13.000rpm durante 20 minutos e filtrada em filtro de acetato de celulose de 0,45μm. O filtrado (40μL) foi aplicado na coluna e eluído inicialmente com 100% de solvente A e então, com um gradiente linear de 0 a 50% de solvente B durante 55 minutos, seguido por um gradiente linear de 60% de solvente B por 4 minutos, e finalmente com 60% de solvente B por 3 minutos. O eluato foi monitorado a 214nm. O fluxo foi mantido em 0,75mL/minuto. Após a eluição, a coluna foi lavada com 95% de solvente B por 3 minutos, seguido de equilíbrio com solvente A por pelo menos 15 minutos.

4.6.3. Determinação dos aminoácidos livres individuais

Os aminoácidos livres individuais presentes nos queijos, durante o período de maturação, foram avaliados usando-se as amostras liofilizadas da fração solúvel em etanol e diluídas em diluente pH 2,2 (Pickering). Alíquotas de 25μL foram injetadas em analisador de aminoácidos Dionex DX-300, para separação dos aminoácidos individuais, em coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina, seguindo-se a metodologia clássica descrita por SPACKMAN et al. (1958). Os aminoácidos foram calculados usando-se como referência solução padrão de aminoácidos Pierce.

4.7. Determinação instrumental do perfil de textura

A textura do queijo Prato foi avaliada pela análise do perfil de textura (TPA - Texture Profile Analysis), utilizando-se o texturômetro TA-XT2 Stable Micro Systems (SMS), cujo software é autoexplicativo. O TA-XT2 fornece medidas de compressão, tanto de distância como de força. Os resultados são apresentados de forma gráfica e a integração é feita pelo software específico do equipamento, proporcionando a interpretação dos resultados. Optou-se pela avaliação da textura pelo método TPA, por ser este um dos mais adequados para o produto em questão, fornecendo uma série de informações, num mesmo teste. As condições de operação do equipamento foram: velocidade de teste de 1mm/s; distância: 10,0mm; compressão por corpo de prova de 50mm de diâmetro. Os parâmetros do perfil de textura fornecidos pelo software do equipamento foram elasticidade, coesividade, mastigabilidade, gomosidade, adesividade, fraturabilidade e firmeza.

4.7.1. Preparo das amostras para TPA

De cada peça de queijo Prato duas fatias de 30mm de espessura foram destinadas ao teste. Destas fatias retirou-se 12 cilindros, sendo 6 deles na região externa e os restantes na região central. O teste foi realizado com no mínimo 10 cilindros, sendo 5 de cada uma das regiões. As amostras para leitura tinham um formato cilíndrico com diâmetro e altura de 20mm, que foram cortadas com uma lâmina cilíndrica afiada.

As amostras foram embaladas em pequenos sacos plásticos, devidamente fechados, para evitar o seu ressecamento. A fim de se evitar a influência da temperatura na textura, as amostras foram mantidas sob temperatura controlada (aproximadamente 10°C) dentro de um recipiente isotérmico, por uma hora antes do início da análise. Durante o teste, foi verificada a homogeneidade e a uniformidade das amostras; quando ocorreu desintegração durante a medida, o resultado foi desconsiderado e o teste repetido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises físicas e químicas do leite, soro e coalhada

Na Tabela 8 são apresentados os resultados das análises físicas e químicas realizadas nos leites utilizados nos vários ensaios. Observa-se que os valores obtidos nestas determinações estão de acordo com aqueles descritos na literatura (RENNER, 1987; SCOTT, 1989). As amostras referentes ao primeiro ensaio foram utilizadas na padronização da metodologia empregada e, portanto, estes dados não serão considerados entre os resultados finais. O fermento láctico utilizado, tipo LD, apresentou acidez média de 82,5°D e pH de 4,30 a 4,52.

TABELA 8: Resultados das análises físicas e químicas do leite tipo B.

Leite cru	Intervalo de variação	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
pH	6,53 - 6,79	6,67	0,097	1,45
Acidez (°D)	15,19 - 17,45	16,42	0,900	5,48
Densidade (g/cm^3)	1,0290 - 1,0325	1,0310	0,0013	0,13
Gordura (%)	3,30 - 3,80	3,50	0,200	5,71
Extrato seco total (%)	11,29 - 12,37	11,76	0,469	3,98
Cinzas (%)	0,65 - 0,78	0,70	0,050	7,23
Lactose (%)	4,90 - 5,04	4,98	0,051	1,02
Proteína total (Nx6,38)	2,93 - 3,20	3,12	0,110	3,52
NT (%)	0,46 - 0,50	0,49	0,016	3,37
NNP (%)	0,02 - 0,04	0,03	0,007	23,57
Ponto crioscópico (°H)	-0,530 - -0,541	-0,536	0,005	-1,01
Ca (ppm)	1121,12 - 1794,91	1320,12	270,470	20,49
Mg (ppm)	78,96 - 133,89	97,68	21,606	22,12
P (ppm)	689,88 - 1301,50	879,11	246,679	28,06
Leite pasteurizado				
pH	6,57 - 6,66	6,62	0,034	0,51
Acidez (°D)	15,05 - 18,11	16,01	1,220	7,623

°D: Graus Dornic
°H: Graus Hortvet

Os altos valores nos coeficientes de variação encontrados para as determinações de NNP, cálcio, magnésio e fósforo podem ser explicados pela variabilidade da matéria-prima, que foi coletada em diferentes épocas do ano. O leite é um produto sujeito a alterações em sua composição química, sendo esta influenciada por muitos fatores, como a raça e cruzamentos, o estágio de lactação, o solo e o clima, os estados fisiológico, psicológico e patológico, a idade e a alimentação do animal, entre outros.

Os resultados da Tabela 9 referem-se ao comportamento do soro e da coalhada nas diversas etapas do processo em relação ao pH, acidez e umidade, nos vários ensaios realizados. O pH do soro se manteve praticamente constante, devido principalmente à adição de água durante o aquecimento. A acidez também se manteve constante, havendo uma ligeira diminuição após a 2ª dessora, variando de 0,124 a 0,116. O pH da coalhada apresentou uma diminuição durante as fases de fabricação, com uma variação dos valores médios de 6,40 na 1ª dessora a 5,21 após a prensagem, coincidindo com um aumento da acidez, que variou de 0,060 a 0,918.

5.2. Análises físicas e químicas dos queijos

Os resultados das análises físicas e químicas dos queijos nos vários ensaios, durante o período de maturação, constando basicamente dos valores de pH, acidez, extrato seco total (EST), gordura (Gb), gordura no extrato seco (GES), cinzas, lactose, cloreto de sódio (sal), nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel (NS), nitrogênio não-protéico (NNP), umidade na substância desengordurada (USD), minerais (Ca, Mg, P) são apresentados na Tabela 10. Observa-se uma tendência de aumento do pH em direção ao final do período, com valores médios variando de 5,23 no 1° dia de maturação a 5,35 no 40° dia. A ordem de grandeza deste aumento foi menor do que a citada na literatura. Este aumento se deve à formação de compostos solúveis na fase aquosa dos queijos, em decorrência da proteólise, que contribui para a ligeira alcalinidade do meio (FOX, 1989; LAW, 1987; LAWRENCE et al., 1987).

TABELA 9: Resultados das análises físicas e químicas do soro e da coalhada nas diversas fases do processamento do queijo Prato.

Determinações	Intervalo de variação	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Soro				
Corte				
pH	6,38 - 6,56	6,47	0,066	1,02
Acidez (%)	0,108 – 0,133	0,124	0,010	8,09
1ª dessora				
pH	6,33 - 6,57	6,44	0,091	1,42
Acidez (%)	0,113 – 0,139	0,128	0,011	8,58
2ª dessora				
pH	6,19 - 6,59	6,34	0,152	2,40
Acidez (%)	0,098 – 0,143	0,116	0,017	14,80
Coalhada				
1ª dessora				
pH	6,11 - 6,59	6,40	0,178	2,78
Acidez (%)	0,05 - 0,08	0,060	0,012	20,41
Umidade (%)	74,62 - 80,85	76,66	2,523	3,92
2ª dessora (Ponto)				
pH	5,88 - 6,58	6,26	0,250	4,00
Acidez (%)	0,05 - 0,10	0,072	0,019	26,72
Umidade (%)	61,91 - 65,43	64,05	1,379	2,15
Após pré-prensagem				
pH	5,78 - 6,54	6,06	0,299	4,93
Acidez (%)	0,08 - 0,17	0,128	0,035	27,29
Umidade (%)	48,43 - 57,42	52,25	3,646	6,98
Após prensagem				
pH	5,11 - 5,36	5,21	0,095	1,83
Acidez (%)	0,77 - 1,05	0,918	0,109	11,92
Umidade (%)	41,30 - 43,40	42,29	0,795	1,88

TABELA 10: Resultados das análises físicas e químicas dos queijos durante o período de maturação.

Determinações	1 dia de maturação		7 dias de maturação		14 dias de maturação	
	Intervalo de variação	Média	Intervalo de variação	Média	Intervalo de variação	Média
pH	5,18 - 5,29	5,23	5,16 - 5,36	5,25	5,26 - 5,39	5,33
Acidez (%)	0,49 - 0,93	0,73	0,52 - 1,44	0,80	0,52 - 0,72	0,61
Umidade (%)	37,80 - 41,99	40,37	37,17 - 40,85	38,89	36,35 - 41,02	38,72
EST (%)	58,01 - 62,20	59,63	59,15 - 62,83	61,11	58,98 - 63,65	61,28
Gordura (%)	29,21 - 33,76	31,87	30,70 - 34,61	32,98	29,63 - 35,77	32,83
GES (%)	51,04 - 54,73	53,68	51,90 - 57,08	53,95	50,24 - 57,24	53,51
Cinzas (%)	3,29 - 4,17	3,72	3,42 - 4,00	3,81	2,97 - 4,00	3,67
Lactose (%)	0,07 - 0,09	0,08	0,07 - 0,11	0,09	0,03 - 0,08	0,07
Sal (%)	1,42 - 2,09	1,77	1,62 - 1,97	1,80	1,65 - 1,90	1,80
NT (%)	3,41 - 3,59	3,47	3,55 - 3,63	3,59	3,45 - 3,65	3,54
NS-pH 4,6 (%)	0,17 - 0,29	0,24	0,28 - 0,35	0,32	0,37 - 0,40	0,39
NNP (%)	0,07 - 0,13	0,09	0,14 - 0,18	0,15	0,16 - 0,20	0,18
USD (%)	57,06 - 61,63	59,39	56,44 - 60,20	58,03	55,85 - 58,62	57,63
Ca (ppm)	6868,77 - 9317,31	8205,81	7699,04 - 8754,15	8141,16	7588,06 - 8747,95	8215,10
Mg (ppm)	203,35 - 286,10	262,59	243,53 - 284,87	267,29	237,24 - 296,03	268,71
P (ppm)	4392,90 - 6219,63	5088,60	4259,60 - 5252,71	4906,50	4465,89 - 5191,16	4980,73

(continua)

TABELA 10: Resultados das análises físicas e químicas dos queijos durante o período de maturação (continuação).

Determinações	21 dias de maturação		28 dias de maturação		40 dias de maturação	
	Intervalo de variação	Média	Intervalo de variação	Média	Intervalo de variação	Média
pH	5,13- 5,34	5,26	5,28 - 5,36	5,33	5,29 - 5,40	5,35
Acidez (%)	0,51 - 0,92	0,65	0,40 - 0,83	0,62	0,72 - 0,83	0,77
Umidade (%)	36,14 - 40,65	38,78	36,75 - 40,69	38,98	36,74 - 40,82	38,90
EST (%)	59,35 - 63,86	61,22	59,31 - 63,25	61,02	59,18 - 63,26	61,10
Gordura (%)	30,04 - 38,41	33,56	31,89 - 35,05	33,36	29,88 - 34,69	32,18
GES (%)	50,61 - 62,21	54,74	52,53 - 56,52	54,67	50,49 - 54,84	52,63
Cinzas (%)	2,97 - 4,00	3,66	3,28 - 4,10	3,74	3,62 - 3,79	3,69
Lactose (%)	0,06 - 0,10	0,08	0,01 - 0,08	0,06	0 - 0,08	0,05
Sal (%)	1,59 - 2,18	1,82	1,68 - 2,00	1,83	1,57 - 1,81	1,71
NT (%)	3,48 - 3,62	3,54	3,52 - 3,69	3,59	3,46 - 3,80	3,63
NS-pH 4,6 (%)	0,37 - 0,47	0,44	0,36 - 0,54	0,46	0,46 - 0,54	0,50
NNP (%)	0,18 - 0,24	0,20	0,19 - 0,30	0,24	0,20 - 0,34	0,26
USD (%)	55,45 - 62,15	58,36	53,96 - 60,87	57,96	56,25 - 58,21	57,34
Ca (ppm)	7521,93 - 8591,27	8269,84	7248,91 - 8523,03	8115,66	8149,06 - 8558,98	8337,92
Mg (ppm)	238,19 - 293,89	272,26	222,16 - 296,96	268,69	244,46 - 297,14	273,53
P (ppm)	4658,35 - 5502,73	5048,56	4749,99 - 5831,61	5310,92	4729,03 - 5958,34	5351,78

De maneira geral, os resultados obtidos estão de acordo com aqueles apresentados na literatura. A formação de ácido láctico durante a fabricação e o metabolismo da lactose residual na fase inicial da maturação, reduzem o pH para cerca de 5,0 (± 0,3), dependendo da variedade do queijo. Durante a maturação, o pH do queijo aumenta, devido à formação de compostos nitrogenados de caráter alcalino e/ou do catabolismo do ácido láctico (FARKYE & FOX, 1990a; FOX, 1989).

O pH do queijo Cheddar, de maneira geral, aumenta apenas 0,1 unidade após 6 meses de maturação; o do Gouda aumenta de 5,1 para 5,3-5,9, dependendo da época do ano em que o queijo é processado (LAWRENCE et al., 1987). O pH do Camembert aumenta de 4,8 para níveis tão altos quanto 7,5 (TRIEU-COUT & GRIPON, 1982), enquanto o pH dos queijos azuis aumenta de aproximadamente 4,8 para 7,0 (GODINHO & FOX, 1982). Mudanças no pH desta grandeza são indicadores úteis da idade dos queijos para as variedades maturadas por bolores, mas o pH é de pouco uso como um índice de maturação do Cheddar.

Ainda, segundo a literatura, a umidade máxima do queijo é de 45%, cinzas de 2,1 a 5,3%, cloretos de 0,7 a 3,6% e lactose com tendência a zero no final do período de maturação (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1978; SCHIFTAN & KOMATSU, 1980; WALSTRA et al., 1987a).

As propriedades físicas e químicas do leite influenciam na composição final do queijo. Da mesma forma, a composição do queijo, especialmente os valores de pH e os teores de umidade e sal têm grande efeito no seu perfil de maturação.

A taxa de proteólise durante a maturação é afetada de maneira marcante pela relação sal/umidade no queijo. THOMAS & PEARCE (1981) demonstraram este fato em queijos Cheddar. Após um período de 28 dias a 10°C, apenas 5% da αs_1-caseína, e 50% da β-caseína, ainda estavam intactas na porção de queijo com uma relação sal/umidade de 4%. Quando esta relação era de 6%, 30% da αs_1-caseína e 80% da β-caseína

permaneciam intactas. Numa relação sal/umidade de 8%, 60% da αs_1-caseína e 95% da β-caseína não estavam hidrolisadas. Os autores observaram uma relação quase linear entre o grau de degradação de ambas as caseínas e a relação sal/umidade.

O pH tem um papel importante, tanto na extensão da proteólise como nas alterações de textura. Mudanças no pH estão diretamente relacionadas a mudanças químicas na cadeia de proteínas. Quando o pH da massa diminui, há uma perda concomitante de fosfato de cálcio coloidal das micelas de caseína e, abaixo de pH 5,5, há uma dissociação progressiva das micelas em agregados menores de caseínas (de JONG, 1976; LAWRENCE et al., 1987). Quando o pH da massa de queijo se aproxima do ponto isoelétrico das caseínas, a proteína assume uma conformação mais compacta e o queijo adquire uma textura mais firme.

NOOMEN (1978) demonstrou um aumento na extensão da proteólise em sistemas-modelo, com valores de pH maiores que 5,8. A taxa relativa de hidrólise da αs_1-caseína foi maior em pH baixo que a da β-caseína. Em valores de pH maiores que 5,6, a β-caseína foi mais degradada que a αs_1-caseína, provavelmente devido ao aumento da atividade de plasmina. De acordo com VISSER (1981), não é fácil extrapolar os dados destes estudos para o queijo, uma vez que a atividade proteolítica do coalho é, em grande parte, influenciada pela natureza do substrato.

5.3. Avaliação direta da proteólise

A detecção e quantificação dos produtos de degradação das proteínas dos queijos são usadas como parâmetros para expressar o índice de maturação, uma vez que a extensão da degradação das proteínas tem implicações diretas no desenvolvimento da textura, sabor e aroma da maioria dos queijos maturados, como é o caso do queijo Prato (LAW, 1987).

As alterações físicas e químicas que ocorrem durante a maturação determinam a qualidade organoléptica total do queijo. Tais qualidades são estimadas tradicionalmente pela avaliação sensorial do "flavour", corpo e textura, e a qualidade global do queijo avaliada por um painel de julgadores experientes ou consumidores treinados. Contudo, as preferências pessoais dos julgadores e sua incapacidade de avaliar um grande número de amostras, devido à fadiga, tornam a avaliação sensorial subjetiva. Essa análise é essencial na avaliação da qualidade do queijo antes do lançamento do produto no mercado, mas é inadequada quando usada isoladamente para a comparação de dados de pesquisa de diferentes laboratórios. Por esta razão, há a preferência na utilização de análises físicas e químicas para monitorar e avaliar objetivamente a maturação de queijos.

Para a maioria dos queijos, a proteólise é o parâmetro mais comumente usado como um indicador da maturação, podendo ser acompanhada pela formação de compostos nitrogenados. Este acompanhamento pode ser feito de uma maneira direta, pelo fracionamento destas substâncias nitrogenadas, utilizando-se diferentes solventes, e a medida dos grupamentos reativos. Os métodos eletroforéticos e cromatográficos são mais específicos e usados para a caracterização dos peptídeos formados durante a maturação.

Na Tabela 11 estão resumidos os valores médios obtidos nos ensaios realizados para a avaliação direta da proteólise, constando das análises das frações nitrogenadas pelo método de Kjeldahl, reação colorimétrica com TNBS e com ninidrina-cádmio, teores de tirosina e triptofano e absorbância a 274,5nm.

5.3.1. Extensão e profundidade da maturação

O índice de extensão da maturação (relação NS-pH 4,6/NT), que mede o desdobramento do nitrogênio total em nitrogênio solúvel, devido à degradação das caseínas, é um fator de grande importância na composição final e nas características

TABELA 11. Valores médios obtidos nos ensaios realizados para avaliação direta da proteólise.

	Tempo de maturação (dias)					
Determinações	1	7	14	21	28	40
Análise por Kjeldahl						
NT (%)	3,47	3,59	3,54	3,54	3,99	3,63
NS-pH 4,6 (%)	0,24	0,32	0,39	0,44	0,46	0,50
NS-pH 4,6, como % de NT	6,84	8,97	10,92	12,40	12,78	13,89
NNP (%)	0.09	0,15	0,18	0,20	0,24	0,26
NNP, como % de NT	2,70	4,18	5,03	5,65	6,57	7,26
Análise com TNBS						
NT (mg leu/g)	14,37	16,69	18,55	18,50	19,30	20,37
NS-pH 4,6 (mg leu/g)	1,63	2,74	4,32	5,28	5,98	7,51
NS-pH 4,6, como % de NT	11,67	16,23	23,29	28,63	30,99	35,54
NNP (mg leu/g)	1,15	2,04	3,43	4,20	4,64	6,08
NNP, como % de NT	8,17	12,20	18,43	22,71	23,91	28,40
Análise com ninidrina						
NS-pH 4,6 (mg leu/g)	1,58	2,21	2,89	3,58	3,97	5,04
Tirosina (mg/100g)	41,14	50,32	71,62	77,71	82,06	93,20
Triptofano (mg/100g)	44,89	49,27	50,15	52,06	55,12	61,61
Absorbância a 274,5nm	0,280	0,308	0,336	0,358	0,376	0,426

organolépticas do produto. O acompanhamento destes dados num queijo permite conhecer melhor o índice de aproveitamento dos elementos do leite na coalhada, a atividade proteolítica do fermento e das enzimas nativas do leite, bem como estabelecer o momento ideal de lançamento do produto no mercado. Este índice aumenta com o avanço da maturação; de acordo com ROGICK (1951), estes valores para o queijo Prato seriam de 4,2 após 2 dias; 7,7 após 15 dias; 14,5 após 30 dias e 23,3 após 90 dias de maturação.

WOLFSCHOON-POMBO (1983), determinando o índice de maturação de alguns queijos brasileiros, encontrou valores entre 5,1 % a 8,2 % para o queijo Prato após 4 dias e entre 11,9 % a 14,0 % após 30 dias de maturação.

O índice de profundidade (relação NNP/NT) foi calculado com a finalidade de se verificar a formação de substâncias de baixo peso molecular acumuladas durante a maturação, devido principalmente à ação proteolítica de enzimas microbianas sobre os compostos nitrogenados provenientes da degradação das caseínas.

As curvas referentes às relações NS-pH 4,6/NT e NNP/NT, obtidas após análise das frações pelo método de Kjeldahl, que expressam respectivamente a extensão e a profundidade da maturação, podem ser observadas na Figura 7. Os resultados em todos os ensaios mostraram um aumento gradual nestas relações, variando durante o período de maturação de 6,84 a 13,89% para a relação NS-pH 4,6/NT e de 2,70 a 7,26% para a relação NNP/NT. A análise de regressão destes parâmetros, cujos dados são apresentados na Tabela 12, mostrou um melhor ajuste ao modelo quadrático, com uma correlação muito significativa e valores de R^2 ajustado de 0,989 e 0,983 para as relações NS-pH 4,6/NT e NNP/NT, respectivamente. Estes índices são considerados índices brutos e não refletem a totalidade das transformações que as proteínas sofrem durante o processo de maturação.

VENEMA et al. (1987) escolheram como parâmetros para avaliar o grau de maturação dos queijos Gouda e Edam, as relações NS em água/NT e NS em TCA/NT, sendo que o NS em TCA, expresso como percentagem de nitrogênio total, foi o que apresentou as correlações mais altas em todos os casos. Esta fração solúvel em TCA 12%, composta por aminoácidos e peptídeos menores, é usada amplamente como indicador da maturidade de queijo Cheddar (REVILLE & FOX, 1978).

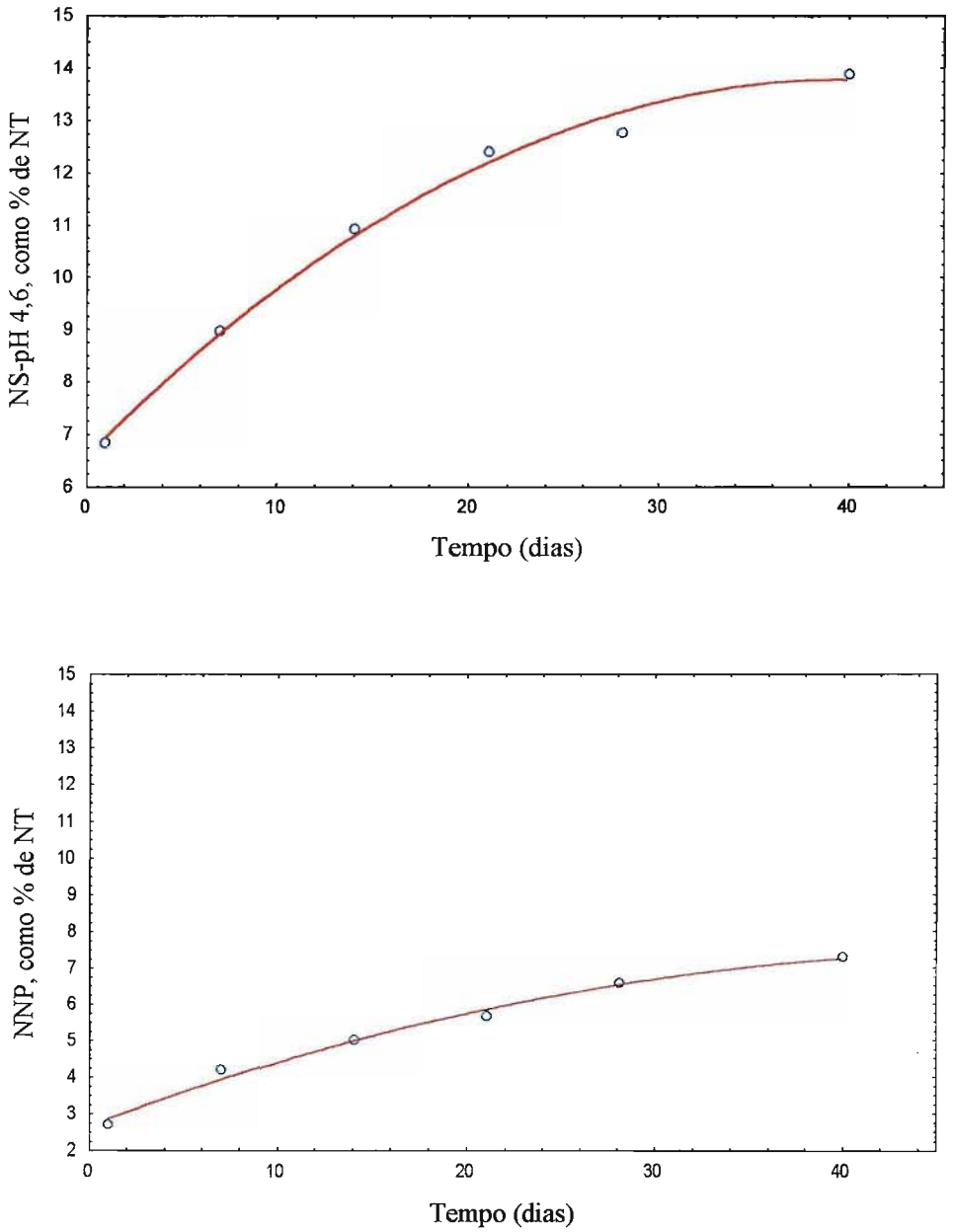


FIGURA 7. Evolução dos teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6) e em TCA 12% (NNP), como % do nitrogênio total, durante o período de maturação do queijo Prato (valores obtidos pelo método de Kjeldahl).

TABELA 12. Parâmetros da análise de regressão dos índices químicos usados na medida direta da proteólise e o tempo de maturação.

Determinações	Valores de R^2		Valores de p dos coeficientes de regressão		Equação de regressão
Análise por Kjeldahl	R^2	R^2 ajustado	Linear	Quadrático	
NS-pH 4,6 (%)	-	0,991	0,000961***	0,006056**	$y=0,212+0,0313x-0,00017x^2$
NS-pH 4,6, como % de NT	-	0,989	0,001343**	0,008006**	$y=6,585+0,365x-0,00465x^2$
NNP (%)	-	0,971	0,007820**	0,060996	$y=0,09+0,0007x-0,00008x^2$
NNP, como % de NT	-	0,983	0,003857**	0,038118*	$y=2,666+0,193x-0,00198x^2$
Análise com TNBS					
NS-pH 4,6 (mg leu/g)	-	0,993	0,001780**	0,042621*	$y=1,42+0,215x-0,00162x^2$
NS-pH 4,6, como % de NT	-	0,992	0,001348**	0,014550*	$y=10,181+1,073x-0,01103x^2$
NNP (mg leu/g)	-	0,984	0,006263**	0,012831*	$y=0,992+0,175x-0,00125x^2$
NNP, como % de NT	-	0,984	0,003486**	0,033306*	$y=7,081+0,903x-0,00942x^2$
Análise com ninidrina					
NS-pH 4,6 (mg leu/g)	0,994	-	0,000012***	-	$y=1,5921+0,08764x$
Tirosina (mg/100g)	-	0,962	0,010847*	0,074394	$y=38,057+2,446x-0,02729x^2$
Triptofano (mg/100g)	0,966	-	0,000452***	-	$y=44,901+0,39366x$
Absorbância a 274,5nm	0,994	-	0,000014***	-	$y=0,28057+0,00361x$

R^2 e R^2 ajustado: obtidos respectivamente a partir da regressão linear e quadrática.

(*): significativo ao nível de 5%; (**): significativo ao nível de 1%; (***): significativo ao nível de 0,1%.

5.3.2. Teores de tirosina e triptofano

A Figura 8 mostra a evolução dos teores de tirosina e triptofano solúveis, e os valores de absorbância a 274,5nm obtidos na mesma fração utilizada para a determinação de tirosina e triptofano. Analisando-se os gráficos e os dados da Tabela 11, observa-se um aumento gradual nestes valores durante a maturação, variando de 41,14 a 93,20 mg/100g para a tirosina, 44,89 a 61,61mg/100g para o triptofano e 0,280 a 0,426 para a absorbância a 274,5nm. Estes valores diferem daqueles obtidos por MARCOS et al. (1979), que analisaram diferentes tipos de queijos. No entanto, os autores não especificaram sua idade, o que torna difícil a comparação dos resultados.

De acordo com VAKALERIS & PRICE (1959), a concentração de tirosina e triptofano solúveis nos queijos está estreitamente relacionada com a percentagem de nitrogênio solúvel determinada pelo método de Kjeldahl. Estas relações, expressas pelos coeficientes de correlação, foram de 0,964 e 0,886, respectivamente. Segundo os autores, a menor correlação entre o triptofano e o nitrogênio solúvel pode ser atribuída à decomposição do triptofano por processos enzímicos, que passa a não absorver mais na região do ultravioleta. A relação entre a absorbância a 274,5nm e o nitrogênio solúvel medido pelo método de Kjeldahl (com ambas as medidas feitas no mesmo extrato) foi altamente significativa, com um coeficiente de correlação de 0,958. Os autores concluíram que esse método espectrofotométrico é um procedimento rápido para a estimativa da extensão da maturação em queijos. Como a liberação da tirosina é uma conseqüência da ação de enzimas do fermento e do coalho, os valores obtidos seguiram a mesma tendência daquela observada nos índices de maturação apresentados na Figura 7.

Pelos dados obtidos em nosso experimento, observou-se também uma correlação muito significativa entre estes compostos e a % de NS-pH 4,6 (valores de 0,990 para a tirosina, 0,916 para o triptofano e 0,962 para a absorbância a 274,5nm).

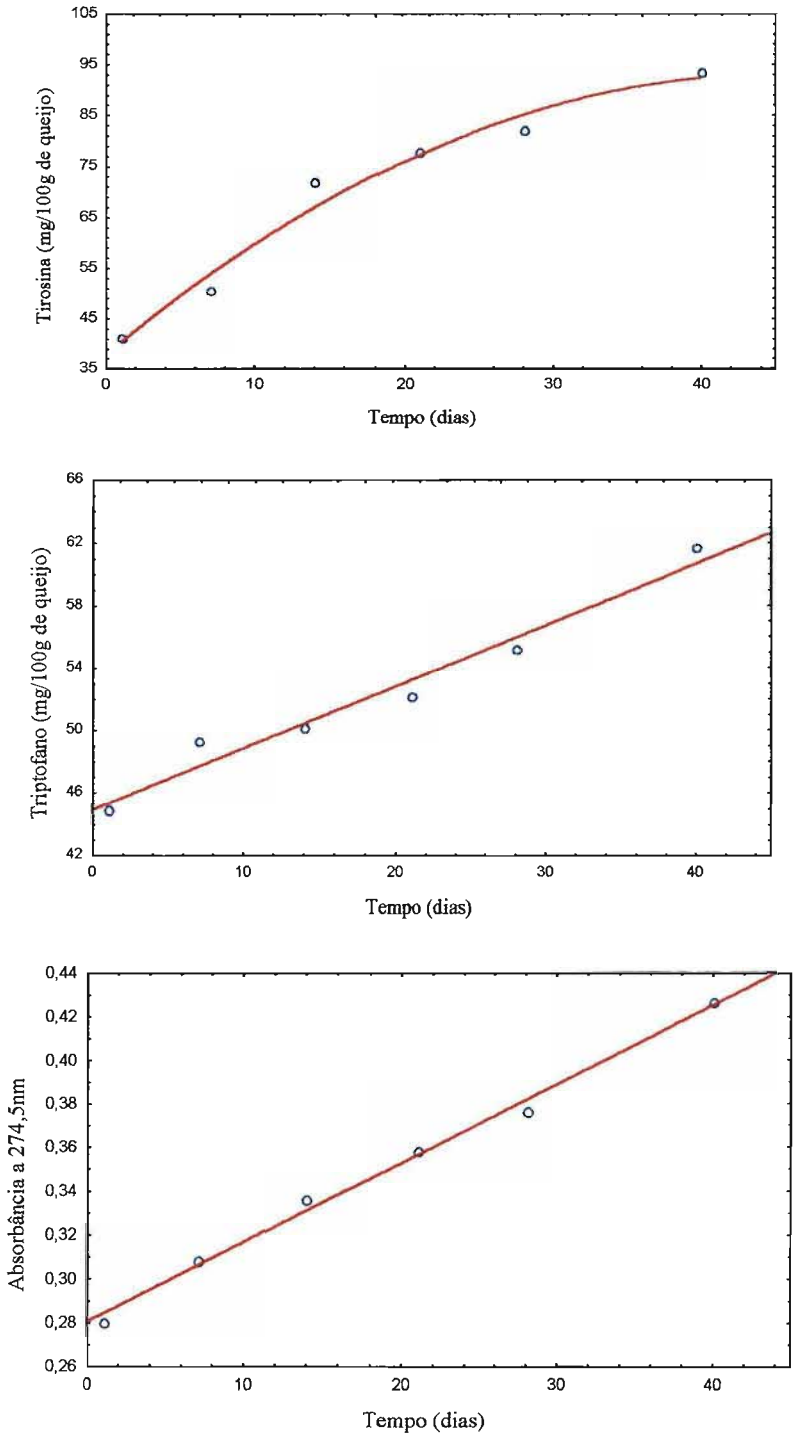


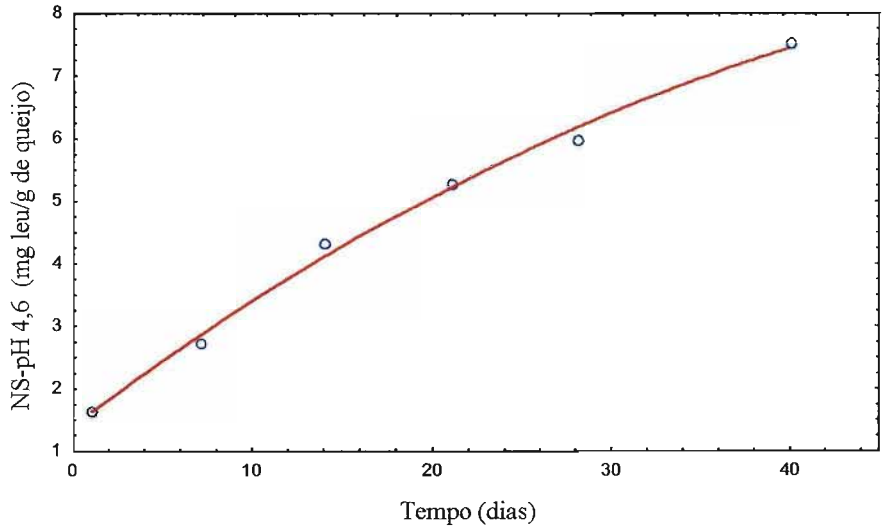
FIGURA 8. Evolução dos teores de tirosina e triptofano solúveis e dos valores de absorbância a 274,5nm no queijo Prato, durante o período de maturação.

A determinação espectrofotométrica dos aminoácidos tirosina e triptofano, especialmente a tirosina, comprovou ser uma metodologia adequada para a avaliação da intensidade de maturação. Os valores obtidos apresentaram a mesma tendência dos índices de extensão e de profundidade da maturação, que são mais trabalhosos e demorados. Embora esses índices não reflitam a totalidade das transformações que as proteínas sofrem durante o período de maturação, são considerados adequados para o monitoramento da intensidade da maturação. Segundo MARCOS et al. (1979), os métodos clássicos de determinação dos teores de nitrogênio por Kjeldahl e a determinação das concentrações de tirosina e triptofano solúveis, são muito úteis para a comparação de queijos em que a extensão da proteólise difere consideravelmente e naquelas amostras com maior grau de maturação.

Pela análise de regressão, os valores de tirosina apresentaram um melhor ajuste ao modelo quadrático (R^2 ajustado de 0,962), e os de triptofano e de absorbância a 274,5nm, ao modelo linear (R^2 de 0,966 e 0,994, respectivamente).

5.3.3. Formação de grupamentos amínicos em decorrência da proteólise. Reação com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e com ninidrina-cádmio

Nas Figuras 9 e 10 são apresentados, respectivamente, os valores de α-aminonitrogênio determinados por reação com TNBS nas frações NS-pH 4,6 e NS-TCA 12% (NNP), e os valores de grupamentos amínicos livres reativos com ninidrina-cádmio, para a fração NS-pH 4,6. Os dados mostram um aumento nos teores de grupamentos amínicos livres em todas as frações, com um aumento ligeiramente maior no final do período de maturação, especialmente nas amostras analisadas com ninidrina-cádmio. A fração 4, contendo a porção nitrogenada proveniente de aminoácidos (nitrogênio solúvel em ácido fosfotúngstico, NS-PTA), apresentou valores baixos e muitas vezes não mensuráveis pelos métodos empregados, em quase todos os ensaios realizados. Isso se deve ao fato de que a maior formação de aminoácidos ocorre apenas nas etapas



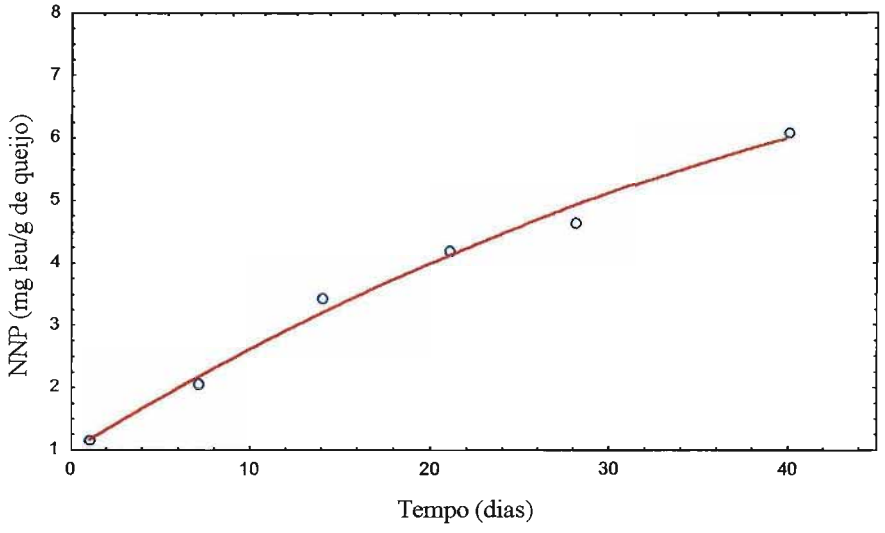


FIGURA 9. Efeitos da maturação nas frações nitrogenadas, NS-pH 4,6 e NNP, determinadas por reação colorimétrica com TNBS (mg leucina/g de queijo).

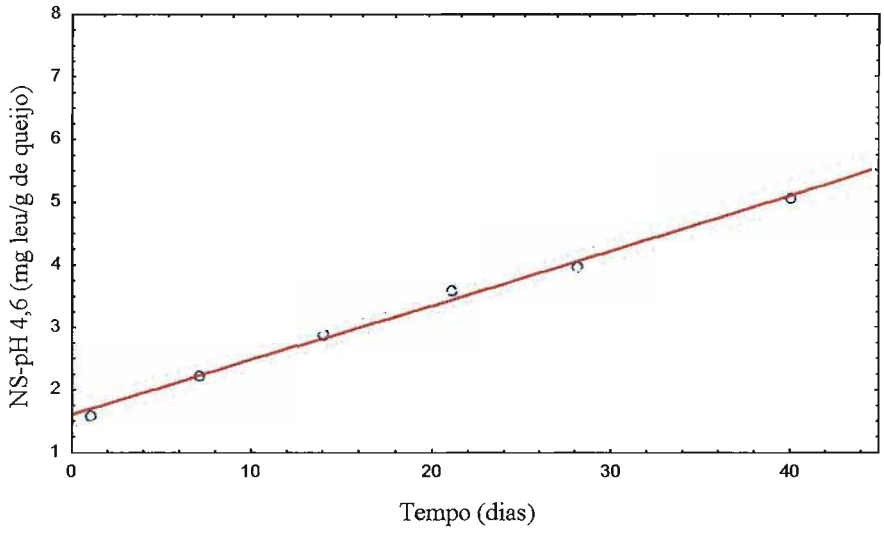


FIGURA 10. Efeitos da maturação na fração nitrogenada solúvel em pH 4,6, determinada por reação colorimétrica com ninidrina-cádmio (mg leucina/g de queijo).

finais de maturação, em queijos com períodos de maturação mais longos e perfil de proteólise mais extensivo, o que não é o caso do queijo Prato. O aparecimento de aminoácidos depende também da capacidade das proteinases/peptidases hidrolisarem as caseínas, formando peptídeos menores e aminoácidos.

REDDY & MARTH (1993), estudando o queijo Cheddar preparado com e sem o processo de salga, usando diferentes sais, obtiveram valores significativos para a fração solúvel em PTA, determinada por reação com TNBS, durante um período que variou de 12 a 36 semanas de maturação. Os valores médios para esta fração foram maiores do que os obtidos na fração solúvel em TCA 12%. JARRETT et al. (1982) descreveram que os níveis de nitrogênio solúvel em PTA forneceram uma boa estimativa dos teores de aminoácidos livres totais no queijo Cheddar.

LAW et al. (1992), observaram que os níveis de grupamentos amínicos reativos com ninidrina-cádmio em queijos Cheddar feitos com temperaturas de cozimento de 36°C, foram maiores durante a maturação do que naqueles cozidos a 39°C. Os autores

concluíram que esses resultados indicavam que tanto a profundidade como o nível de proteólise foram maiores nos queijos cozidos a 36°C, provavelmente devido ao maior número de células presentes, em conseqüência da menor temperatura de cozimento usada.

A reação de um extrato de queijo com TNBS é um método comum para a determinação da concentração de grupamentos amínicos livres em queijos (BARLOW et al., 1986; CLEGG et al., 1982; JARRET et al., 1982; KUCHROO et al., 1983; SAMPLES et al., 1984). Entretanto, alguns autores criticam este método, porque ele pode subestimar os níveis de proteólise em queijos com altos teores de amônia, uma vez que o TNBS reage lentamente com estes compostos (CLEGG et al., 1982; PEARCE et al., 1988). O método de avaliação da proteólise em queijos com o reagente de ninidrina-lítio é particularmente útil em queijos onde o catabolismo de aminoácidos a aminas, amônia e α-cetoácidos entre outros, é uma etapa importante durante a maturação (PEARCE et al., 1988).

O método que utiliza o reagente de ninidrina-cádmio é uma modificação daquele desenvolvido por DOI et al. (1981), adaptado para o monitoramento da proteólise em queijos. Esta modificação permitiu um aumento na sensibilidade da reação com ninidrina-cádmio em relação ao TNBS, para medidas de grupamentos amínicos livres, podendo ser realizado utilizando-se as frações preparadas com citrato, água, ácido clorídrico (pH 4,6) ou ácido fosfotúngstico (PTA), mas não nas frações preparadas com TCA, uma vez que este reagente parece interferir no desenvolvimento de cor. KUCHROO et al. (1983) observaram que o método do TNBS era reprodutível para o monitoramento da proteólise em queijos e concluíram que, embora pudesse ser aplicado para análise no queijo não fracionado, era mais sensível se aplicado nas frações de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e em TCA 12% (respectivamente as frações 2 e 4 usadas neste trabalho). POLYCHRONIADOU (1988) trabalhando com queijo não fracionado, encontrou uma boa correlação entre o método com TNBS e a relação nitrogênio solúvel em água e nitrogênio total (NSA/NT), quando determinada pelo método de Kjeldahl.

A Figura 11 mostra as curvas referentes às relações entre nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio total (NS-pH 4,6/NT) e nitrogênio não-protéico e nitrogênio total (NNP/NT), após determinação com TNBS. Os resultados indicam um aumento nestas relações em todos os ensaios realizados. Esse aumento segue a mesma tendência daquela verificada pela análise das mesmas frações pelo método de Kjeldahl (Figura 7 e Tabela 11), embora os valores obtidos com TNBS ao longo da maturação pareçam mais lógicos, refletindo melhor as complexas mudanças que ocorrem nas cadeias de proteínas durante a maturação.

A análise de regressão mostrou um maior ajuste dos resultados obtidos pela reação com TNBS ao modelo quadrático, com valores de R^2 ajustado de 0,993, 0,984, 0,992 e 0,984, respectivamente para os parâmetros NS-pH 4,6, NNP, NS-pH 4,6/NT e NNP/NT. Os resultados obtidos a partir da reação com ninidrina-cádmio se ajustaram melhor ao modelo linear, com valores de R^2 de 0,994.

Os coeficientes de correlação entre os métodos de Kjeldahl e a reação com TNBS foram de 0,985 e 0,980 para o NS-pH 4,6 e o NNP, e de 0,992 e 0,984 para as relações NS-pH 4,6/NT e NNP/NT. Isto significa que, embora existam diferenças entre os valores absolutos de nitrogênio, o aumento da proteólise ao longo da maturação dos queijos foi estimado com alto grau de associação pelos dois métodos. Esses valores são semelhantes àqueles obtidos por SILVA et al. (1995), que testaram a aplicabilidade da reação com formol, em comparação com o método Kjeldahl, para a avaliação da proteólise em diversos tipos de queijos, entre eles o Prato.

De acordo com ARDO & MEISEL (1991), a titulação com formol não é um método adequado e é considerado obsoleto, devido às dificuldades causadas pelas variações na capacidade tamponante dos queijos, que aumenta durante a maturação, devido à formação de amônia, grupamentos amínicos, imínicos e carboxílicos.

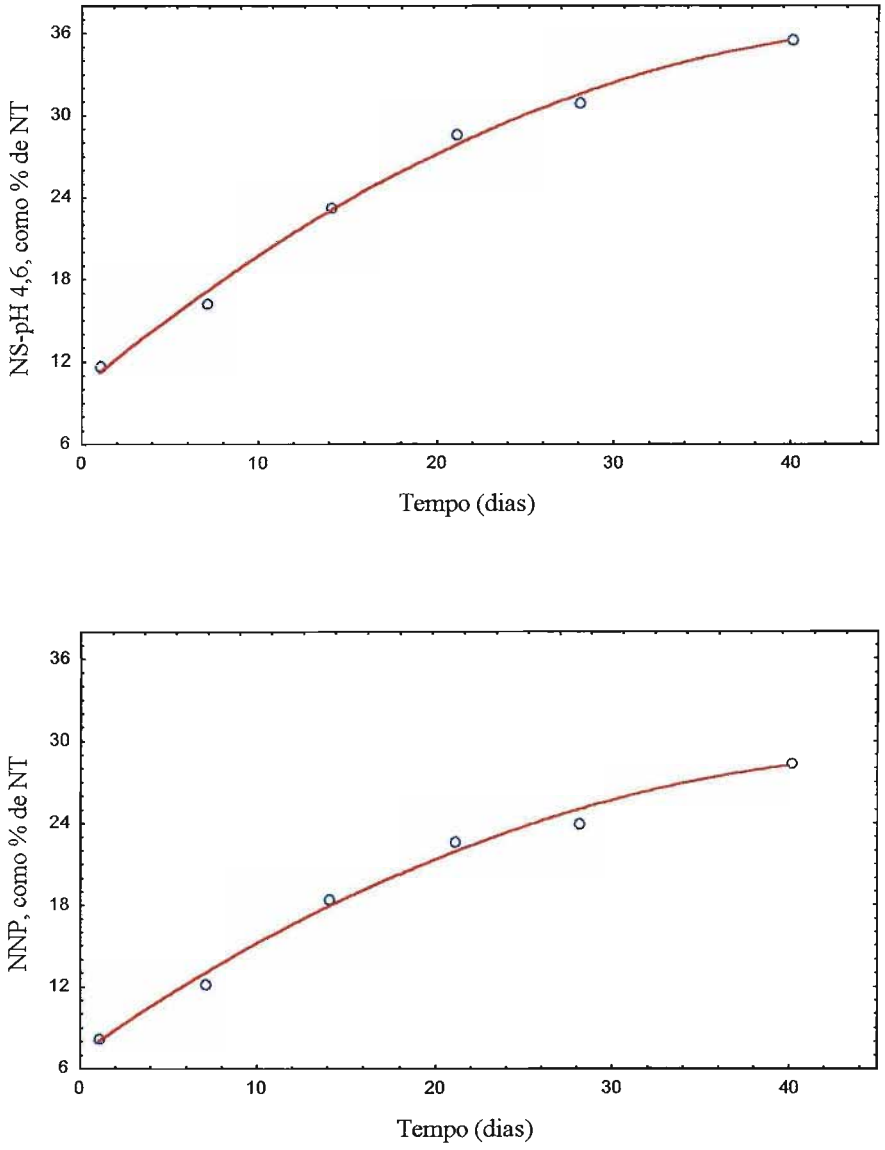


FIGURA 11. Evolução dos teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6) e em TCA 12% (NNP), como % do nitrogênio total, durante o período de maturação do queijo Prato (valores obtidos após análise com TNBS).

Alto grau de associação foi verificado em todos os métodos utilizados para a avaliação direta da proteólise, como pode ser observado na Tabela 13, que mostra os coeficientes de correlação para cada variável, numa matriz de correlação. As relações entre cada índice químico de proteólise e o tempo de maturação foram avaliadas usando-se análise de regressão e correlação através de curvas x/y. Os melhores parâmetros para uma previsão da idade proteolítica dos queijos pareceram ser as determinações do NS-pH 4,6 através da reação com ninidrina e a medida da absorbância a 274,5nm, embora excelentes correlações com o tempo de maturação tenham sido obtidas com os outros índices.

Os coeficientes de correlação mostrados na Tabela 13 foram altamente significativos, indicando que todos os métodos estudados poderiam ser considerados indicadores do grau de proteólise. Sendo assim, o grau de maturação num queijo Prato, produzido e estocado sob condições definidas e sem grandes variações, poderia ser definido pelo que poderíamos chamar "idade química" ou seja, a extensão da proteólise de acordo com índices químicos. Os dados obtidos pela análise de regressão e correlação permitem que se faça uma previsão dos valores que seriam obtidos experimentalmente em diferentes tempos de maturação. Uma estimativa desses valores pode ser observada na Tabela 14.

5.4. Métodos específicos para avaliação da proteólise

Para uma avaliação mais detalhada dos processos bioquímicos de degradação das proteínas durante a maturação de queijos, deve-se fazer, além do fracionamento das porções nitrogenadas e o monitoramento das alterações por meio de reação com reagentes colorimétricos como TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico) ou ninidrina-cádmio, determinações mais elaboradas para a caracterização dos peptídeos, como as análises por eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE), análises de peptídeos por RP-HPLC e dos aminoácidos individuais.

TABELA 13. Correlação entre os diferentes índices de proteólise.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Análise por Kjeldahl												
1 - NS-pH 4,6 (%)	-	1,000	0,986	0,989	0,985	0,992	0,982	0,993	0,970	0,990	0,916	0,962
2 - NS-pH 4,6, como % de NT	1,000	-	0,982	0,986	0,983	0,992	0,981	0,994	0,968	0,990	0,910	0,959
3 -NNP (%)	0,986	0,982	-	0,999	0,981	0,975	0,980	0,977	0,972	0,970	0,946	0,968
4 -NNP, como % de NT	0,989	0,986	0,999	-	0,988	0,986	0,983	0,984	0,980	0,977	0,952	0,977
Análise com TNBS												
5 - NS-pH 4,6 (mg leu/g)	0,985	0,983	0,981	0,988	-	0,995	0,999	0,995	0,996	0,990	0,960	0,993
6 - NS-pH 4,6, como % de NT	0,992	0,992	0,975	0,986	0,995	-	0,993	0,999	0,986	0,993	0,932	0,978
7 - NNP (mg leu/g)	0,982	0,981	0,980	0,983	0,999	0,993	-	0,995	0,996	0,990	0,959	0,993
8 - NNP, como % de NT	0,993	0,994	0,977	0,984	0,995	0,999	0,995	-	0,985	0,995	0,931	0,978
Análise com ninidrina												
9 - NS-pH 4,6 (mg leu/g)	0,970	0,968	0,972	0,980	0,996	0,986	0,996	0,985	-	0,973	0,976	0,998
10 - **Tirosina (mg/100g)**	0,990	0,990	0,970	0,977	0,990	0,993	0,990	0,995	0,973	-	0,914	0,968
11 - **Triptofano (mg/100g)**	0,916	0,910	0,946	0,952	0,960	0,932	0,959	0,931	0,976	0,914	-	0,985
12 - **Absorbância a 274,5nm**	0,962	0,959	0,968	0,977	0,993	0,978	0,993	0,978	0,998	0,968	0,985	-

TABELA 14. Valores médios obtidos nos ensaios realizados para avaliação direta da proteólise e previsão de resultados em outros tempos de maturação.

Determinações	Tempo de maturação (dias)						Previsão - Tempo de maturação (dias)				
Análise por Kjeldahl	1	7	14	21	28	40	10	20	30	35	50
NS-pH 4,6 (%)	0,24	0,32	0,39	0,44	0,46	0,50	0,35	0,43	0,48	0,49	0,48
NS-pH 4,6, como % de NT	6,84	8,97	10,92	12,40	12,78	13,89	9,77	12,03	13,37	13,68	13,24
NNP (%)	0.09	0,15	0,18	0,20	0,24	0,26	0,16	0,21	0,24	0,25	0,26
NNP, como % de NT	2,70	4,18	5,03	5,65	6,57	7,26	4,40	5,74	6,69	7,01	7,39
Análise com TNBS											
NS-pH 4,6 (mg leu/g)	1,63	2,74	4,32	5,28	5,98	7,51	3,41	5,08	6,43	6,98	8,14
NS-pH 4,6, como % de NT	11,67	16,23	23,29	28,63	30,99	35,54	19,81	27,24	32,45	34,23	36,27
NNP (mg leu/g)	1,15	2,04	3,43	4,20	4,64	6,08	2,62	3,99	5,12	5,59	6,62
NNP, como % de NT	8,17	12,20	18,43	22,71	23,91	28,40	15,17	21,38	25,70	27,16	28,70
Análise com ninidrina											
NS-pH 4,6 (mg leu/g)	1,58	2,21	2,89	3,58	3,97	5,04	2,47	3,34	4,22	4,66	5,97
Tirosina (mg/100g)	41,14	50,32	71,62	77,71	82,06	93,20	59,79	76,06	86,88	90,24	92,14
Triptofano (mg/100g)	44,89	49,27	50,15	52,06	55,12	61,61	48,84	52,77	56,71	58,68	64,58
Absorbância a 274,5nm	0,280	0,308	0,336	0,358	0,376	0,426	0,317	0,353	0,389	0,407	0,461

Sendo assim, com o objetivo de conhecer melhor os processos bioquímicos de degradação das proteínas durante a maturação de queijos, foi feito um fracionamento seqüenciado das porções nitrogenadas, partindo-se de uma extração inicial com água. Para este estudo foram utilizados dois lotes de amostras liofilizadas. A utilização de um procedimento padronizado, eficiente e seguro para extração dos compostos nitrogenados solúveis é um fator crítico nos estudos de proteólise em queijos. A preparação de um extrato solúvel em água por homogeneização do queijo e extração a 40°C, seguido de centrifugação e filtração resultou em extrações com resultados bem reprodutíveis. Para a obtenção das frações nitrogenadas solúveis em pH 4,6, os melhores resultados foram obtidos após a extração com água e ajuste do pH a 4,6, antes da centrifugação.

Os resultados da caracterização dessas amostras quanto aos níveis de nitrogênio solúvel em água (NSA) e em pH 4,6 (NS-pH 4,6), expressos como % do nitrogênio total, de grupamentos amínicos reativos com ninidrina-cádmio na fração solúvel em água e pH para os dois lotes utilizados, são apresentados na Tabela 15. Os teores de nitrogênio solúvel em água (NSA) e em pH 4,6 (NS-pH 4,6) aumentaram durante o período de maturação. Após 40 dias, 24,68% e 30,94% do nitrogênio total nos lotes I e II, respectivamente, foram solúveis em água. Para a fração solúvel em pH 4,6, estes valores foram de 15,97% e 15,47%, respectivamente para os lotes I e II, após 40 dias de maturação.

Durante a maturação, houve um aumento nos níveis de grupamentos amínicos reativos com ninidrina-cádmio (Tabela 15). Os queijos com 1 dia apresentaram valores de 1,34 e 1,14mg de leucina/g de queijo, para os lotes I e II, respectivamente; os níveis atingiram 7,33 e 7,15mg de leucina/g de queijo, respectivamente para ambos os lotes após 40 dias. Esses valores são relativamente próximos daqueles obtidos na determinação desses compostos na fração nitrogenada solúvel em pH 4,6 (Figura 10, Tabela 11), com valores de 1,58mg de leucina/g de queijo com 1 dia de maturação; aos 40 dias, esses teores foram ligeiramente menores (5,04mg de leucina/g de queijo). Isto provavelmente se deve às diferenças na solubilidade dos compostos nitrogenados em água e em pH 4,6,

formados em decorrência da proteólise. Esse comportamento pode ser comprovado pelos teores de nitrogênio solúveis em água, que foram praticamente duas vezes maiores quando comparados com aqueles solúveis em pH 4,6.

Os resultados obtidos nas determinações de pH indicam que ocorreu uma variação muito pequena durante o período de maturação para os dois lotes de queijos, próximo de 0,1 unidade (5,23 para os dois lotes com 1 dia de maturação e, 5,32 e 5,31 para os lotes I e II, respectivamente, aos 40 dias). Esta tendência de elevação dos valores de pH é de uma ordem de grandeza menor que a citada na literatura.

TABELA 15: Teores de nitrogênio solúvel em água (NSA) e em pH 4,6 (NS-pH 4,6), expressos como % do nitrogênio total, de grupamentos amínicos reativos com ninidrina-cádmio e pH, nos lotes I e II de queijo Prato durante a maturação.

Determinações	Lote	Período de maturação (dias)					
		1	7	14	21	28	40
NT (%)	I	5,62	5,70	5,62	5,63	5,45	5,51
	II	5,42	5,40	5,43	5,46	5,37	5,43
NSA, como % de NT	I	7,83	10,18	13,17	14,21	16,15	24,68
	II	10,33	12,96	18,42	20,15	21,23	30,94
NS-pH 4,6, como % de NT	I	7,83	9,82	10,39	12,08	13,21	15,97
	II	8,86	9,63	11,79	12,45	12,66	15,47
mg leucina/g queijo	I	1,34	2,24	3,48	4,32	4,86	7,33
	II	1,14	2,18	3,41	4,27	4,58	7,15
pH	I	5,23	5,27	5,28	5,30	5,32	5,32
	II	5,23	5,24	5,26	5,29	5,31	5,31

5.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE)

As dificuldades na avaliação precisa da extensão e do tipo de proteólise em queijos decorrem da complexidade do substrato e da natureza desconhecida de muitos produtos. O conhecimento das estruturas primárias da αs_1 e da β-caseínas tem permitido a localização das ligações sensíveis hidrolisadas por alguns tipos de enzimas proteolíticas. Alguns desses produtos de degradação foram intensamente estudados e suas estruturas já estão identificadas (McSWEENEY et al., 1993c; 1993d; 1994).

A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica analítica muito útil para o acompanhamento da hidrólise de ligações individuais nas moléculas de caseína, permitindo que se compreenda melhor os processos proteolíticos envolvidos na maturação. É também adequada para a comparação do perfil de hidrólise das caseínas em queijos, tendo sua maior aplicabilidade quando se utiliza diferentes coagulantes ou leites de diferentes espécies animais na fabricação de queijos (EDWARDS & KOSIKOWSKI, 1969; MARCOS et al., 1979). Esta ferramenta analítica vem sendo usada de uma forma crescente, como método de escolha para se estudar a hidrólise da caseína e o tipo de proteólise que ocorre em queijos, devido à sua alta capacidade de resolução e pelo fato de que pode fornecer resultados quantitativos. Embora a quantificação seja possível, é uma das limitações da eletroforese. A análise densitométrica somente deve ser feita entre amostras contidas no mesmo gel. Além disso, a visualização das bandas coradas é uma função da proteína e também do protocolo de coloração e de descoloração.

A proteólise primária é medida pelo aparecimento das frações αs_1-I e γ-caseínas, em decorrência da hidrólise da αs_1- e β-caseínas, respectivamente. A cadeia de αs_1-caseína tem muitas regiões susceptíveis à ação da quimosina. A mais sensível é a ligação entre os resíduos 23:24 ou 24:25 (CREAMER & RICHARDSON, 1974). Sua hidrólise leva à formação de um peptídeo básico contendo 23 ou 24 resíduos de aminoácidos e um polipeptídeo de alto peso molecular, a αs_1-I (f24-199). Esse polipeptídeo tem caráter mais acídico que a αs_1-caseína e mobilidade eletroforética ligeiramente maior. A αs_1-I caseína é

relativamente resistente à hidrólise posterior, e por essa razão, aparece em grandes quantidades na maioria dos queijos.

Na região da β-caseína há uma banda central entre duas bandas menores, geralmente mascaradas pela maior. A banda menor com velocidade de migração ligeiramente maior, provavelmente representa a fração β-I (CREAMER & MILLS, 1971). A quimosina tem uma ação limitada sobre a β-caseína, formando três peptídeos a partir da região N-terminal, denominados β-I, β-II e β-III, classificados em ordem de formação e de mobilidade eletroforética crescente. Elas se movem mais rapidamente que a β-caseína porque suas seqüências N-terminais são mais acídicas que os peptídeos apolares liberados da porção C-terminal (GRAPPIN et al. 1985; KAMALY & MARTH, 1989). É improvável que o aumento da fração γ-caseína derivada da β seja devido à ação da quimosina, porque a β-caseína no queijo é resistente ao ataque da quimosina e em soluções diluídas dá origem a peptídeos com mobilidade eletroforética maior (CREAMER, 1975).

O perfil eletroforético dos queijos e das frações insolúveis em água, nos lotes I e II, nos vários estágios de maturação, é mostrado nas Figuras 12 e 13, respectivamente. Amostras de queijo Cheddar e Gouda foram incluídas para comparação. O perfil de separação obtido pode ser dividido em várias regiões: componentes que se movem mais rapidamente ou seja, a αs_1-caseína, a β-caseína e os componentes de baixa mobilidade (γ_3, γ_1 e γ_2).

Os resultados mostram que a fração αs_1-caseína foi clivada gradualmente formando αs_1-I caseína (f24-199). Analisando-se os perfis eletroforéticos, observa-se um aumento no desdobramento desta fração durante o período de maturação, evidenciado pela maior intensidade da banda correspondente à αs_1-I caseína. Quando comparado com Gouda e Cheddar, o Prato mostrou diferenças quantitativas e qualitativas, sendo que a mais notável foi a ausência da fração de caseína αs_1-f102-199. Esta fração é produzida pela ação do coalho sobre a αs_1-I caseína (f24-199). Sua ausência ocorre normalmente em

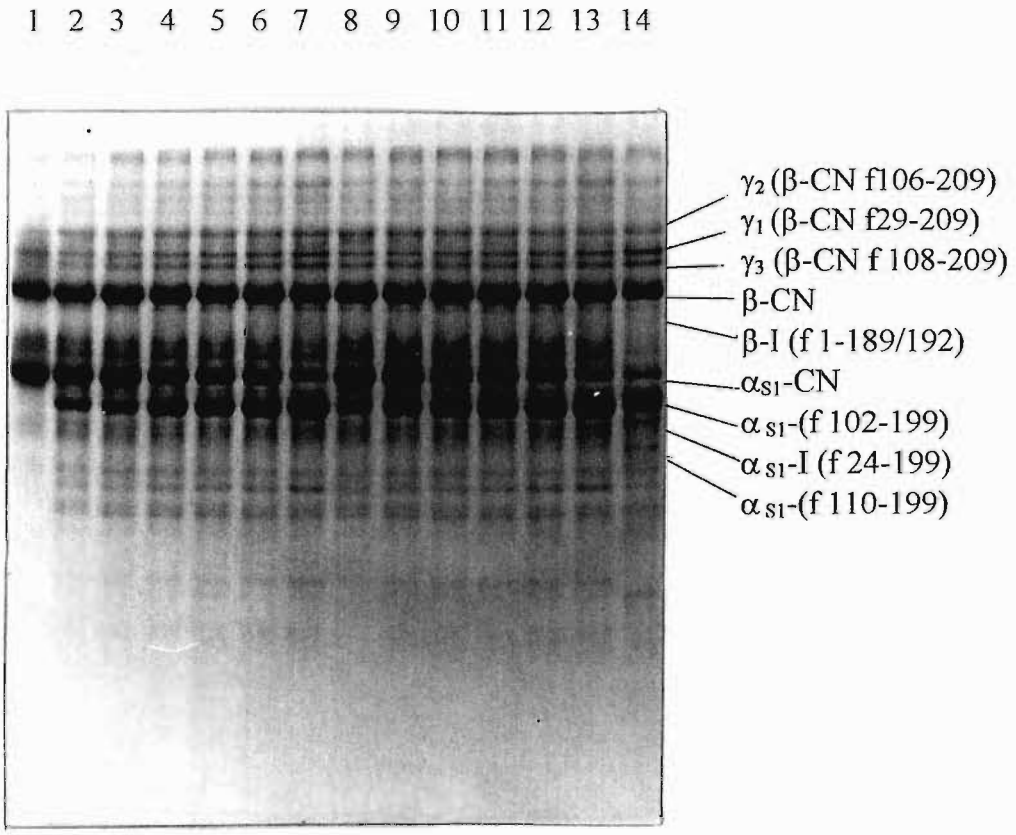


FIGURA 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) do queijo tipo Prato. Linha 1: Caseinato de sódio; linhas 2 a 7, amostras com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (lote I); linhas 8 a 13 (lote II) no mesmo período; linha 14, queijo Cheddar (8 meses).

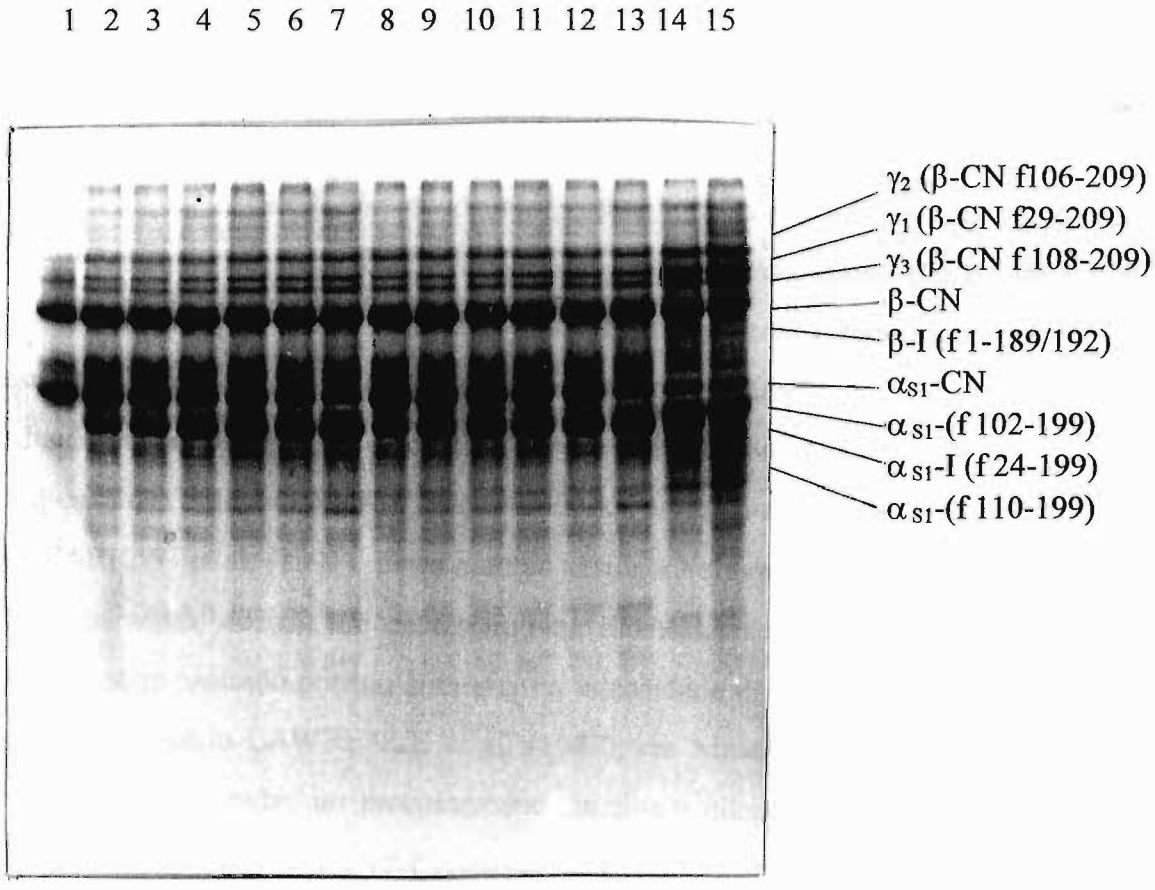


FIGURA 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) da fração insolúvel em água, do queijo tipo Prato. Linha 1: Caseinato de sódio; linhas 2 a 7 (lote I); linhas 8 a 13 (lote II) com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação; linha 14: Gouda; linha 15, Cheddar.

queijos submetidos a altas temperaturas de cozimento (55°C) durante a fabricação, reduzindo assim, a atividade da quimosina. No caso do queijo Prato, uma explicação provável para esta ausência poderia ser o tipo de coalho utilizado , que é uma mistura contendo maior proporção de pepsina bovina (20% de quimosina e 80% de pepsina bovina). A ausência deste peptídeo também pode indicar a ocorrência de uma proteólise limitada. O perfil eletroforético foi semelhante nos dois lotes de queijo Prato analisados.

A hidrólise da β-caseína é atribuída, em parte, à ação da plasmina, que causa uma hidrólise significativa desta fração, produzindo γ-caseínas e proteose-peptonas (GRAPPIN et al., 1985). Sua atividade é percebida pelas mudanças nas concentrações de β- e γ-caseínas, e parece estar relacionada com o pH do queijo (CREAMER, 1975). Níveis maiores de γ-caseínas são observados em queijos com valores mais altos de pH. Os resultados da eletroforese mostram o aparecimento de bandas de γ_3, γ_1 e γ_2, já visíveis com 1 dia de maturação, evidenciando uma possível ação da plasmina, atuando na degradação da β-caseína (Figuras 12 e 13). Estes resultados estão de acordo com aqueles observados por FARKYE et al. (1991). Estes autores verificaram que na Mussarela com 14 dias de armazenamento, ocorria um decréscimo na intensidade da banda correspondente à β-caseína, acompanhado por um aumento na intensidade das bandas correspondentes às γ-caseínas. Segundo LAWRENCE et al. (1987), em Mussarela e queijos suiços, as altas temperaturas utilizadas no processamento inativam quase que totalmente a quimosina presente; entretanto, a plasmina é relativamente resistente ao calor e a hidrólise da caseína nestes queijos parece estar associada principalmente à atividade de plasmina.

CREAMER (1976) estudou a proteólise em queijos como Mussarela, Gouda e Cheddar por eletroforese e pela solubilidade das frações nitrogenadas em TCA 12% e em pH 4,5. Após 12 semanas de estocagem, foi encontrada mais αs_1- caseína na Mussarela que em Gouda e Cheddar, mas os níveis de αs_1-I e γ-caseínas foram intermediários entre Cheddar e Gouda. Além disso, os níveis de nitrogênio solúvel em TCA 12% e em pH 4,5 foram menores em Mussarela, indicando um baixo nível de proteólise.

McSWEENEY et al. (1994) isolaram os peptídeos da fração insolúvel em água de queijo Cheddar usando Uréia-PAGE, seguida de separação por "eletroblotting", e fizeram uma caracterização parcial de suas estruturas primárias. Os resultados permitiram a identificação da maioria das bandas detectáveis por Uréia-PAGE em amostras de queijo Cheddar com 3 meses de maturação. Por comparação desses resultados com os das Figuras 12 e 13, foi possível identificar as caseínas intactas e os produtos primários da ação da quimosina sobre a αs_1- caseína (αs_1-I f24-199) e da plasmina na β-caseína (γ_1, γ_2 e γ_3-caseínas). O grupo de 3 peptídeos com mobilidades de 13,5 a 20,0 mm correspondem à fração γ-caseína (fragmentos da β-caseína: 29-209, 106-209 e 108-209). A identidade destas bandas é bem reconhecida, mas a ordem em que elas migram (γ_3, γ_1 e γ_2) tem sido interpretada erroneamente.

FERNANDEZ del POZO et al. (1988) observaram uma proteólise extensiva durante a maturação do queijo La Serena, de origem espanhola, fabricado com leite de ovelha cru e coagulado com coalho vegetal. A degradação αs_1-caseína ocorreu em velocidade maior que a β-caseína. Em queijos com 15 dias de maturação, apenas 38,93% da αs_1-caseína permanecia, enquanto 70,95% de β-caseína ainda era detectada. As diferenças na extensão da hidrólise da αs_1 e β-caseínas persistiram até o final da maturação.

Os perfis eletroforéticos das frações insolúveis em etanol 70%, que contém peptídeos de tamanho médio, apresentados na Figura 14, mostram diferenças qualitativas daqueles obtidos para os queijos Gouda e Cheddar, que foram incluídos no mesmo gel para permitir a comparação. As diferenças observadas foram semelhantes àquelas da fração insolúvel em água. No início há uma menor concentração de peptídeos insolúveis em etanol 70%, devido ao menor tempo de maturação.

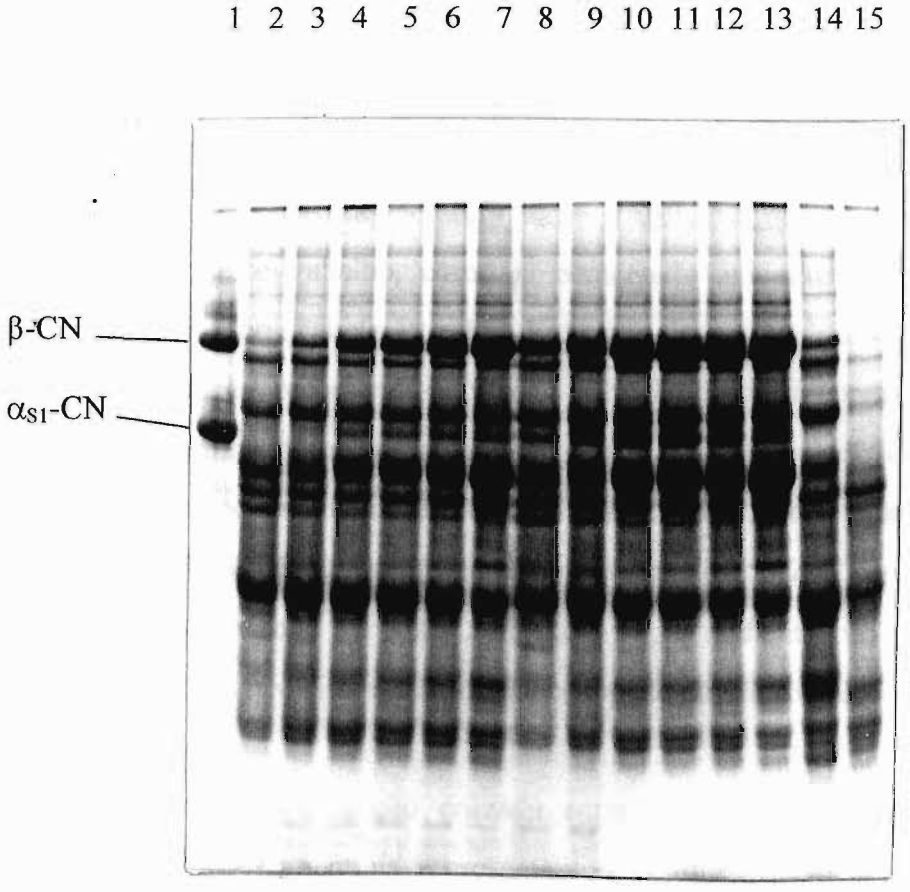


FIGURA 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) da fração insolúvel em etanol 70%, do queijo tipo Prato. Linha 1: Caseinato de sódio; linhas 2 a 7 (lote I); linhas 8 a 13 (lote II) com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação; linha 14: Gouda; linha 15, Cheddar.

A análise eletroforética das frações solúveis em água do queijo Prato durante o período de maturação, é apresentada na Figura 15; uma amostra de queijo Cheddar foi incluída para comparação. Pelo perfil de separação, nota-se diferenças qualitativas e quantitativas quando comparadas com a amostra de queijo Cheddar. Observa-se uma quebra progressiva da β-caseína com um aumento na concentração de γ-caseínas. Entretanto, não se verificou um decréscimo nos níveis de β-caseína, provavelmente devido a um aumento do pH do queijo durante a maturação, produzindo β-caseína como uma fração insolúvel.

Embora haja referências na literatura sobre o aumento do pH do queijo Prato durante a maturação, neste trabalho, como já comentado anteriormente, observou-se apenas um ligeiro acréscimo (Tabela 10 e 15). Em casos de queijos que sofrem aumento de pH durante a maturação, recomenda-se fazer a extração das substâncias nitrogenadas em pH 4,6, o que permite o melhor acompanhamento e compreensão das alterações durante a maturação, especialmente na análise por eletroforese. O perfil eletroforético das frações solúveis em pH 4,6 foram muito semelhantes àqueles obtidos com as amostras extraídas em água. Como pode ser visto na Figura 16, o aumento nas γ-caseínas foi acompanhado da concomitante diminuição da concentração da fração β-caseína.

Para facilitar uma comparação cruzada entre variedades, foi feita a análise eletroforética de amostras comerciais representativas de queijos Cheddar (Cheddar, Chesire, Red Leicester, Double Gloucester), Edam, Gouda (Pikantje Gouda, Novergia), suíços (Emmental, Leerdammer, Jarlsberg, Vorarlberger-Bergkase) e Parmesão (18 meses), juntamente com o queijo Prato (40 dias), usando-se para isto, as frações insolúveis em água e em etanol. Como esperado para um grupo heterogêneo de queijos, as diferenças foram marcantes tanto na extensão da maturação dos queijos como nas proporções das principais caseínas e de seus produtos de degradação. No entanto, houve um perfil eletroforético básico comum para a maioria dos queijos, seja no número ou na mobilidade relativa dos principais componentes.

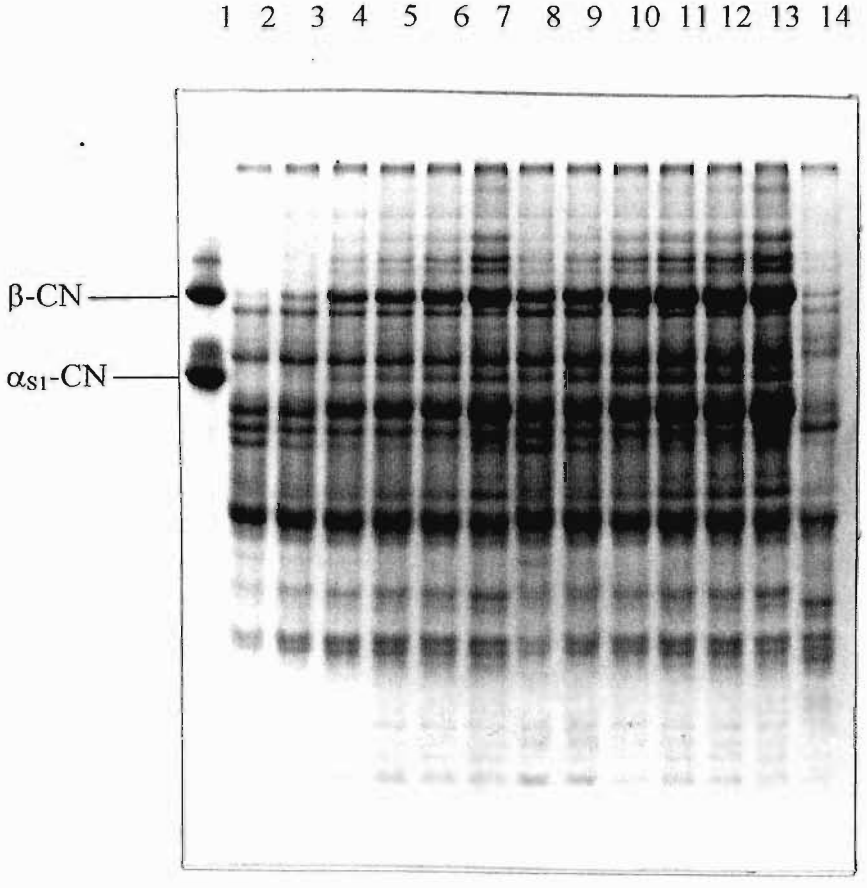


FIGURA 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) da fração solúvel em água, do queijo Prato. Linha 1: Caseinato de sódio; linhas 2 a 7, amostras com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (lote I); linhas 8 a 13 (lote II), no mesmo período; linha 14, queijo Cheddar (8 meses).

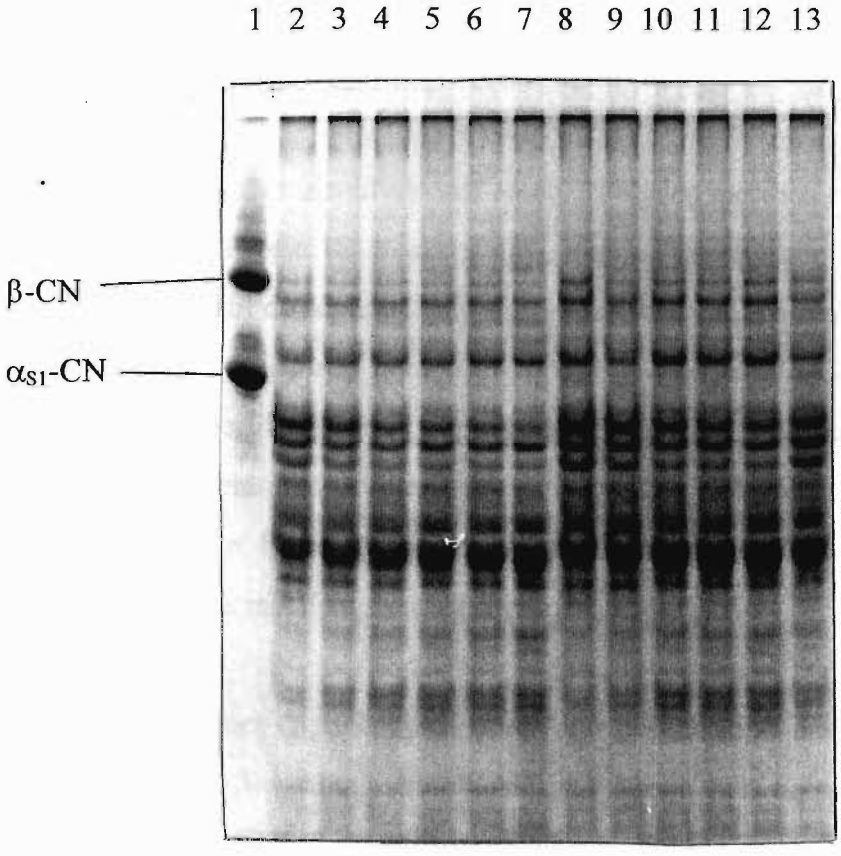


FIGURA 16: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) da fração solúvel em pH 4,6, do queijo tipo Prato. Linha 1: Caseinato de sódio; linhas 2 a 7, amostras com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (lote I); linhas 8 a 13 (lote II) no mesmo período.

Na Figura 17 são mostrados os perfis de separação obtidos por Uréia-PAGE das frações insolúveis em água. O queijo Prato (linha 2) foi bem diferente em termos de proteólise primária dos outros tipos estudados, com exceção do queijo tipo Gouda (Novergia), apresentado na linha 3. A diferença mais marcante foi a ausência da fração de caseína αs_1 f102-199 no queijo Prato, Emmental (linha 11) e Parmesão (linha 15). A ausência desta fração nos queijos Emmental e Parmesão pode ser atribuída à redução na atividade de quimosina devido às altas temperaturas de cozimento usadas durante a fabricação.

A eletroforese das frações insolúveis em etanol 70% dos mesmos queijos de cada variedade, são mostrados na Figura 18. Novamente, o queijo Prato foi muito diferente dos outros tipos estudados. O perfil de separação do queijo Jarlsberg, que é classificado como tipo suíço, mas é fabricado de acordo com o protocolo de queijo tipo Gouda, mostrou maior semelhança com o perfil de queijo tipo holandês que do tipo suíço. O queijo Jarlsberg é cozido em temperaturas de cerca de 36°C durante a fabricação, comparado com os 54°C usados para o Emmental. Esta semelhança também foi observada na separação feita com as frações insolúveis em água.

Os queijos Leerdammer (tipo holandês) e Vorarlberger (tipo suíço) mostraram perfis de hidrólise da αs_1 e β-caseínas semelhantes. O queijo tipo holandês Novergia (linha 3) apresentou um perfil de separação semelhante àquele do queijo tipo suíço Jarlsberg. A amostra de Parmesão mostrou uma hidrólise muito limitada da αs_1-caseína e um acúmulo de γ-caseínas. Este padrão de proteólise sugere alta atividade de plasmina e baixa de quimosina, devido à temperatura de cozimento de cerca de 55°C usada na fabricação. Essa mesma tendência foi observada nas frações insolúveis em água e em etanol 70%. A eletroforese mostrou apenas alguns peptídeos presentes em baixa concentração na fração insolúvel em etanol do queijo Parmesão (Figura 18, linha 15), sugerindo uma proteólise extensiva. Uma comparação mais detalhada do perfil de hidrólise de cada queijo torna-se difícil, devido às diferenças no processo de fabricação e também no tempo de maturação de cada um deles.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

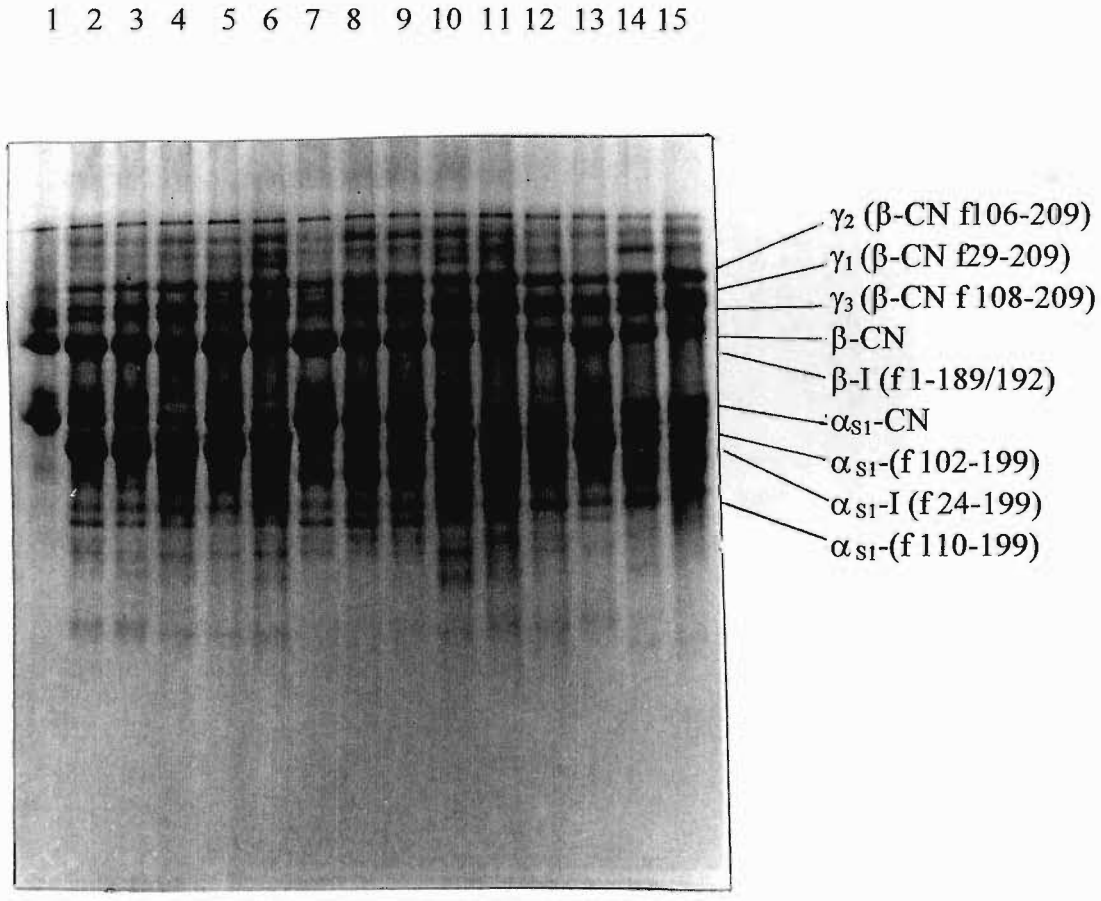


FIGURA 17: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) da fração insolúvel em água, de algumas variedades de queijos. Linha 1: Caseinato de sódio; linha 2: Prato (40 dias); linha 3: Novergia; linha 4: Pikantje Gouda; linha 5: Edam; linha 6: Cheddar; linha 7: Chesire; linha 8: Leicester; linha 9: Double Gloucester; linha 10: Cheddar (12 meses); linha 11: Emmental; linha 12: Leerdammer; linha 13: Jarlsberg; linha 14: Vorarlberger Bergkase; linha 15: Parmesão (18 meses).

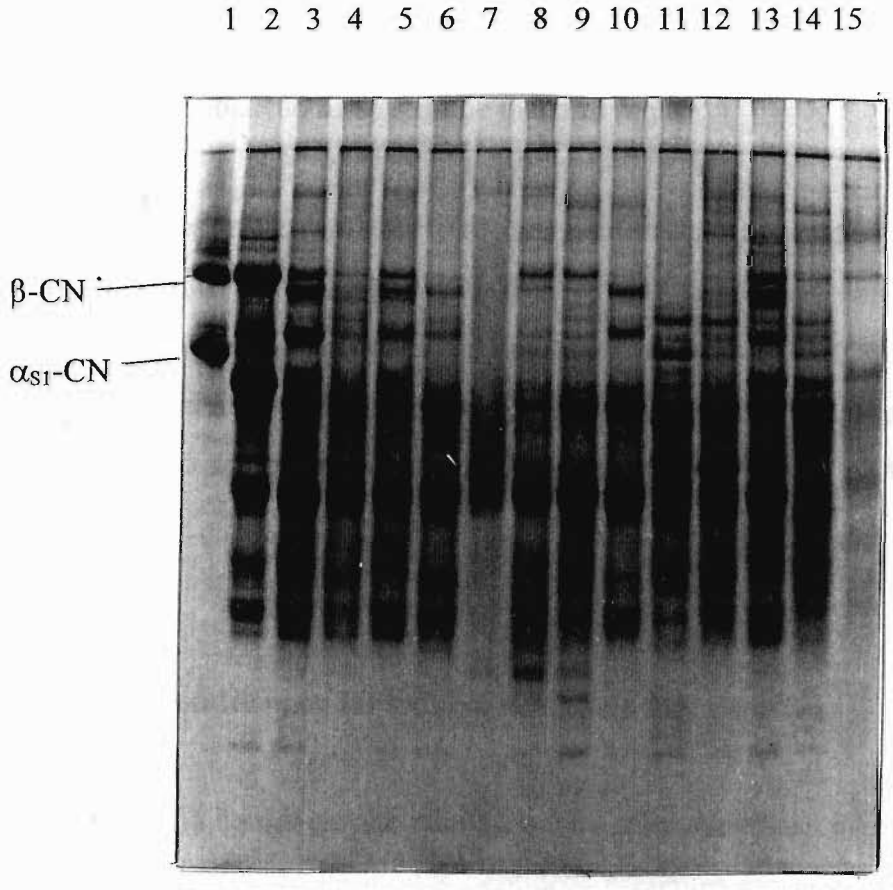


FIGURA 18: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) da fração insolúvel em etanol 70%, de algumas variedades de queijos. Linha 1: Caseinato de sódio; linha 2: Prato; linha 3: Novergia; linha 4: Pikantje Gouda; linha 5: Edam; linha 6: Cheddar; linha 7: Chesire; linha 8: Leicester; linha 9: Double Gloucester; linha 10: Cheddar (12 meses); linha 11: Emmental; linha 12: Leerdammer; linha 13: Jarlsberg; linha 14: Vorarlberger Bergkase; linha 15: Parmesão (18 meses).

A complexidade do perfil eletroforético das amostras estudadas e os recursos disponíveis, não permitiram a quantificação das bandas equivalentes aos principais produtos de degradação das caseínas. Durante as leituras densitométricas realizadas em densitômetro a laser (UltroScan XL, Pharmacia), fatores como o grande número de frações e o mascaramento de algumas bandas presentes em menores quantidades por outras mais concentradas, deram origem a traçados sem uma definição precisa dos picos, impedindo que a quantificação fosse feita de maneira segura.

Alguns autores utilizaram este tipo de quantificação agrupando as bandas por regiões, o que leva a uma interpretação errônea dos resultados, tendo em vista a quantificação de algumas bandas dentro de uma mesma fração (MARCOS et al., 1979). Em outros casos, as amostras analisadas possuiam um perfil de separação menos complexo, oferecendo maior segurança na interpretação dos dados (FARKYE et al., 1991).

5.4.2. Análise de peptídeos por HPLC, em coluna de fase reversa

A cromatografia líquida de alta eficiência com colunas de fase reversa (RP-HPLC) é um método útil na resolução de muitos peptídeos presentes em queijos. Em geral, os peptídeos menores e mais hidrofílicos e os aminoácidos são eluídos primeiro, enquanto os peptídeos maiores e mais hidrofóbicos são eluídos no final da separação (CLIFFE et al., 1993). Esta técnica tem sido aplicada com sucesso em estudos de proteólise das frações αs_1 e β-caseínas durante a maturação de queijos.

Os perfis cromatográficos das frações solúveis em água, mostrados nas Figuras 19 e 20, foram qualitativamente semelhantes nos dois lotes de queijo Prato. A análise destas frações revelou diferenças entre os queijos durante o período de maturação. Foram observados em torno de 76 picos nas amostras iniciais, aumentando para cerca de 86 no final do período. Para facilitar a comparação entre as amostras, as áreas dos picos mais

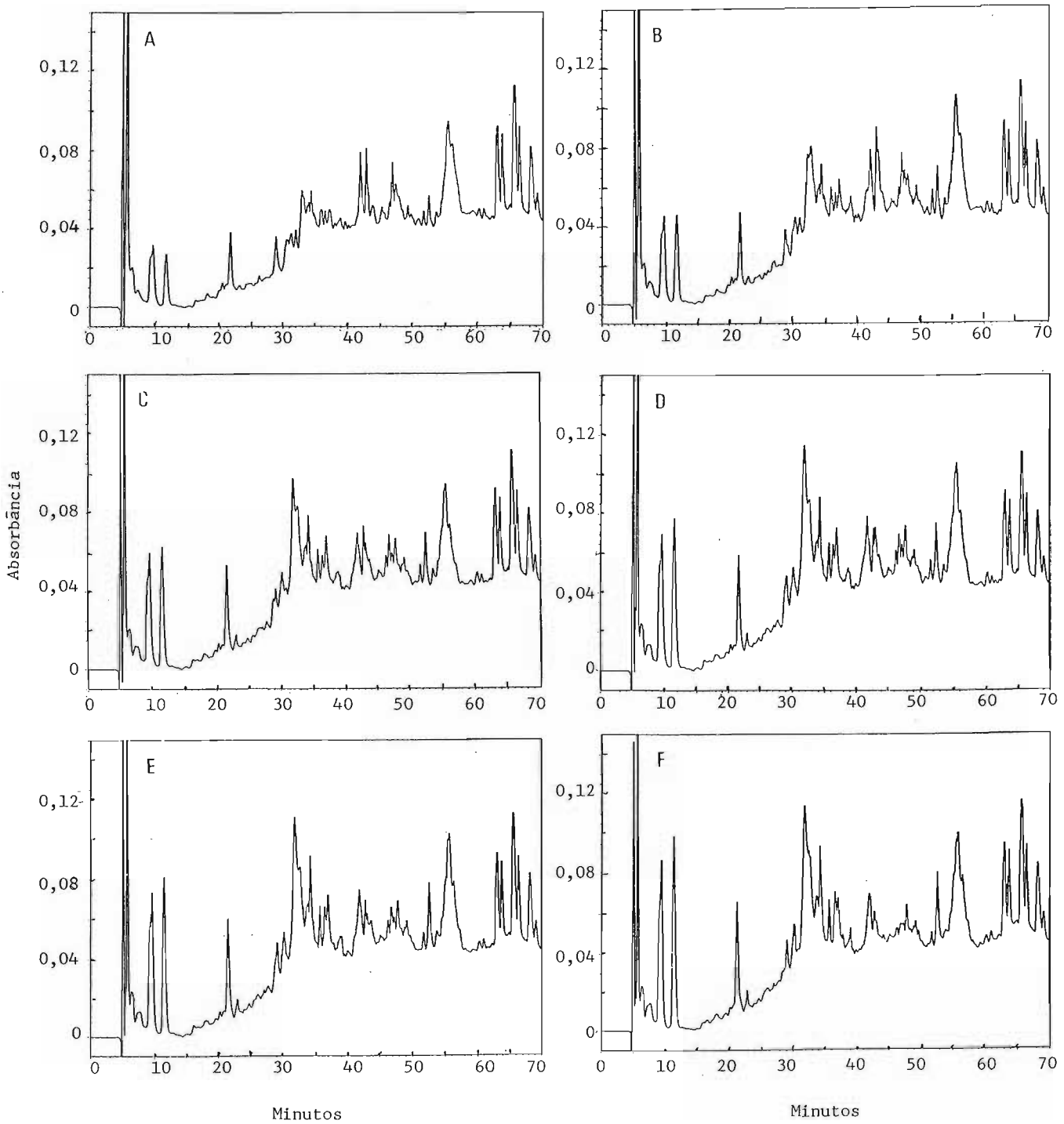


FIGURA 19:. Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC, das frações solúveis em água do queijo Prato (lote I), com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (cromatogramas A a F, respectivamente).

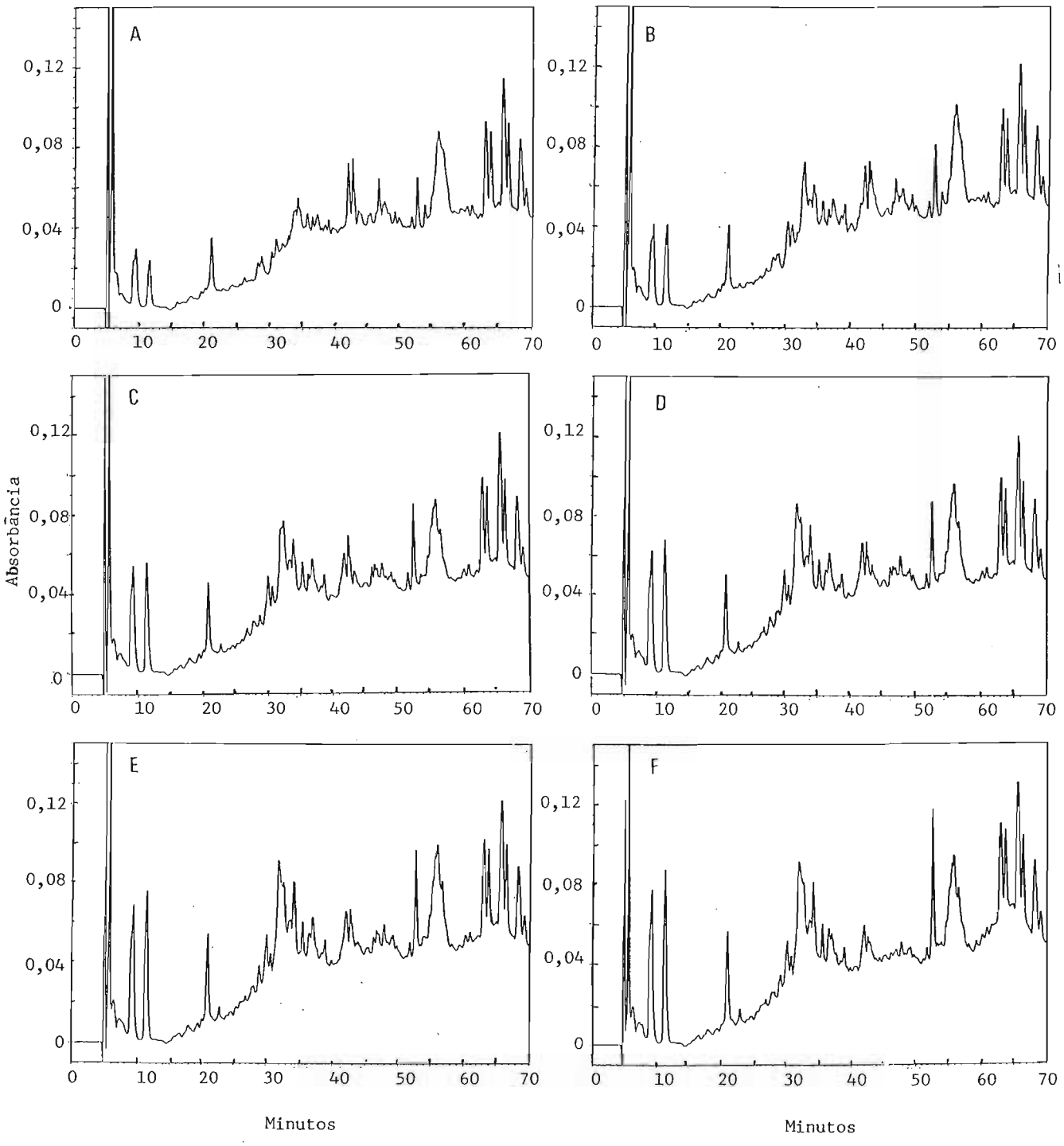


FIGURA 20:. Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC, das frações solúveis em água do queijo Prato (lote II), com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (cromatogramas A a F, respectivamente).

representativos, agrupados por faixas de tempos de retenção, foram calculadas e são apresentadas na Figura 21. As seguintes regiões foram estabelecidas: 1 (tempo de retenção entre 9 e 10 minutos), 2 (11-12 minutos), 3 (20-25 minutos), 4 (25-31 minutos), 5 (31-35 minutos), 6 (35-50 minutos), 7 (50-60 minutos) e 8 (60-69 minutos).

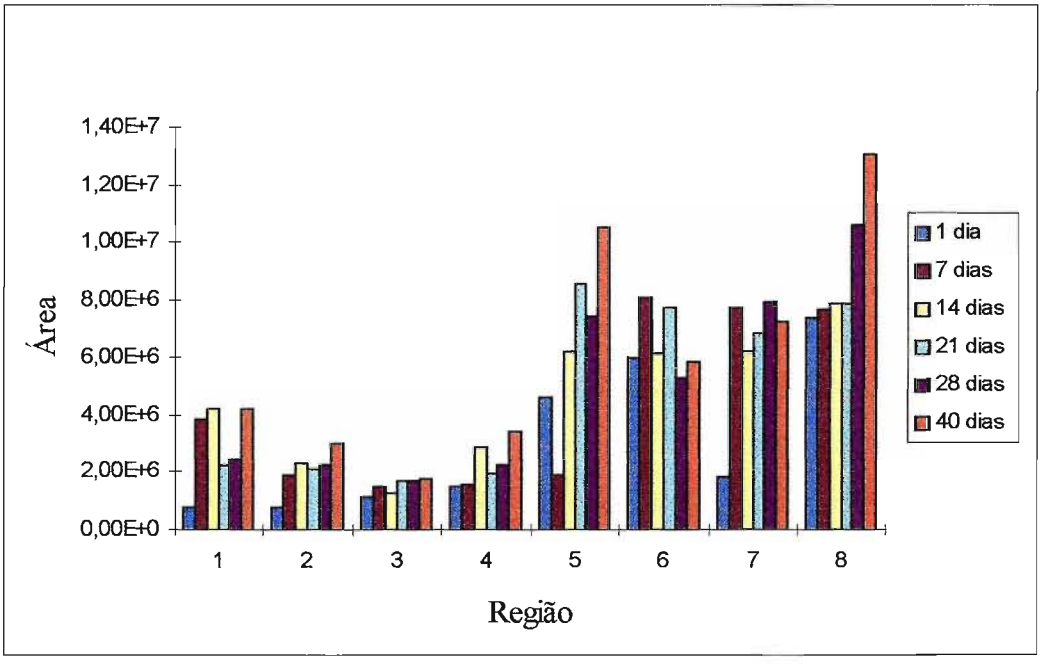


FIGURA 21. Histograma das áreas dos picos correspondentes às diversas regiões, dos cromatogramas das frações solúveis em água, obtidos por RP-HPLC. Os tempos de retenção de cada região são: 1 (9 e 10 minutos), 2 (11-12 minutos), 3 (20-25 minutos), 4 (25-31 minutos), 5 (31-35 minutos), 6 (35-50 minutos), 7 (50-60 minutos) e 8 (60-69 minutos).

Observando-se as Figuras 19 a 21, verifica-se que o queijo Prato mostrou concentrações relativamente baixas de peptídeos hidrofílicos, ou seja, aqueles picos eluídos no início da separação, com um tempo de retenção até cerca de 20 minutos (regiões 1 a 3). Alguns peptídeos hidrofóbicos eluídos ao redor de 55 minutos, foram evidentes em todas as amostras. As maiores variações durante o período de maturação ocorreram nos peptídeos eluídos com um tempo ao redor de 35 minutos (regiões 5 e 6).

Nas regiões 7 e 8, representadas por peptídeos com tempos de retenção entre 50 e 69 minutos, houve uma grande diferença entre as amostras, especialmente no final do período de maturação. Como os peptídeos eluídos nessa faixa são hidrofóbicos, estes resultados sugerem a possibilidade dos queijos no final da maturação apresentarem maiores concentrações de peptídeos amargos que no início, embora estes picos já estivessem presentes em concentrações significativas nas amostras com 1 dia.

Os cromatogramas das frações solúveis e insolúveis em etanol 70% para os dois lotes de queijo Prato, contendo respectivamente peptídeos pequenos/aminoácidos livres e proteínas e peptídeos maiores e de tamanho médio, são apresentados nas Figuras 22 a 25, mostrando diferenças qualitativas e quantitativas no decorrer da maturação. O perfil de separação das frações solúveis em etanol foi próximo daquele obtido com os extratos solúveis em água. As áreas dos picos mais representativos, agrupados por faixas de tempos de retenção, são apresentadas na Figura 26. As seguintes regiões foram estabelecidas: 1 (tempo de retenção entre 9 e 10 minutos), 2 (11-12 minutos), 3 (20-25 minutos), 4 (25-31 minutos), 5 (31-33 minutos), 6 (33-40 minutos), 7 (40-45 minutos), 8 (45-55 minutos), 9 (55-60 minutos) e 10 (61-69 minutos). Comparando-se as áreas e os cromatogramas das frações solúveis em etanol com aquelas apresentadas nas Figuras 19 a 21, verifica-se apenas diferenças quantitativas, evidenciando uma maior seletividade na extração de peptídeos com etanol 70%. Novamente, as maiores variações ocorreram num tempo de eluição ao redor de 30 a 40 minutos (regiões 5 e 6).

As áreas dos picos das frações insolúveis em etanol 70%, foram agrupadas em 11 regiões, de acordo com as seguintes faixas de tempo de retenção: 1 (9 e 10 minutos), 2 (11-12 minutos), 3 (20-25 minutos), 4 (25-30 minutos), 5 (31-33 minutos), 6 (34-40 minutos), 7 (40-44 minutos), 8 (45-50 minutos), 9 (51-54 minutos), 10 (55-60) e 11 (61-69 minutos); os valores são apresentados na Figura 27.

De maneira geral, os cromatogramas das frações insolúveis em etanol 70%, apresentaram concentrações muito baixas de peptídeos, durante todo o período de

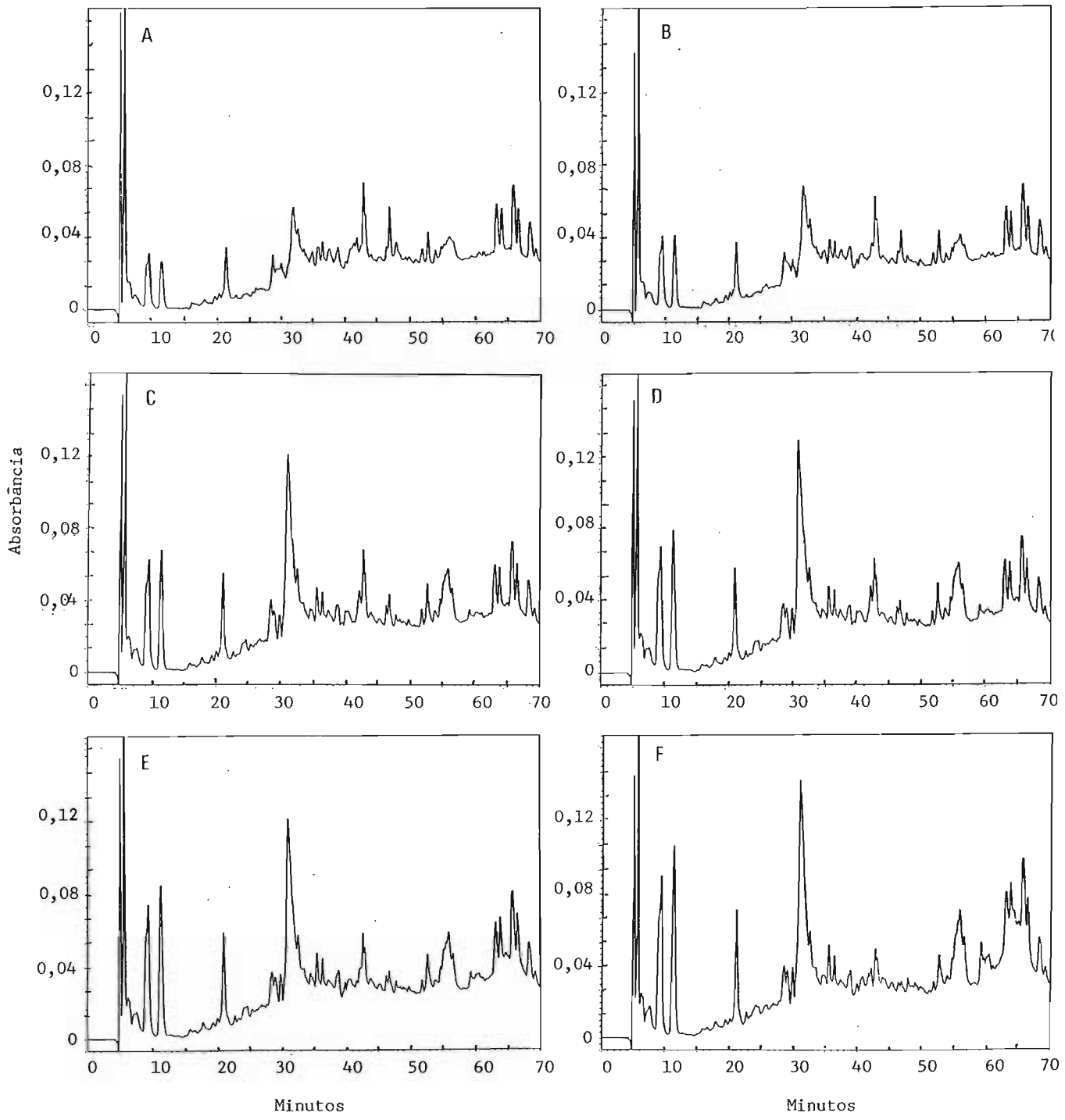


FIGURA 22:. Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC, das frações solúveis em etanol 70% do queijo Prato (lote I), com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (cromatogramas A a F, respectivamente).

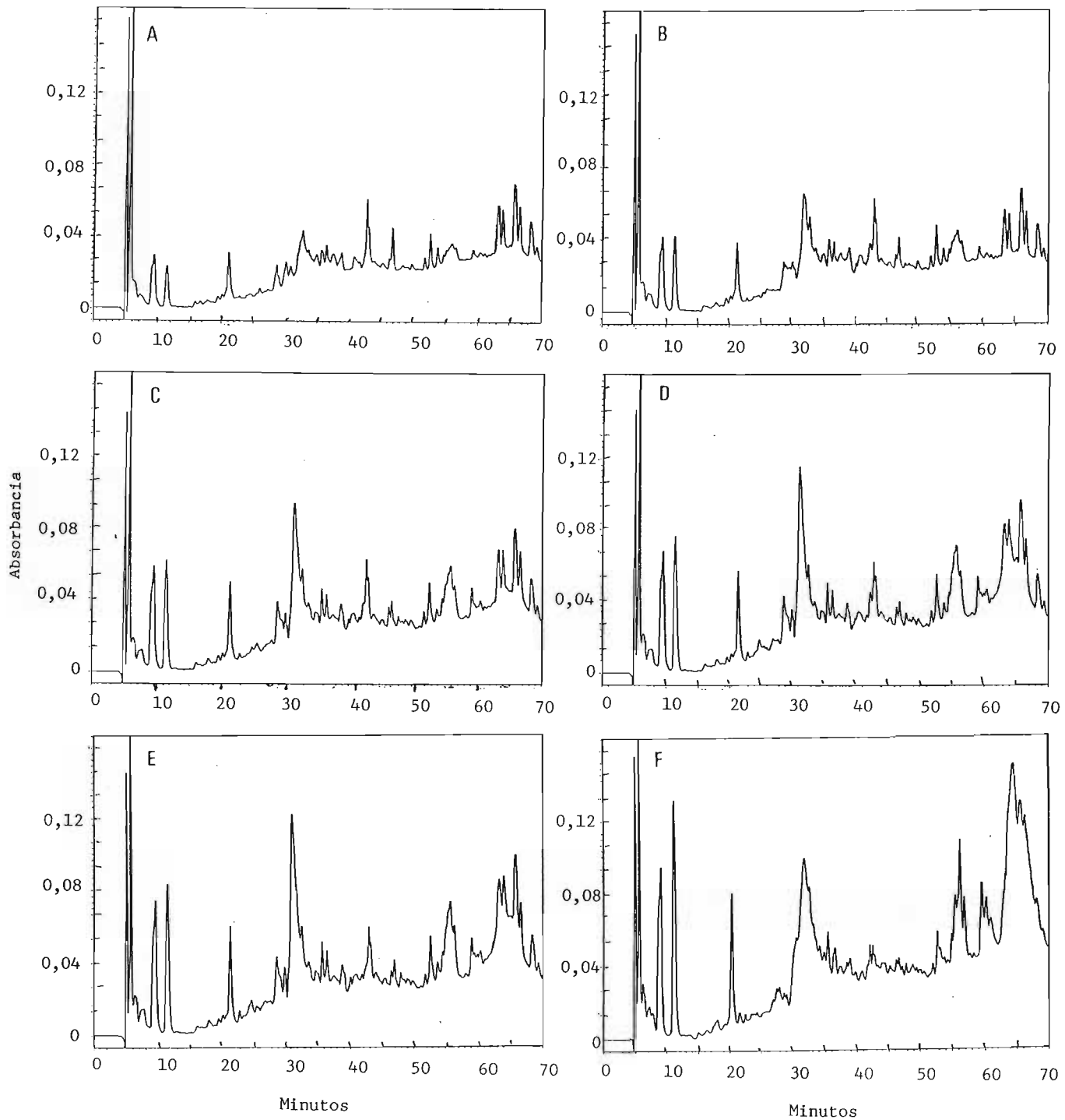


FIGURA 23:. Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC, das frações solúveis em etanol 70% do queijo Prato (lote II), com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (cromatogramas A a F, respectivamente).

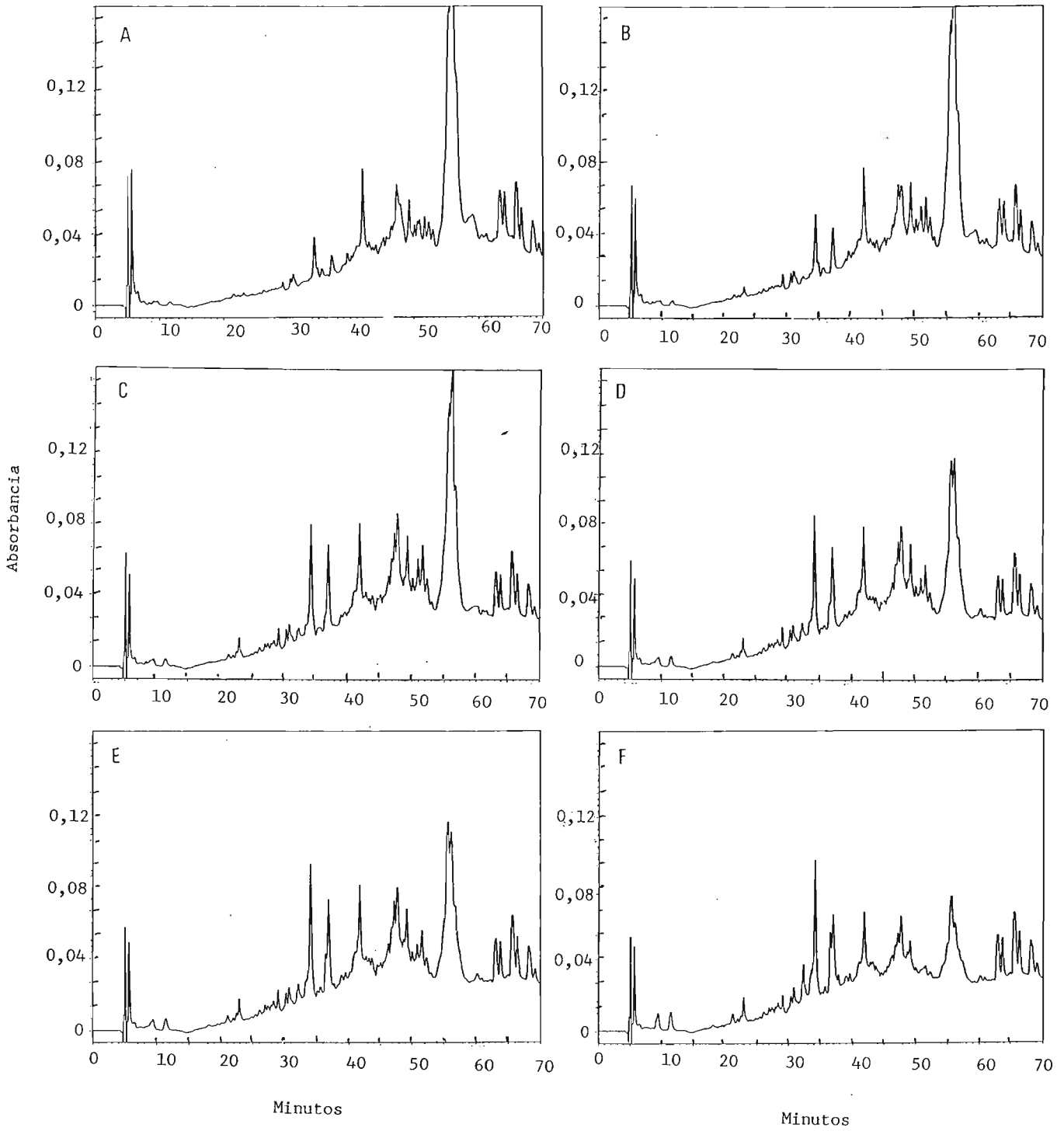


FIGURA 24:. Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC, das frações insolúveis em etanol 70% do queijo Prato (lote I), com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (cromatogramas A a F, respectivamente).

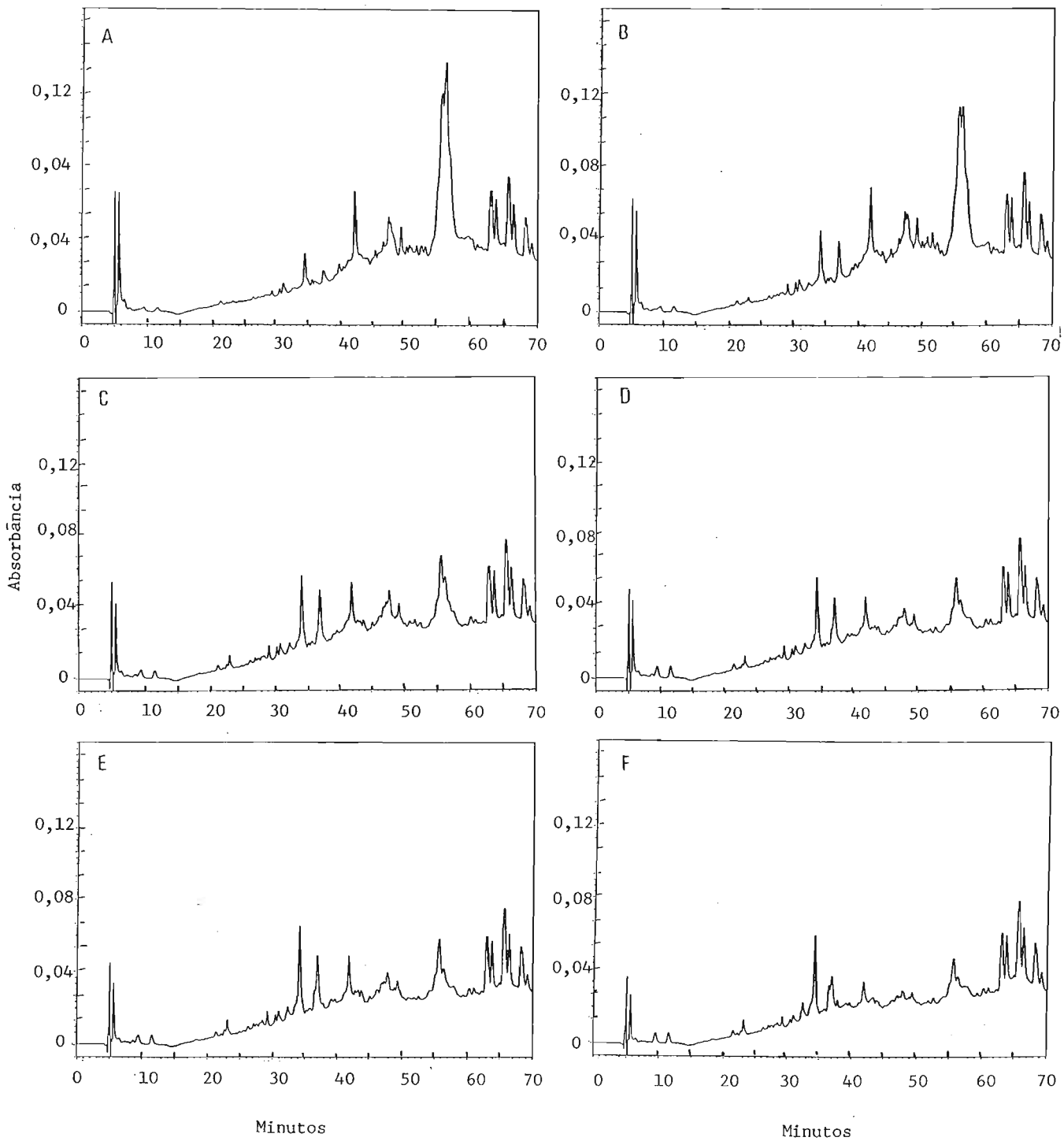


FIGURA 25:. Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC, das frações insolúveis em etanol 70% do queijo Prato (lote II), com 1, 7, 14, 21, 28 e 40 dias de maturação (cromatogramas A a F, respectivamente).

maturação, especialmente nas regiões de tempo de retenção até cerca de 33 minutos (regiões 1 a 5) e em torno de 51-54 minutos (região 9). Um pico eluído em torno de 55 minutos (região 10), estava presente em altas concentrações no início, diminuindo significativamente no decorrer da maturação. Estas frações insolúveis em etanol 70% apresentaram também aumentos consideráveis nas concentrações de dois peptídeos eluídos na região de 32-38 minutos (Figuras 24 e 25). Comparando-se os histogramas apresentados nas Figuras 21, 26 e 27, verifica-se que as frações solúveis e insolúveis em etanol 70% representam uma somatória dos peptídeos presentes na fração solúvel em água. Sendo assim, sua utilização forneceria mais informações a respeito dos peptídeos formados durante a proteólise.

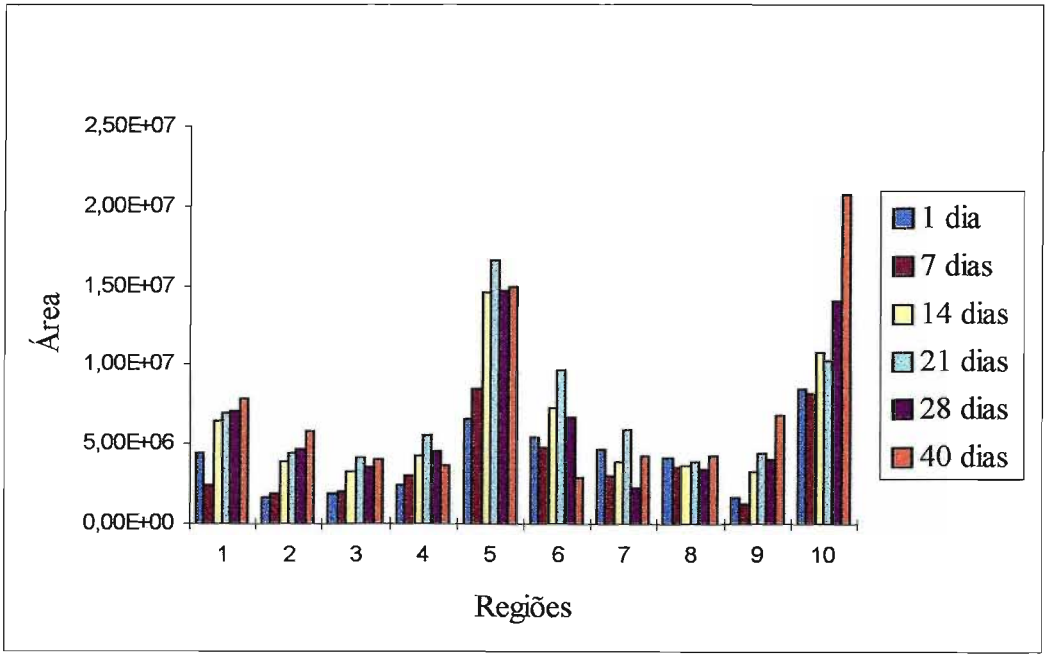


FIGURA 26. Histograma das áreas dos picos correspondentes às diversas regiões, dos cromatogramas das frações solúveis em etanol 70%, obtidos por RP-HPLC. Os tempos de retenção de cada região são: 1 (9 e 10 minutos), 2 (11-12 minutos), 3 (20-25 minutos), 4 (25-31 minutos), 5 (31-33 minutos), 6 (33-40 minutos), 7 (40-45 minutos), 8 (45-55 minutos), 9 (55-60 minutos) e 10 (61-69 minutos).

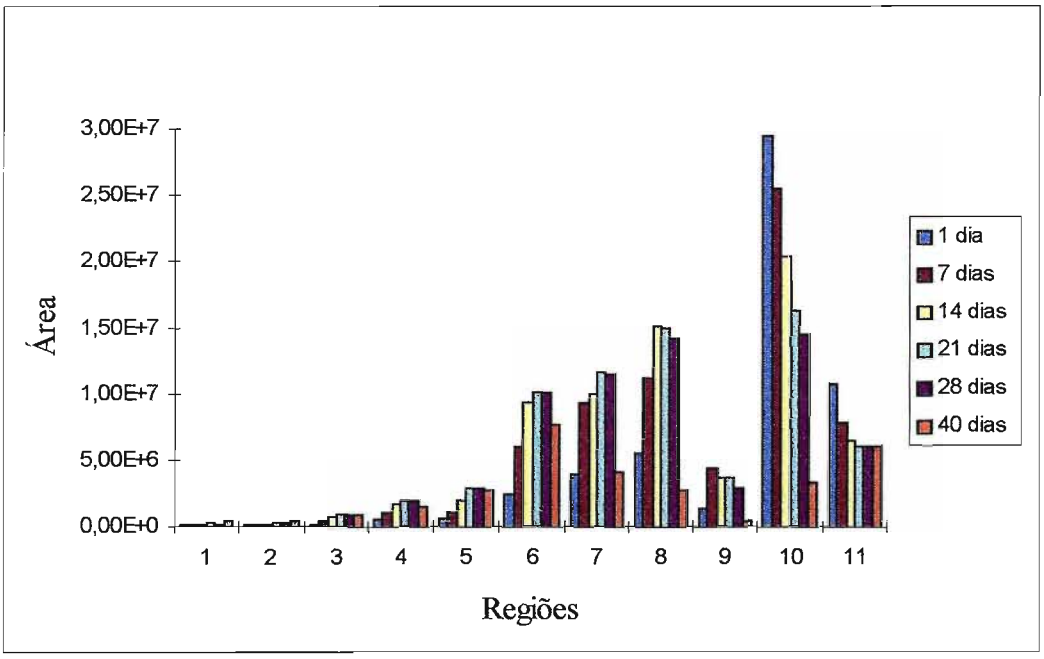


FIGURA 27. Histograma das áreas dos picos correspondentes às diversas regiões, dos cromatogramas das frações insolúveis em etanol 70%, obtidos por RP-HPLC. Os tempos de retenção de cada região são: 1 (9 e 10 minutos), 2 (11-12 minutos), 3 (20-25 minutos), 4 (25-30 minutos), 5 (31-33 minutos), 6 (34-40 minutos), 7 (40-44 minutos), 8 (45-50 minutos), 9 (51-54 minutos), 10 (55-60) e 11 (61-69 minutos)

Para se compreender melhor as complexas mudanças que ocorrem em decorrência da proteólise, haveria necessidade de se fazer o isolamento e caracterização da seqüência N-terminal de alguns desses peptídeos. A identificação dos peptídeos do queijo permite que se conheça a sua localização na cadeia da caseína, tornando possível a determinação de quais ligações peptídicas são clivadas durante a maturação. No entanto, esta informação não nos permite a identificação do agente proteolítico responsável pela clivagem de determinada ligação peptídica, limitando assim, a possibilidade de se controlar a proteólise. Para isso, seria necessário o estudo da especificidade das proteinases e peptidases envolvidas na maturação de queijos sobre a caseína, complementando aqueles referentes ao isolamento e identificação de peptídeos. Se a especificidade das proteinases nas caseínas fosse conhecida, seria possível a identificação dos agentes responsáveis pela produção de peptídeos.

5.4.3. Aminoácidos livres individuais

Os resultados dos aminoácidos livres individuais, apresentados na Tabela 16 e na Figura 28, mostraram um aumento nos níveis de todos eles durante o período de maturação. Treonina+serina, ácido glutâmico, prolina e leucina foram os que apareceram em maiores concentrações atingindo, respectivamente, valores de 15,20%, 14,78%, 14,36% e 18,01% do total de aminoácidos livres. O ácido aspártico, glicina, alanina, metionina, isoleucina e arginina foram os menos abundantes, contribuindo cada um com menos que 2% do total de aminoácidos. No entanto, analisando-se a evolução dos aminoácidos individualmente durante a maturação observa-se que, proporcionalmente, a glicina e a metionina foram as que sofreram maiores variações durante a maturação, com aumentos nas suas concentrações da ordem de 69,13 vezes para a glicina e 61,26 vezes para a metionina. Avaliando-se os dados de todas as amostras durante o período de maturação, verifica-se que treonina+serina, ácido glutâmico, prolina, valina, leucina, fenilalanina e lisina foram os aminoácidos dominantes no queijo Prato, contribuindo com cerca de 80% dos aminoácidos em todos os estágios de maturação.

O perfil de aminoácidos obtido neste estudo assemelha-se àquele obtido por GUINEE et al. (1990), onde ácido glutâmico e leucina estavam presentes em concentrações particularmente altas, enquanto fenilalanina, lisina e valina estavam presentes em níveis intermediários.

FARKYE et al. (1990) demonstraram que os aminoácidos que melhor indicavam a "idade proteolítica" do queijo Cheddar pareciam ser leucina, metionina e ácido glutâmico. POLO et al. (1985), trabalhando com queijo "Mahon", uma variedade característica de Espanha, observaram que os aminoácidos fenilalanina, valina, prolina, ácido glutâmico e isoleucina foram os mais abundantes em todos os testes realizados, por um período de 4 meses de maturação. Juntos, eles contribuíram com valores entre 67 e 80% dos aminoácidos livres totais. No entanto, cada tipo de queijo tem seu perfil

característico, resultante da degradação enzímica de peptídeos por microrganismos, e também pela interconversão, excreção e degradação de aminoácidos.

PRIETO et al. (1994) obtiveram valores médios para os aminoácidos livres totais do queijo León, de origem espanhola, produzido artesanalmente, com 1 mês de maturação, da ordem de 1803mg/kg, sendo a fenilalanina o aminoácido mais abundante. Leucina+ isoleucina, que não foram separadas pelo método utilizado, também apareceram em altos níveis, atingindo cerca de 17,1% do total de aminoácidos livres. Histidina+lisina e glutamina também apareceram em altas concentrações. O ácido glutâmico , que é um dos principais aminoácidos em vários tipos de queijos, não apareceu em grandes quantidades, atingindo cerca de 5,5% do total de aminoácidos livres. Os teores de asparagina, glicina e metionina foram especialmente baixos.

TABELA 16: Teores de aminoácidos livres individuais no queijo tipo Prato, durante o período de maturação.

Aminoácidos	Período de maturação (dias)					
(mg/100g)	1	7	14	21	28	40
Ácido Aspártico	22,75	93,18	116,69	109,24	99,31	135,93
Treonina + Serina	57,73	546,82	893,74	1211,73	1088,69	1842,75
Ácido Glutâmico	91,77	581,49	974,03	1098,02	1029,02	1791,17
Prolina	64,57	554,96	885,85	1054,51	1014,62	1740,74
Glicina	1,90	25,36	61,37	74,00	72,29	131,34
Alanina	14,37	96,88	153,81	165,04	150,86	236,87
Valina	34,64	242,84	425,75	480,33	454,80	781,68
Metionina	3,49	59,31	123,20	136,95	129,11	213,78
Isoleucina	9,28	74,33	120,83	137,33	132,82	223,89
Leucina	90,81	732,85	1265,54	1471,46	1298,25	2182,45
Tirosina	36,66	181,77	260,45	272,82	228,70	381,06
Fenilalanina	56,95	351,79	558,63	614,85	514,53	917,39
Lisina	67,91	299,51	447,68	495,11	531,32	863,11
NH_3	42,82	139,62	170,41	173,37	159,71	233,00
Histidina	48,19	92,17	124,79	195,50	191,36	274,26
Arginina	12,19	75,07	130,04	154,49	155,85	170,59
Total	656,03	4169,16	6712,81	7790,75	7251,24	12120,01

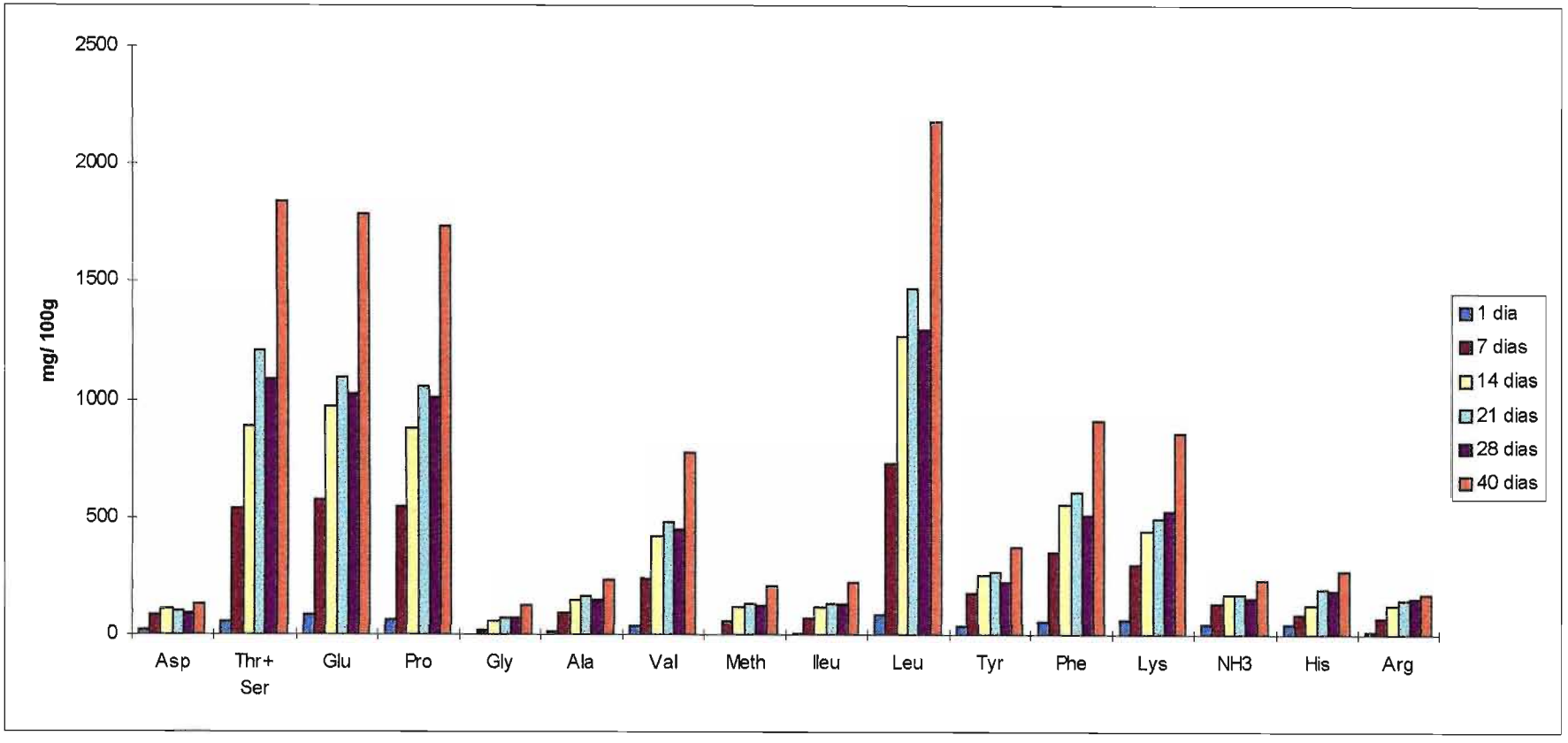


FIGURA 28: Teores de aminoácidos livres individuais no queijo tipo Prato, durante o período de maturação.

5.5. Perfil de textura

A textura ou corpo de um queijo é uma das características mais importantes na determinação da sua identidade e qualidade. Os principais fatores que afetam a consistência na maioria das variedades de queijos provavelmente são umidade, extensão da proteólise, pH, teores de cloreto de sódio e de gordura, qualquer alteração destas variáveis na massa do queijo e naturalmente, a temperatura.

Durante a maturação ocorrem várias mudanças que podem ser importantes no desenvolvimento da textura: a) a estrutura e composição se tornam mais uniformes, particularmente nos estágios iniciais, devido à fusão dos grãos de coalhada e redução dos gradientes de sal, umidade e pH; b) os queijos perdem água por evaporação e pelo avanço da sinérese (especialmente próximo às extremidades) e devido à proteólise; c) a maturação implica principalmente no rompimento da rede de paracaseinato; causa também ligeiro aumento do pH, devido à formação de grupamentos alcalinos em decorrência da proteólise e à degradação de ácido láctico (CREAMER & OLSON, 1982; LAWRENCE et al., 1987).

O queijo é considerado um material viscoelástico, o que significa que suas características reológicas podem variar de elástico a viscoso, dependendo do tipo (duro, semi-duro, mole, semi-mole). O queijo tipo Prato é um queijo semi-duro, de massa semi-cozida. Queijos duros e semi-duros não amolecem durante a maturação da mesma forma que aqueles com altos teores de umidade, mas ocorrem as mesmas mudanças estruturais (DE JONG, 1978), como seria esperado, uma vez que a taxa de conversão da αs_1-caseína para αs_1-I é a mesma para queijos com teores de umidade de 40 a 60% (DE JONG, 1976). Se a proporção de umidade em relação à caseína fosse suficientemente alta em queijos tipo Cheddar e Gouda, os valores de pH e o grau de degradação das caseínas levariam ao amolecimento da coalhada parcialmente clivada. Conseqüentemente, as propriedades reológicas do queijo com pH, concentrações de sódio e também com grau de degradação da αs_1-caseína semelhantes, são reguladas pelos seus teores de umidade.

A textura de um queijo novo muda com relativa rapidez, quando as estruturas das moléculas de αs_1-caseína são quebradas pelo coalho residual. Em queijos tipo Cheddar e Gouda, estas alterações se refletem principalmente no aumento da firmeza e numa diminuição da elasticidade. Em parte, isto é causado pela perda dos elementos estruturais, mas uma outra característica da proteólise provavelmente é significativa. A clivagem de cada ligação peptídica gera dois novos grupos iônicos, que competirão pela água disponível no sistema. Assim, a água disponível para solvatação das cadeias de proteínas se liga aos novos grupos iônicos, tornando o queijo mais firme e menos facilmente deformável. Esta mudança, em combinação com aquelas observadas na matriz protéica, dá o efeito observado na textura (LAWRENCE et al., 1987).

Dentre os atributos determinados no estudo do perfil de textura instrumental (TPA), a firmeza, a adesividade, a elasticidade e a coesividade foram os que se mostraram mais coerentes e apresentaram valores mais significativos. Os demais atributos, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade foram desconsiderados, uma vez que os resultados se mostraram inconsistentes e com uma variabilidade muito grande. Os resultados das análises do perfil de textura são mostrados na Tabela 17 e na Figura 29. A firmeza foi expressa em gramas (g), a adesividade em gramas x segundos (g.s); a elasticidade e a coesividade são adimensionais.

Uma das maiores dificuldades na medida das propriedades reológicas de um queijo consiste na obtenção de amostras representativas. Muitas variedades como o Cheddar, Chesire e alguns queijos azuis são heterogêneas e facilmente fraturáveis, enquanto queijos como os suiços apresentam olhaduras que causam problemas com relação à homogeneidade (FARKYE & FOX, 1990). Todos esses fatores apresentam uma forte contribuição nas variações observadas na determinação de textura.

Pelos dados da Tabela 17 e da Figura 29, observa-se um aumento na firmeza logo no início da maturação (7 dias), acompanhada por uma diminuição; a seguir, nota-se uma oscilação destes valores até o final do período. Como efeito total, observa-se um aumento

nos valores de firmeza (2921,2g no início e 3541,4g no final da maturação). As maiores variações foram observadas com relação à adesividade, que apresentou valores iniciais de -27,89g.s, atingindo -113,19g.s aos 40 dias de maturação. Os parâmetros elasticidade e coesividade sofreram uma ligeira diminuição, apresentando respectivamente valores de 0,83 e 0,60 no início da maturação e 0,78 e 0,55 no final do período.

TABELA 17. Perfil de textura do queijo Prato durante a maturação

Tempo (dias)	Firmeza (g)		Adesividade (g.s)		Elasticidade		Coesividade	
	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.
1	2921,2	39,18	-27,89	24,22	0,83	0,92	0,60	0,63
7	4568,7	35,74	-85,75	48,34	0,81	2,47	0,56	5,09
14	3754,2	27,03	-89,34	46,66	0,81	2,93	0,57	5,97
21	3982,8	29,90	-67,76	22,64	0,82	1,82	0,56	1,02
28	3155,0	26,10	-65,43	24,77	0,81	1,37	0,57	2,42
40	3541,4	27,18	-113,19	35,82	0,78	1,30	0,55	2,66

C.V.: Coeficiente de variação (%)

O aumento na firmeza provavelmente ocorreu devido à evaporação de água na superfície do queijo e ao gradiente de sal e umidade, uma vez que a salga do queijo Prato é realizada em salmoura, o que implica em variações nos teores de umidade, sal e na relação sal/umidade. Nestes queijos, a concentração de sal no interior é inicialmente muito menor que próximo à superfície, mas aparentemente não afeta o perfil de decomposição da αs_1- e da β-caseínas. De certo modo, a maturação em queijos salgados em salmoura ocorre da porção interna para a externa. A firmeza dos queijos com casca tende a aumentar durante a maturação, uma vez que a perda de umidade através da casca resulta num aumento na proporção caseína/umidade. Este efeito freqüentemente anula a diminuição normal da firmeza devido à hidrólise da matriz protéica (DE JONG, 1978; LAWRENCE et al., 1987).

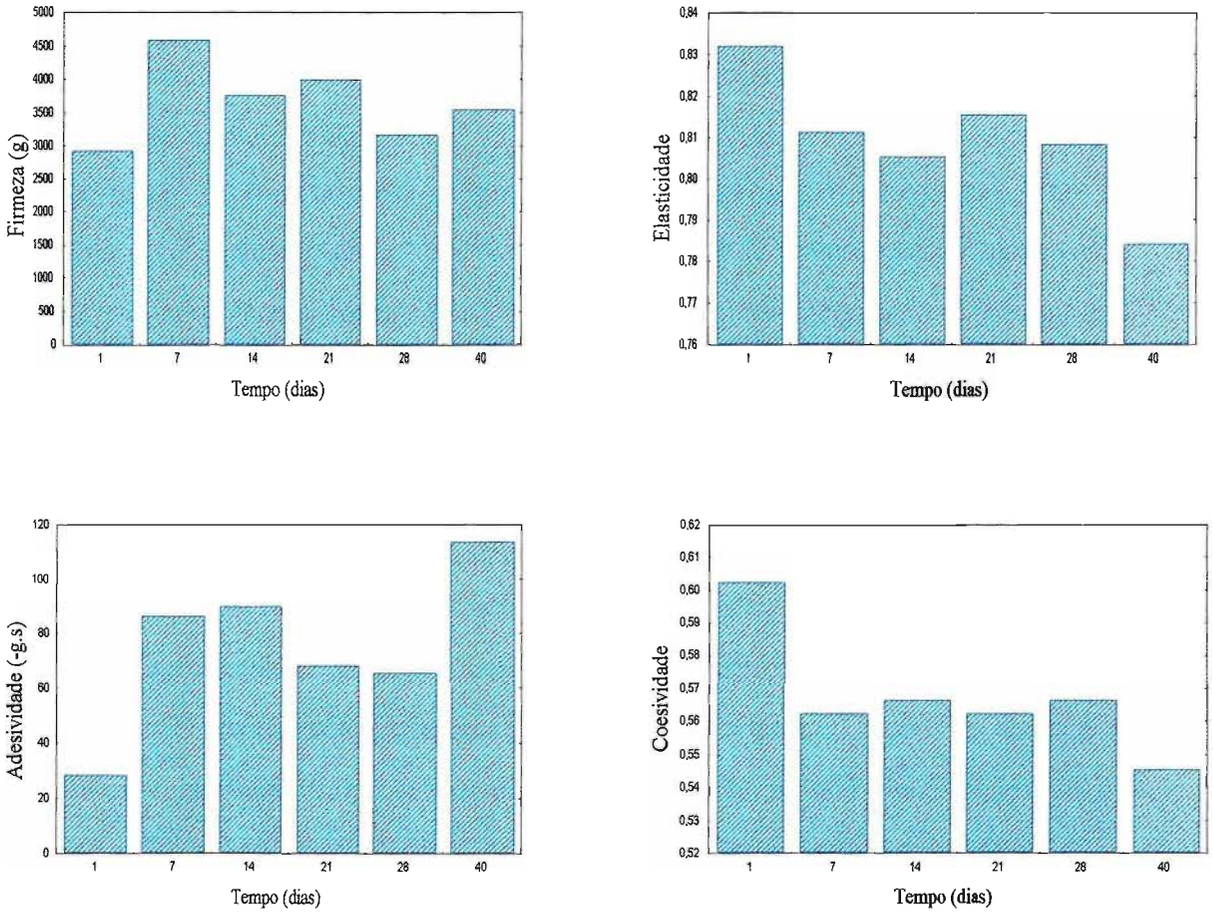


FIGURA 29. Comportamento dos atributos firmeza, adesividade, elasticidade e coesividade do queijo Prato durante o período de maturação.

CREAMER & OLSON (1982) demonstraram a importância de parâmetros como o teor de umidade, o pH e o grau de proteólise das caseínas nas características de textura. Esses autores observaram uma diminuição na firmeza de queijo Cheddar no início da maturação, que foi atribuída a um enfraquecimento da ligação αs_1-caseína na matriz protéica do queijo. Por outro lado, FERNANDEZ del POZO et al. (1988) observaram que a firmeza do queijo La Serena não foi afetada significativamente pela proteólise em até 30 dias de maturação, quando apenas 22,61% de αs_1 e 55,97% de β-caseína não haviam sido degradadas. A αs_1- e β-caseína residuais mostraram forte correlação com a firmeza dos queijos no final do período de maturação.

CHEN et al. (1979) avaliaram seis parâmetros de textura em diferentes amostras de queijos, variando do Parmesão ao queijo processado e verificaram que estas medidas objetivas apresentavam boas correlações com aquelas obtidas através de um painel de provadores. Os autores observaram ainda uma correlação entre os parâmetros de textura, a composição e o pH dos queijos. Quando a proteína foi usada para o cálculo da correlação com a firmeza, o coeficiente de correlação (R) foi de 0,827; o valor de R aumentou de 0,827 para 0,890 quando o efeito do cloreto de sódio foi adicionado à correlação. A adição dos efeitos da água e do pH aumentaram o valor de R para 0,923. O efeito da gordura não contribuiu com qualquer alteração do valor de R, indicando que o teor de gordura não contribui significativamente com a variação da firmeza. Os autores verificaram que quando a proteína foi usada para o cálculo da correlação com a adesividade, o coeficiente de correlação (R) foi de 0,779; este valor aumentou para 0,888 com a adição do efeito do cloreto de sódio, para 0,925 com a adição do efeito da água e para 0,953 com a adição dos efeitos do pH e da gordura. O coeficiente de correlação entre a elasticidade e o teor água foi de 0,811; este valor praticamente não se alterou com a adição dos efeitos dos demais parâmetros.

LAWRENCE et al. (1987) observaram que a proteólise se correlacionava negativamente de uma maneira significativa com a firmeza e a elasticidade, indicando um amolecimento do queijo quando a matriz protéica era clivada.

Pelos dados obtidos em nosso trabalho e apresentados na Tabela 18, a firmeza não apresentou correlação com os parâmetros usados na avaliação da proteólise apresentados na Tabela 11. Por outro lado, mostrou uma correlação negativa e muito baixa com os demais atributos de textura, com o pH, e os teores de sal e de proteína. Houve uma correlação média entre a firmeza e o teor de umidade, com um valor de R de -0,639. Os atributos adesividade, elasticidade e coesividade apresentaram valores razoáveis de correlação em relação aos parâmetros usados para avaliação da proteólise, sendo que a elasticidade foi o atributo que apresentou as melhores correlações, variando de -0,796 para a análise entre a elasticidade e o NS-pH 4,6 expresso como % de NT, determinado com TNBS a -0,910 com relação ao triptofano. Quando correlacionados entre si, estes atributos apresentaram correlações altas e significativas. Quando esses atributos de textura foram analisados juntamente com os parâmetros de composição pH, sal, umidade e proteína, observou-se valores de correlação variando de médios a bons, sendo as melhores correlações apresentadas em relação à umidade e proteína, e entre a elasticidade e o pH (R=-0,846).

Todos esses resultados analisados conjuntamente mostram uma grande relação, evidenciando uma interdependência entre os atributos de textura, a composição dos queijos e os parâmetros usados na avaliação da proteólise.

TABELA 18. Correlação entre os atributos de textura, os índices de proteólise e os parâmetros: pH, sal, umidade e proteína (resultados comparados ao nível de significância de 5%).

	Firmeza	Adesividade	Elasticidade	Coesividade
Análise por Kjeldahl				
NS-pH 4,6 (%)	0,052	-0,681	-0,811	-0,841
NS-pH 4,6, como % de NT	0,055	-0,674	-0,803	-0,839
NNP (%)	0,034	-0,703	-0,847	-0,849
NNP, como % de NT	0,023	-0,701	-0,849	-0,848
Análise com TNBS				
NS-pH 4,6 (mg leu/g)	-0,054	-0,674	-0,841	-0,807
NS-pH 4,6, como % de NT	-0,052	-0,631	-0,796	-0,791
NNP (mg leu/g)	-0,047	-0,685	-0,848	-0,811
NNP, como % de NT	-0,028	-0,651	-0,807	-0,804
Análise com ninidrina				
NS-pH 4,6 (mg leu/g)	-0,059	-0,675	-0,848	-0,806
Tirosina (mg/100g)	-0,048	-0,661	-0,814	-0,793
Triptofano (mg/100g)	-0,005	-0.749	-0,910	-0,836
Absorbância a 274,5nm	-0,049	-0,705	-0,874	-0,818
Firmeza (g)	-	-0,515	-0,220	-0,522
Adesividade (g.s)	-0,515	-	0,941	0,930
Elasticidade	-0,220	0,941	-	0,904
Coesividade	-0,522	0,930	0,904	-
pH	-0,168	-0,698	-0,846	-0,662
Sal	0,184	0,393	0,490	0,199
Umidade	-0,639	0,796	0,688	0,886
Proteína	0,375	-0,847	-0,881	-0,906

6. CONCLUSÕES

Os resultados de composição do queijo evidenciaram a variação entre as amostras nos vários ensaios, uma conseqüência da variação da composição do leite. As propriedades físicas e químicas do leite influenciam na composição final do queijo que, por sua vez, tem um grande efeito no perfil de maturação.

As frações nitrogenadas estudadas e os métodos utilizados na avaliação direta da proteólise se mostraram adequados para uso em análises de rotina. De modo geral, estas técnicas analíticas são simples e rápidas, empregando materiais e reagentes de uso comum em laboratórios de controle de qualidade. Todavia, dessas frações, apenas o nitrogênio solúvel em ácido fosfotúngstico (PTA), contendo a porção referente ao nitrogênio amínico, não se mostrou adequada para o monitoramento da proteólise durante a maturação. A maior formação de aminoácidos ocorre nas etapas finais da maturação, em queijos com períodos de maturação mais longos e perfil de proteólise mais extensivo, o que não é o caso do queijo Prato.

A determinação espectrofotométrica da tirosina e triptofano, especialmente a tirosina, comprovou ser uma metodologia adequada para a avaliação da intensidade de maturação, embora sejam considerados índices brutos e não reflitam a totalidade das transformações que as proteínas sofrem durante a maturação. Uma vez que os valores apresentaram a mesma tendência daqueles obtidos pelas relações NS-pH 4,6/NT e NNP/NT, que são mais trabalhosos e demorados, esta técnica pode ser usada como um método rápido alternativo ao de Kjeldahl.

Os grupamentos amínicos livres determinados por reação com TNBS ou ninidrina-cádmio mostraram uma tendência de aumento em todas as frações, com um aumento ligeiramente maior no final do período de maturação, principalmente nas amostras analisadas com ninidrina-cádmio. Estes métodos fornecem informações que refletem melhor as degradações das proteínas durante a maturação.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

O acompanhamento da proteólise em queijo tipo Prato ao longo da maturação indicou um alto grau de associação entre os resultados obtidos em todos os métodos utilizados. Estes métodos apresentaram alta precisão e uma alta correlação entre si e especialmente com o método de Kjeldahl, que é considerado referência.

Os coeficientes de correlação foram altamente significativos, indicando que todos os métodos estudados poderiam ser considerados indicadores do grau de proteólise. Sendo assim, o grau de maturação num queijo Prato, produzido e estocado sob condições definidas e sem grandes variações, poderia ser definido pelo que poderíamos chamar "idade química" ou seja, a extensão da proteólise de acordo com índices químicos. Os dados obtidos pela análise de regressão e correlação permitem que se faça uma previsão dos valores que seriam obtidos experimentalmente em diferentes tempos de maturação.

Pelos dados da análise de aminoácidos livres individuais, verifica-se que treonina+serina, ácido glutâmico, prolina, valina, leucina, fenilalanina e lisina foram os aminoácidos mais abundantes no queijo Prato, contribuindo com cerca de 80% dos aminoácidos em todos os estágios de maturação. Estes aminoácidos, em conjunto ou separadamente, poderiam ser utilizados como indicadores da "idade proteolítica" dos queijos.

A avaliação instrumental do perfil de textura demonstrou a correlação dos atributos adesividade, elasticidade e coesividade com os outros índices usados na avaliação da proteólise, evidenciando que as alterações percebidas pelos consumidores podem ser medidas por parâmetros objetivos. Todos esses resultados analisados conjuntamente mostraram uma grande relação, evidenciando uma interdependência entre os atributos de textura, a composição dos queijos e os parâmetros usados na avaliação da proteólise.

Para um estudo mais completo da proteólise, há necessidade de se fazer o acompanhamento da hidrólise das caseínas e a formação de peptídeos, seguido pelo seu isolamento. Nestes casos, a eletroforese e cromatografia (RP-HPLC) passam a ser ferramentas analíticas muitos úteis. A análise eletroforética demonstrou o aumento na concentração de peptídeos ao longo da maturação, sendo evidente o desdobramento gradual da αs1-caseína formando a fração αs1-I (f24-199) e da β-caseína, formando as frações γ1, γ2 e γ3. Todavia, a complexidade do perfil eletroforético das amostras estudadas e os recursos disponíveis, não permitiram a quantificação das bandas equivalentes aos principais produtos de degradação das caseínas. A análise por RP-HPLC também demonstrou um aumento no número de picos durante a maturação, com maior variação naqueles eluídos nas regiões intermediária e final da separação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, G.H. The determination of lactose in cheese The Australian Journal of Dairy Technology, Victoria, v. 32, n. 3, p. 111-114, 1977.

ADDEO, F., CHIANESE, L., SALZANO, A., SACCHI, R., CAPPUCCIO, U., FERRANTI, P., MALORNI, A. Characterization of 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. Journal of Dairy Research, London, v. 59, n. 3, p. 401-411, 1992.

ADDEO, F., CHIANESE, L., SACCHI, R., MUSSO, S.S., FERRANTI, P., MALORNI, A. Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese soluble in 120 g trichloroacetic acid/L. Journal of Dairy Research, London, v. 61, n. 3, p. 365-374, 1994.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 27, n. 6, p. 1256-1262, 1979.

ALI, L.A.M., MULDER, H. Taste and flavour forming compounds in cheese. The amino acid content of Edam cheese. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 15, n. 2/3, p. 377-391, 1961.

ANDREWS, A.T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. Journal of Dairy Research, London, v. 50, n. 1, p. 45-55, 1983.

ANDREWS, A.T., ALICHANIDIS, E. Proteolysis of caseins and the proteose peptones fraction of bovine milk. Journal of Dairy Research, London, v. 50, n. 3, p. 275-290, 1983.

ANTILA, V., HAKKARAINEN, H., LAPPALAINEN, R. The transfer of milk components to Finnish Edam and Emmental cheeses. Milchwissenschaft, Munich, v. 37, n. 6, p. 321-324, 1982.

ARDO, Y., GRIPON, J.C. Chromatographic methods used to measure proteolysis in cheese. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bruxelas, 1991. n. 261, p. 29-34.

ARDO, Y., MEISEL, H. Methods for direct measurement of peptide bond cleavage in cheese. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bruxelas, 1991. n. 261, p. 10-13.

ASCHAFFENBURG, R., DREWRY, J. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 15, London, 1959. Proceedings, London, International Dairy Federation, 1959. n. 3, p. 1631-1637.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. Produção brasileira de produtos lácteos de estabelecimentos sob inspeção federal. São Paulo: ABIQ, 1998.

ASTON, J.W., CREAMER, L.K. Contribution of the components of the water-soluble fraction to the flavour of Cheddar cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 21, n. 3, p. 229-248, 1986.

ASTON, J.W., DULLEY, J.R. Cheddar cheese flavour. The Australian Journal of Dairy Technology, Victoria, v. 37, n. 2, p. 59-64, 1982.

ASTON, J.W., DURWARD, I.G., DULLEY, J.R. Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. The Australian Journal of Dairy Technology, Victoria, v. 38, n. 2, p. 55-59, 1983.

BANKS, J.M. Cheese. In: EARLY, R. The technology of dairy products. Glasgow: Blackie, 1991. p. 39-65.

BARLOW, I.E., LLOYD, G.T., RAMSHAW, E.H. The measurement of proteolysis in Cheddar cheese: A comparison of trinitrobenzene sulphonic acid procedures. The Australian Journal of Dairy Technology, Victoria, v. 41, n. 2/3, p. 79-81, 1986.

BASCH, J.J., FARRELL Jr., H.M., WALSH, R.A., KONSTANCE, R.P., KUMOSINSHI, T.F. Development of a quantitative model for enzyme-catalyzed, time-dependent changes in protein composition of Cheddar cheese during storage. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 72, n. 3, p. 591-603, 1989.

BERNBACK, S., HERNELL, O., BLACKBERG, L. Purification and molecular characterization of bovine pregastric esterase. European Journal of Biochemistry, Berlin, v. 148, n. 3, p. 233-238, 1985.

BHOWMIK, T., RIESTERER, R., VAN BOETAL, M.A.J.S., MARTH, E.H. Characteristics of low-fat Cheddar cheese made with added *Micrococcus* or *Pediococcus* species. Milchwissenschaft, Munich, v. 45, n. 4, p. 230-235, 1990.

BICAN, P., SPAHNI, A. Low molecular-mass nitrogen components in ripening cheese. Lebensmittel-Wissenschaft- Technolology, London ,v. 24, n. 3, p. 315-322, 1991.

BLAKESLEY, R.W., BOEZI, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. Analytical Biochemistry, New York, v. 82, n. 4, p. 580-582, 1977.

BOCKELMANN, W., FOBKER, M., TEUBER, M. Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. International of Dairy Journal, London, v. 1, n. 1, p. 51-66, 1991.

BOCKELMANN, W., SCHULZ, Y., TEUBER, M. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. International of Dairy Journal, London, v. 2, n. 2, p. 95-107, 1992.

BOOTH, M., JENNINGS, P.V., NI FHAOLAIN, I., O'CUINN, G. Prolidase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2: partial purification and characterization. Journal of Dairy Research, London, v. 57, n. 2, p. 245-254, 1990a.

BOOTH, M., NI FHAOLAIN, I., JENNINGS, P.V., O'CUINN, G. Purification and characterization of a post-proline dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus cremoris* AM2. Journal of Dairy Research, London, v. 57, n. 1, p. 89-99, 1990b.

BOSMAN, B.W., TAN, P.S.T., KONINGS, W.N. Purification and characterization of a tripeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 56, n. 6, p. 1839-1843, 1990.

BOUDJELLAB, N., ROLET-REPECAUD, O., COLLIN, J.C. Detection of residual chymosin in cheese by an enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Dairy Research, London, v. 61, n. 1, p. 101-109, 1994.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, New York, v. 72, n. 2, p. 248-254, 1976.

BREEN, E.D., FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H. Fractionation of peptides on a 10 kDa ultrafiltration retentate of a water-solube extract of Cheddar cheese. Italian Journal of Food Science, Roma, v. 7, n. 3, p. 211-220, 1995.

BUCHOWSKI, M.J.S., MILLER, D.D. Calcium bioavailability from ripening Cheddar cheese. Journal of Food Science, Chicago, v. 55, n. 5, p. 1293-1295, 1364, 1990.

BURKHALTER, G. Catalogue of cheese. Bruxelas: International Dairy Federation, 1981. n.141, p. 3-40.

CASEY, M.G., MEYER, J. Presence of X-prolyl-dipeptidyl-peptidase in lactic acid bacteria. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 68, n. 12, p. 3212-3215, 1985.

CHAMPION, H.M., STANLEY, D.W. HPLC separation of bitter peptides from Cheddar cheese. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, Ottawa, v. 15, n. 4, p. 283-288, 1982.

CHAPMAN, H.R., SHARPE, M.E. Microbiology of cheese. In: ROBINSON, R.K. Dairy microbiology. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 203-289.

CHEN, A.H., LARKIN, J.W., CLARK, C.J., IRWIN, W.E. Textural analysis of cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 62, n. 6, p. 901- 907, 1979.

CHRISTENSEN, T.M.I.E., BECH, A.M., WERNER, H. Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bruxelas, 1991. n. 261, p. 4-9.

CHRISTENSEN, T.M.I.E., KRISTIANSEN, K.R., MADSEN, J.S. Proteolysis in cheese investigated by high performance liquid chromatography. Journal of Dairy Research, London, v. 56, n. 5, p. 823-828, 1989.

CHURCH, F.C., SWAISGOOD, H.E., PORTER, D.H., CATIGNANI, G.L. Spectrophotometric assay using o-phtaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 66, n. 6, p. 1219-1227, 1983.

CLEGG, K.M., LEE, Y.K., McGILLIGAN, J.F. Technical note: Trinitrobenzene sulphonic acid and ninhydrin reagents for the assessment of protein degradation in cheese samples. Journal of Food Technology, Oxford, v. 17, n. 4, p. 517-520, 1982.

CLIFFE, A.J., LAW, B.A. A time course study of peptide production in accelerated-ripened Cheddar cheese using reverse phase high performance liquid chromatography. Food Biotechnology, New York, v. 5, n. 1, p. 1-17, 1991.

CLIFFE, A.J., MARKS, J.D., MULHOLLAND, F. Isolation and characterization of non-volatile flavours from cheese: peptide profile of flavour fractions from Cheddar cheese, determined by reverse phase high-performance liquid chromatography. International of Dairy Journal, London, v. 3, n. 3, p. 379-387, 1993.

CLIFFE, A.J., REVELL, D., LAW, B.A. A method for the reverse phase high performance liquid chromatography of peptides from Cheddar cheese. Food Chemistry, London, v. 34, n. 2,p. 147-160, 1989.

COGAN, T.M., DALY, C. Cheese starter cultures. In: FOX, P.F., ed. Cheese: chemistry, physics and microbiology. London: Elsevier Applied Science, 1987. v.1, p. 179-249.

CREAMER, L.K. β-Casein degradation in Gouda and Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 58, n. 3, p. 287-292, 1975.

CREAMER, L.K. A further study on the action of rennin on β-casein. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 11, n. 1, p. 30-39, 1976a.

CREAMER, L.K. Casein degradation in Mozzarella-type cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 11, n. 2, p. 130-131, 1976b.

CREAMER, L.K. Electrophoresis of cheese. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bruxelas, 1991. n. 261, p.14-28.

CREAMER, L.K., MILLS, O.E. The action of rennets on the caseins. I. Rennin action on β-casein-B in solution. Journal of Dairy Research, London, v. 38, n. 3, p. 269-280, 1971.

CREAMER, L.K., OLSON, N.F. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. Journal of Food Science, Chicago, v. 47, n. 2, p. 631-636, 646, 1982.

CREAMER, L.K., RICHARDSON, B.C. Identification of the primary degradation product of αs_1-casein in Cheddar cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 9, n. 1, p. 9-13, 1974.

CREAMER, L.K., GILLES, J, LAWRENCE, R.C. Effect of pH on the texture of Cheddar and Colby cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 23, n. 1, p. 23-35, 1988.

CREAMER, L.K., LAWRENCE, R.C., GILLES, J. Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 20, n. 3, p. 185-203, 1985.

DAHLBERG, A.C., KOSIKOWSKY, F.V. The flavour, volatile acidity and soluble protein of Cheddar and other cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 30, n. 1, p. 165-174, 1947.

DALGLEISH, D.G. The enzymatic coagulation of milk. In: FOX, P.F., ed. Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects. London: Elsevier Applied Science, 1987. v. 1, p. 63-97.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, n. 121, p. 404-427, 1964.

DE JONG, L. A quantitative electrophoretic method of studying cheese ripening. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 29, n. 2/3, p. 162-168, 1975.

DE JONG, L. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 1. Proteolysis and consistency of "Noorhollandse Meshanger" cheese. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 30, n. 2/3, p. 242-253, 1976.

DE JONG, L. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 3. The micellar structure of Meshanger cheese. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 32, n. 1, p. 15-25, 1978.

DELFOUR, A., JOLLES, J., ALAIS, C., JOLLES, P. Caseinoglycopeptides: characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, v. 19, n. 3, p. 452-455, 1965.

DESMAZEAUD, M.J., GRIPON, J.C. General mechanism of protein breakdown during ripening. Milchwissenschaft, Munich, v. 32, n. 12, p. 731-734, 1977.

DESMAZEAUD, M.J., ZEVACO, C. Isolation and general properties of two intracellular aminopeptidases of *Streptococcus diacetylactis*. Milchwissenschaft, Munich, v. 34, n. 10, p. 606-610, 1979.

DILLON, J.C. Le fromage dans l'alimentation. In: ECK, A. Le Fromage. Technique et Documentation. 2.ed. Paris, 1990. p. 496-509

DOI, E., SHIBATA, D., MATOBA, T. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. Analytical Biochemistry, New York, v. 118, n. 1, p. 173-184, 1981.

DRIESSEN, F.M. Heat inactivation of lipases and proteinases (indigenous and bacterial). In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Heat-induced changes in milk. Bruxelas, 1989. n.238, p.71-93.

DULLEY, J.R. The contribution of rennet and starter enzymes to proteolysis in cheese. The Australian Journal of Dairy Technology, Victoria, v. 29, n. 2, p. 65-69, 1974.

DUPUIS, C., CORRE, C., BOYAVAL P. Lipase and esterase activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 59, n. 12, p. 4004-4009, 1993.

DYBING, S.T., WIEGAND, J.A., BRUDVIG, S.A., HUANG, E.A., CHANDAN, R.C. Effect of processing variables on the formation of calcium lactate crystals on Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 71, n. 7, p. 1701-1710, 1988.

EDWARDS, J., KOSIKOWSKI, F.V. Bitter compounds from Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 66, n. 4, p. 727-734, 1983.

EDWARDS, JR., J.L., KOSIKOWSKI, F.V. Electrophoretic proteolytic patterns in Cheddar cheese by rennet and fungal rennets: Their significance to international classification of cheese varieties. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 52, n. 10, p. 1675-1678, 1969.

EGGIMANN, B., BACHMANN, M. Purification and partial characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 40, n. 8, p. 876-882, 1980.

EIGEL, W.N. Effect of bovine plasmin on αs_1-B and κ-A caseins. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 60, n. 9, p. 1399-1403, 1977.

EIGEL, W.N., BUTLER, J.E., ERNSTROM, C.A., FARRELL JR, H.M., HARWALKAR, V.R., JENNESS, R., WHITNEY, R.Mc. L. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 67, n. 8, p. 1599-1631, 1984.

EL SODA, M., KORAYEN, M., EZZAT, N. The esterolytic and lipolytic activities lactobacilli. III. Detection and characterization of the lipase system. Milchwissenchaft, Munich, v. 41, n. 6, p. 353-355, 1986.

ENGELS, W.J.M., VISSER, S. Isolation and comparative characterization of componentes that contribute to the flavour of different types of cheese. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 48, n. 3, p. 127-140, 1994.

ERNSTROM, C.A. Milk-clotting enzymes and cheese chemistry. Pat I. Milk-clotting enzymes and their action. In: WEBB, B.H., JOHNSON, A.H., ALFORD, J.A. Fundamentals of dairy chemistry. 2.ed. Westport: AVI, 1974. p. 662-771

EXTERKATE, F.A. Comparison of strains of *Streptococcus cremoris* for proteolytic activities associated with the cell wall. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 30, n. 2/3, p. 95-105, 1976.

EXTERKATE, F.A., VAN DE VEER, G.J.C.M. Purification and some properties of a membrane-bound aminopeptidase A from *Streptococcus cremoris*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 53, n. 3, p.577-583, 1987.

EXTERKATE, F.A., ALTING, A.C., SLANGEN, C.J. Specificity of two genetically related cell-envelope proteinases of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* toward αs_1-casein (1-23)-fragment. The Biochemical Journal, London, v. 273, n. 1, p. 135-139, 1991.

EZZAT, N., EL SODA, M., BOUILLANNE, C., ZEVACO, C., BLANCHARD, P. Cell wall-associated proteinases in *Lactobacillus helveticus, Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis*. Milchwissenschaft, Munich, v. 40, n. 3, p. 140-143, 1985.

FARKYE, N.Y., FOX, P.F. Objective indices of cheese ripening. Trends in Food Science and Technology, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 37-40, 1990a.

FARKYE, N.Y., FOX , P.F. Observation of plasmin activity in cheese. Journal of Dairy Research, London, v. 57, n. 3, p. 413-418, 1990b.

FARKYE, N.Y., FOX, P.F. Preliminary study on the contribution of plasmin to proteolysis in Cheddar cheese: Cheese containing plasmin inhibitor, 6-aminohexanoic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 39, n. 4, p. 786-788, 1991.

FARKYE, N.Y., FOX, P.F. Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. Journal of Dairy Research, London, v. 59, n. 2, p. 209-216, 1992.

FARKYE, N.Y., FOX, P.F., FITZGERALD, G.F., DALY, C. Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase-positive or proteinase-negative starters. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 73, n. 4, p. 874-880, 1990.

FARKYE, N.Y., KIELY, L.J., ALLSHOUSE, R.D., KINDSTEDT, P.S. Proteolysis in Mozzarella cheese during refrigerated storage. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 74, n. 5, p. 1433-1438, 1991.

FARRER, K.T.H. Cheese and cheese products. The Australian Journal of Dairy Technology, Victoria, v. 39, n. 3, p. 108-111, 1984.

FERNANDEZ del POZO, B., GAYA, P., MEDINA, M., RODRIGUEZ-MARIN, M.A., NUÑEZ, M. Changes in chemical and rheological characteristics of La Serena ewes' milk cheese during ripening. Journal of Dairy Research, London, v. 55, n. 3, p. 457-464, 1988.

FIELDS, R. The measurement of amino groups in proteins and peptides. The Biochemical Journal, London, v. 124, n. 3, p. 581-590, 1971.

FODA, E.A., HAMMOND, E.G., REINBOLD, G.W., HOTCHKISS, D.K. Role of fat in flavor of Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 57, n. 10, p. 1137-1142, 1974.

FOLKERTSMA, B., FOX, P.F. Use of Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. Journal of Dairy Research, London, v. 59, n. 2, p. 217-224, 1992.

FOX, P.F. Cheese: an overview. In: FOX, P.F., ed. Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects. London: Elsevier Applied Science, 1987. v. 1, p. 1-33.

FOX, P.F. Exogenous enzymes in dairy technology: a review. Journal of Food Biochemistry, Westport, v. 17, n. 3, p. 173-199, 1993.

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

FOX, P.F., LAW, J. Enzymology of cheese ripening. Food Biotechnology, New York, v. 5, n. 3, p. 239-262, 1991.

FOX, P.F., WALLEY, B.F. Influence of sodium chloride on the proteolysis of casein by rennet and by pepsin. Journal of Dairy Research, London, v. 38, n. 2, p. 165-170, 1971.

FOX, P.F., LAW, J., McSWEENEY, P.L.H., WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P.F., ed. Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects. London: Elsevier Applied Science, 1993. v. 1, p. 389-438.

FOX, P.F., LUCEY, J.A., COGAN, T.M. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Cleveland, v. 29, n. 4, p. 237-253, 1990.

FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H., SINGH, T.K. Methods for assessing proteolysis in cheese during ripening. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v. 367, p. 161-194, 1995b.

FOX, P.F., SINGH, T.K., McSWEENEY, P.L.H. Biogenesis of flavour compounds. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v. 367, p. 59-98, 1995a.

FOX, P.F., SINGH, T.K., McSWEENEY, P.L.H. Proteolysis in cheese during ripening. In: VARLEY, J., ANDREWS, A.T. Biochemistry of milk products. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. p 1-31.

FRIEDMAN, M., PANG, J., SMITH, G.A. Ninhydrin-reactive lysine in food proteins. Journal of Food Science, Chicago, v. 49, n. 1, p. 10-13, 20, 1984.

FRITSCH, R.J., MARTENS, F., BELITZ, H.D. Monitoring Cheddar cheese ripening by chemical indices of proteolysis. 1. Determination of free glutamic acid, soluble nitrogen, and liberated amino groups. Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung und Forschung, Berlin, v. 194, n. 4, p. 330-336, 1992.

FRYER, T.F., SHARPE, M.E., REITER, B. Utilization of milk citrate by lactic acid bacteria and "blowing" of film-wrapped cheese. Journal of Dairy Research, London, v. 37, n. 1, p. 17-28, 1970.

FURTADO, M.M. A arte e a ciência do queijo. São Paulo: Globo, 1991. 297 p.

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

FURTADO, M.M., PARTRIDGE, J.A. Characterization of nitrogen fractions during ripening of a soft cheese made from ultrafiltration retentates. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 71, n. 11, p. 2877-2884, 1988.

FURTADO, M.M., WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Étude de quelques aspects de la fabrication des fromages brésiliens Prato et Minas. Le Lait, Paris, v. 58, n. 578, p. 510-530, 1978.

FURTADO, M.M., WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Fabricação de queijo Prato e Minas: estudo de rendimento. Parte I: Determinação das cifras de transição. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 35, n. 205, p. 3-19, 1979.

FURTADO, M.M., WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Perda de umidade da coalhada durante a fabricação do queijo Prato. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 38, n. 229, p. 3-19, 1983.

GODINHO, M., FOX, P.F. Ripening of Blue cheese. Influence of salting rate on proteolysis. Milchwissenschaft, Munich, v. 37, n. 2, p. 72-75, 1982.

GONZALEZ DE LLANO, D., RAMOS, M., POLO, C. Gel filtration and high performance liquid chromatographic analysis of phosphotungstic acid soluble peptides from Blue cheeses. Chromatographia, Wiesbaden, v. 23, n. 10, p. 764-766, 1987.

GRAPPIN, R., RANK, T.C., OLSON, N.F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 68, n. 3, p. 531-540, 1985.

GREEN, M.L. Review on the Progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research, London, v. 44, n. 1, p. 159-188, 1977.

GREEN, M.L. Milk coagulation and the development of cheese texture. In: DAVIES, F.L., LAW, B.A. Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. London: Elsevier Applied Science, 1984. p.1-33

GREEN, M.L., ANGAL, S., LOWE, P.A., MARSTON, F.A.O. Cheddar cheesemaking with recombinant calf chymosin synthesized in *Escherichia coli*. Journal of Dairy Research, London, v. 52, n. 2, p. 281-286, 1985.

GRIPON, J.C., DESMAZEAUD, M.J., LE BARS, D., BERGERE, J.L. Role of proteolytic enzymes of *Streptococcus lactis*, *Penicillium roqueforti* and *Penicillium caseicolum* during cheese ripening. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 60, n. 10, p. 1532-1538, 1977.

GRIPON, J.C., MONNET, V., LAMBERT, G., DESMAZEAUD, M.J. Microbial enzymes in cheese ripening. In: FOX, P.F., ed. Food enzymology. London: Elsevier Applied Science, 1991. v. 1, p. 131-168.

GRUFFERTY, M.B., FOX, P.F. Factors affecting the release of plasmin activity from casein micelles. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 23, n. 2, p. 153-163, 1988.

GUINEE, T.P., WILKINSON, M.G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. Journal of the Society of Dairy Technology, Wembley, v. 45, n. 4, p. 94-104, 1992.

GUINEE, T.P., WILKINSON, M.G., MULHOLLAND, E.O., FOX, P.F. Influence of ripening temperature, added commercial enzyme preparations and attenuated mutant (Lac-) *Lactococcus lactis* starter on the proteolysis and maturation of Cheddar cheese. Irish Journal of Food Science and Technology, Dublin, v. 15, n. 1/2, p. 27-52, 1991.

HAASNOOT, W., STOUTEN, P., VENEMA, D.P. High performance liquid chromatography determination of the extent of proteolysis in Gouda cheese. Journal of Chromatography, Amsterdam, v. 483, n. 4, p.319-329, 1989.

HABEEB, A.F.S. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene sulfonic acid. Analytical Biochemistry, New York, v.14, n. 2, p. 328-333, 1966.

HALL, D.M., CREAMER, L.K. A study of the sub-microscopic structure of Cheddar, Chesire and Gouda cheese by electron microscopy. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 7, n. 2, p. 95-102, 1972.

HARWALKAR, V.R., ELLIOTT, J.A. Isolation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 54, n. 1, p. 8-11, 1971.

HEMME, D., BOUILLANE, C., MÉTRO, F., DESMAZEAUD, M.J. Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. Science des Aliments, Paris, v. 2, n. 2, p. 113-123, 1982.

HICKEY, M.W., VAN LEEUWEN, H., HILLIER, A.J., JAGO, G.R. Amino acid accumulation in Cheddar cheese manufactured from normal and ultrafiltered milk. The Australian Journal of Dairy Technology, Victoria, v. 38, n. 3, p. 110-113, 1983.

HOLMES, D.G., DUERSCH, J.N., ERNSTROM, C.A. Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during Cheddar cheesemaking. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 60, n. 6, p. 862-869, 1977.

HOLSINGER, V.H. Overview: Cheese Chemistry and Rheology. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v. 367, p. 1-6, 1995.

HORWITZ, W., ed. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12.ed. Washington: AOAC, 1975. p.284 (Proc. 16223).

HOSKEN, F.S., GAUDERETO, L.Q. Influência da cultura láctica na qualidade do queijo Prato variedade Lanche. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 28, n. 168, p. 1-8, 1973.

HUGENHOLTZ, J., EXTERKATE, F.A., KONINGS, W.N. The proteolytic systems of *Streptococcus cremoris*: an immunological analysis. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 48, n. 6, p. 1105-1110, 1984.

HULL, M.E. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of proteins in milk. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 30, n. 11, p. 881-884, 1947.

HUMBERT, G., GUINGAMP, M.F., KOUOMEGNE, R., LINDEN, G. Measurement of proteolysis in milk and cheese using trinitrobenzene sulphonic acid and a new dissolving reagent. Journal of Dairy Research, London, v. 57, n.1, p. 143-148, 1990.

HWANG, I.K., KAMINOGAWA, S., YAMAUCHI, K. Purification and properties of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris*. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, v. 45, n. 1, p. 159-165, 1981.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed., São Paulo: IAL, 1985. v. 1, 371 p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the total nitrogen content of milk by Kjeldahl method. Bruxelas, FIL/IDF, 1962. 3p. (FIL/IDF, 20).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the protein content of processed cheese products. Bruxelas, FIL /IDF, 1964. 3p. (FIL/IDF, 25).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the total solids content of cheese and processed cheese. Bruxelas, FIL/IDF, 1982. 2p. (FIL/IDF, 4A).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bruxelas, 1991. n. 261, 36p.

JARRET, W.D., ASTON, J.W., DULLEY, J.R. A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese. The Australian Journal of Dairy Technology, Victoria, v. 37, n. 2, p. 55-58, 1982.

JOHNSTON, K.A., DUNLOP, F.C., COKER, C.J., WARDS, S.M. Comparisons between the electrophoretic pattern and textural assessment of aged Cheddar cheese made using various levels of calf rennet or microbial coagulant (Rennilase 46L). International of Dairy Journal, London, v. 4, n. 4, p. 303-327, 1994.

KAMALY, K.M., MARTH, E.H. Enzyme activities of *lactic Streptococci* and their role in maturation of cheese: a review. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 72, n. 8, p. 1945-1966, 1989.

KAMALY, K.M., TAKAYAMA, K., MARTH, E.H. Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, and their mutants. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 73, n. 2, p. 280-290, 1990.

KAMINOGAWA, S., YAMAUCHI, K. Decomposition of β-casein by milk protease. Similarity of the decomposed products to temperature-sensitive and R-caseins. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, v. 36, n. 2, p. 255-260, 1972a.

KAMINOGAWA, S.,YAMAUCHI, K. Acid protease of bovine milk. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, v. 36, n. 13, p. 2351-2356, 1972b.

KAMINOGAWA, S., AZUMA, N., HWANG, I.K., SUZUKI, Y., YAMAUCHI, K. Isolation and characterization of a prolidase from *Streptococcus cremoris* H61. Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, v. 48, n. 12, p. 3035-3040, 1984.

KAMINOGAWA, S., YAN, T.R., AZUMA, N., YAMAUCHI, K. Identification of low molecular weight peptides in Gouda-type cheese and evidence for the formation of these peptides from 23 N-terminal residues of αs_1-casein by proteinases of *Streptococcus cremoris* H61. Journal of Food Science, Chicago, v. 51, n. 5, p. 1253-1256, 1264, 1986.

KHALID, N.M., MARTH, E.H. Purification and partial characterization of a Prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 56, n. 2, p. 381-388, 1990.

KLETER, G. The ripening of Gouda cheese made under strict aseptic conditions. 1. Cheese with no other bacterial enzymes than those from a starter *Streptococcus*. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 30, n. 2/3, p. 254-270, 1976.

KOSIKOWSKY, F.V. Paper partition chromatography of the free amino acids in American Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 34, n. 3, p. 228-234, 1951.

KOSIKOWSKY, F.V., DAHLBERG, A.C. A quantitative appraisal of the free amino acids in foreign type cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 37, n. 2, p. 167-172, 1954.

KOTULA, K.T., NIKAZI, J.N., McGINNIS, N., LOWE, C.M., BRIGGS, G.M. Protein quality of Cheddar cheese compared with casein and fabricated cheese in the rat. Journal of Food Science, Chicago, v. 52, n. 5, p. 1245-1248, 1987.

KUCHROO, C.N., FOX, P.F. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft, Munich, v. 37, n. 6, p. 331-335, 1982a.

KUCHROO, C.N., FOX, P.F. Fractionation of the water soluble-nitrogen from Cheddar cheese: Chemical methods. Milchwissenschaft, Munich, v. 37, n. 11, p. 651-653, 1982b.

KUCHROO, C.N., FOX, P.F. Fractionation of the water soluble nitrogen from Cheddar cheese: Chromatographic methods. Milchwissenschaft, Munich, v. 38, n. 2, p. 76-79, 1983a.

KUCHROO, C.N., FOX, P.F. A fractionation scheme for the water-soluble nitrogen in Cheddar cheese. Milchwissenschaft, Munich, v. 38, n. 7, p. 389-391, 1983b.

KUCHROO, C.N., RAHILLY, J., FOX, P.F. Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzene sulphonic acid. Irish Journal of Food Science and Technology, Dublin, v. 7, n. 2, p. 129-133, 1983.

LAAN, H., KOK, J., HAANDRIKMAN, A.J., VENEMA, G., KONINGS, W.N. Localization and accessibility of antigenic sites of the extracellular serine proteinase of *Lactococcus lactis*. European Journal of Biochemistry, Berlin, v. 204, p. 815-820, 1992.

LAAN, H., SMID, E.J., TAN, P.S.T., KONINGS, W.N. Enzymes involved in the degradation and utilization of casein in *Lactococcus lactis*. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 43, n. 3, p. 327-345, 1989.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALEYE, L.C., SIMARD, R.E., GOSSELIN, C., LEE, B.H., GIROUX, R.N. Assessment of Cheddar cheese quality by chromatographic analysis of free amino acids and biogenics amines. Journal of Food Science, Chicago, v. 52, n. 2, p. 303-307, 1987.

LAU, K.Y., BARBANO, D.M., RASMUSSEN, R.R. Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 74, n. 3, p. 727-740, 1991.

LAW, B.A. Microorganisms and their enzymes in the maturation of cheeses. Progress in Industrial Microbiology, Amsterdam, v. 19, p. 245-283, 1984.

LAW, B.A. The accelerated ripening of cheese. In: DAVIES, F.L., LAW, B.A. Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. London: Elsevier Applied Science, 1984. p. 209-229

LAW, B.A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P.F., ed. Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects. London: Elsevier Applied Science, 1987. v. 1, p. 365-400

LAW, B.A., WIGMORE, A.S. Microbial proteinases as agents for accelerated cheese ripening. Journal of Society of Dairy Technology, Wembley, v. 35, n. 1, p. 75-76, 1982.

LAW, B.A., CASTAÑON, M.J., SHARPE, M.E. The contribution of starter streptococci to flavour development in Cheddar cheese. Journal of Dairy Research, London, v. 43, n. 2, p. 301-311,1976.

LAW, J., FITZGERALD, G.F., DALY, C., FOX, P.F., FARKYE, N.Y. Proteolysis and flavor development in Cheddar cheese made with the single starter strains *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* UC317 or *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 75, n. 5, p. 1173-1185, 1992.

LAWRENCE, R.C., CREAMER, L.K., GILLES, J. Texture development during cheese ripening. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 70, n. 8, p. 1748-1760, 1987.

LAWRENCE, R.C., HEAP, H.A., GILLES, J. A controled approach to cheese technology. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 67, n. 7, p. 1748-1760, 1984.

LE BARS, D., GRIPON, J.C. Specificity of plasmin towards bovine αs_2-casein. Journal of Dairy Research, London, v. 56, n.5, p. 817-821, 1989.

LE BARS, D., GRIPON, J.C. Hydrolysis of αs_1-casein by bovine plasmin. Le Lait, Paris, v. 73, n. 639/640, p. 337-344, 1993.

LEDFORD, R.A., O'SULLIVAN, A.C., NATH, K.R. Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide-gel electrophoresis. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 49, n. 9, p. 1098-1101, 1966.

LE GRAET, Y., LEPIENE, A., BRULE, G., DECRUET, P. Migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages à pâte molle de type Camenbert au cours de l'affinage. Le Lait, Paris, v. 63, n. 629/630, p. 317-332, 1983.

LEMIEUX, L., PUCHADES, R., SIMARD, R.E. Size-exclusion HPLC separation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese made with added *Lactobacillus* strains to accelerate ripening. Journal of Food Science, Chicago, v. 54, n. 5, p. 1234-1237, 1989.

LEMIEUX, L., PUCHADES, R., SIMARD, R.E. Free aminoacids in Cheddar cheese: comparison of quantitation methods. Journal of Food Science, Chicago, v. 55, n. 6, p. 1552-1554, 1990.

LINDQVIST, B., STORGARDS, T., GORANSSON, M.B. Electrophoresis in paper as a mean of studying the ripening process in cheese. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 13., The Hague, 1953, Proceedings, v. 3, p. 1261-1266, 1953.

LINDQVIST, B., STORGARDS, T. Changes in casein during cheese ripening. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 15., London, 1959, Proceedings, v. 2, p. 679-684, 1959.

LYNCH, C.M., McSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F., COGAN, T.M., DRINAN, F. Manufacture of Cheddar cheese under controlled microbiological conditions, with and without adjunct lactobacilli. In: ANNUAL FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY RESEARCH CONFERENCE. 24., Cork, 1994. Proceedings, Cork, University College, 1994.

MABBITT, L.A. Quantitative estimation of the amino acids in Cheddar cheese and their importance in flavour. Journal of Dairy Research, London, v. 22, n. 2, p. 224-231, 1955.

MACHUGA, E.J., IVES, D.H. Isolation and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus acidophilus* R-26. Biochimica et Biophysics Acta, Amsterdam, v.789, n. 1, p. 26-36, 1984.

MADKOR, S.A., FOX, P.F., SHALABI, S.I., METWALLY, N.H. Studies on the ripening of Stilton cheese. Proteolysis. Food Chemistry, London, v. 25, n. 1, p. 13-29, 1987.

MANNING, D.J. Cheddar cheese flavour studies. II. Relative flavour contributions of individual volatile components. Journal of Dairy Research, London, v. 46, n. 3, p. 523-529, 1979a.

MANNING, D.J. Chemical production of essential Cheddar cheese flavour compounds. Journal of Dairy Research, London, v. 46, n. 3, p. 531-537, 1979b.

MARCOS, A., ESTEBAN, M.A., LEON, F., FERNANDEZ-SALGUERO, J. Electrophoretic pattern of European cheeses: comparison and quantitation. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 62, n. 6, p. 892-900, 1979.

MARSILI, R. Monitoring chemical changes in Cheddar cheese during aging by High Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography techniques. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 68, n. 12, p. 3155-3161, 1985.

MATHESON, A.R. The immunochemical determination of chymosin in cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 16, n. 1, p. 33-41, 1981.

McGREGOR, J.U., WHITE, C.H. Effect of enzyme treatment and ultrafiltration on the quality of low fat Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 73, n. 3, p. 571-578, 1990.

McGUGAN, W.A., EMMONS, D.B., LARMOND, E. Influence of volatile and nonvolatile fractions on intensity of Cheddar cheese flavor. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 62, n. 3, p. 398-403, 1979.

McMAHON, D.J., BROWN, R.J. Effects of enzyme type on milk coagulation. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 68, n. 3, p. 628-632, 1985.

McSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F. Cheese: methods of chemical analysis. In: FOX, P.F., ed. Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1993. v. 1, p 341-388.

McSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F., LAW, J. Contribution of cell wall-associated proteinases of *Lactococcus* to the primary proteolysis of β-casein in Cheddar cheese. Milchwissenschaft, Munich, v. 48,n. 6, p. 319-421, 1993a.

McSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F., LUCEY, J.A., JORDAN, K.N., COGAN, T.M.. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. International of Dairy Journal, London, v. 3, n. 6, p. 613-634, 1993b.

McSWEENEY, P.L.H., OLSON, N.F., FOX, P.F., HEALY, A., HØJRUP, P. Proteolytic specificity of plasmin on bovine αs_1-casein. Food Biotechnology, New York, v. 7, n. 2, p. 143-158, 1993c.

McSWEENEY, P.L.H., OLSON, N.F., FOX, P.F., HEALY, A., HØJRUP, P. Proteolytic specificity of chymosin on bovine αs_1-casein. Journal of Dairy Research, London, v. 60, n. 3, p. 401-412, 1993d.

McSWEENEY, P.L.H., POCHET, S., FOX, P.F., HEALY, A. Partial identification of peptides from the water-insoluble fraction of Cheddar cheese. Journal of Dairy Research, London, v. 61, n. 4, p. 587-590, 1994.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

MERCIER, J.C., BRIGNON, G., RIBADEAU-DUMAS, B. Structure primarie de la caséine κ B-bovine. Séquence complète. European Journal of Biochemistry, Berlin, v. 35, n.2, p. 222-235, 1973.

MERCOSUL Regulamento técnico Mercosul de identidade e qualidade do queijo Prato. In: Regulamentos técnicos de identidade de produtos lácteos. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária - MAARA. Secretaria da Agropecuária - DAS. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA, Portaria 358 de 04 de setembro de 1997, Brasília.

MEYER, J., JORDI, R. Purification and characterization of X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus lactis* and from *Streptococcus thermophilus*. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 70, n. 4, p. 738-745, 1987.

MONNET, V., BOCKELMANN, W., GRIPON, J.C., TEUBER, M. Comparison of cell wall proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AC1 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. II. Specificity towards bovine β-casein. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 31, n. 2, p. 112-118, 1989.

MONNET, V., CHAPOT-CHARTIER, M.P., GRIPON, J.C. Les peptidases des lactocoques. Le Lait, Paris, v. 73, n. 637/638, p. 97-108, 1993.

MONNET, V., LEY, J.P., GONZALEZ, S. Substrate specificity of the cell envelope-located proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. International Journal of Biochemistry, Oxford, v. 24, n.5, p. 707-718, 1992.

MONNET, V., NARDI, M.,CHOPIN, M.C., GRIPON, J.C. Biochemical and genetic characterization of Pep F, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 51, n. 5, p. 3271-3276, 1994.

MOORE, S., STEIN, W.H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 176, n. 2, p. 367-372, 1948.

MOORE, S., STEIN, W.H. Procedure for the chromatographic determination of amino acids on four percent cross-linked sulfonated polystyrene resins. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 211, n. 4, p. 893-906, 1954a.

MOORE, S., STEIN, W.H. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 211, n. 4, p. 907-915, 1954b.

MOU, L., SULLIVAN, J.J., JAGO, G.R. Peptidase activities in Group N streptococci. Journal of Dairy Research, London, v. 42, n. 1, p. 147-155, 1975.

MULVIHILL, D.M., FOX, P.F. Proteolysis of αs_1-casein by chymosin: influence of pH and urea. Journal of Dairy Research, London, v. 44, n. 3, p. 533-540, 1977.

MULVIHILL, D.M., FOX, P.F. Proteolysis of bovine β-casein by chymosin: influence of pH, urea and sodium chloride. Irish Journal of Food Science and Technology, Dublin, v. 2, n. 3, p. 135-139, 1978.

MULVIHILL, D.M., FOX, P.F. Proteolytic specificity of chymosin on bovine αs_1-casein. Journal of Dairy Research, London, v. 46, n. 4, p. 641-651, 1979a.

MULVIHILL, D.M., FOX, P.F. Proteolytic specificity of chymosin and pepsin on β-caseins. Milchwissenschaft, Munich, v. 34, n. 11, p. 680-683, 1979b.

MUSET, G., MONNET, V., GRIPON, J.C. Intracellular proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. Journal of Dairy Research, London, v. 56, n. 5, p. 765-778, 1989.

NELSON, J.H. Impact of new milk clotting enzymes on cheese technology. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 58, n. 12, p. 1739-1750, 1975.

NELSON, J.H., JENSEN, R.G., PITAS, R.E. Pregastric esterase and other oral lipases - a review. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 60, n. 3, p. 327-362, 1977.

NEVIANI, E., BOQUIEN, C.Y., MONNET, V., PHAN THANH, L., GRIPON, J.C. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 55, n. 9, p. 2308-2314, 1989.

NIVEN, G.W. Purification and characterization of aminopeptidase A from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 712. Journal of General Microbiology, London, v. 137, n. 2, p. 1207-1693, 1991.

NOOMEN, A. Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 29, n. 2/3, p. 153-161, 1975.

NOOMEN, A. A rapid method for the estimation of the dissolved and the undissolved nitrogen compounds in cheese. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 31, n. 2/3, p. 163-176, 1977.

NOOMEN, A. Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meshanger type). 1. Activity of milk protease. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 32, n. 1, p. 26-48, 1978.

NOOMEN, A. The role of the surface flora in the softening of cheeses with a low initial pH. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 37, n. 4, p. 229-232, 1983.

OHERN, J.A., TUCKEY, S.L. Relation of flavour development in Cheddar cheese to chemical changes in fat of the cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 52, n. 5, p. 598-607, 1969.

O'KEEFFE, R.B., FOX P.F., DALY, C. Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. Journal of Dairy Research, London, v. 43, n. 1, p. 97-107, 1976.

O'KEEFFE, A.M., FOX, P.F., DALY, C. Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. Journal of Dairy Research, London, v. 45, n. 3, p. 465-477, 1978.

OLIVECRONA, T., VILARÓ, S., BENGTSSON-OLIVECRONA, G. Indigenous enzymes in milk. II. Lipases in milk. In: FOX, P.F., ed. Advanced dairy chemistry. 1- Proteins. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 292-310

OLIVEIRA, J. S. Queijo: fundamentos tecnológicos. 2.ed. São Paulo: Ícone, 1986. 146 p.

OLLIKAINEN, P. Titration - a rapid method for the determination of proteolysis in cheese. Journal of Dairy Research, London, v. 57, n. 1, p. 149-150, 1990.

OLLIKAINEN, P., KIVELA, T. The importance of plasmin in Swiss-type cheese ripening. Milchwissenschaft, Munich, v. 44, n. 4, p. 204-206, 1989.

ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. 1. Background and theory. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, n. 121, p. 321-349, 1964.

O'SULLIVAN, M., FOX, P.F. A scheme for the partial fractionation of cheese peptides. Journal of Dairy Research, London, v. 57, n. 1, p. 135-139, 1990.

PEARCE, K.N. Use of fluorescamine to determine the rate of release of the caseino-macropeptide in rennet treated milk. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 14, n. 3, p. 233-239, 1979.

PEARCE, K.N., KARAHALIOS, D., FRIEDMAN, M. Ninhydrin assay for proteolysis in ripening cheese. Journal of Food Science, Chicago, v. 53, n. 2, p. 432-438, 1988.

PHAM, A.-M., NAKAI, S. Application of stepwise discriminant analysis to High Pressure Chromatography profiles of water extract for judging ripening of Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 67, n. 7, p. 1390-1396, 1984.

PHELAN, J.A. Milk coagulants: an evaluation of alternatives to standard calf rennet. National University of Ireland, Cork, 1985. [PhD Thesis].

POLO, C., RAMOS, M., SANCHES, R. Free amino acids by high performance liquid chromatography and peptides by gel electrophoresis in Mahon cheese during ripening. Food Chemistry, London, v. 16, n. 2, p. 85-96, 1985.

POLYCHRONIADOU, A. A simple procedure using trinitrobenzenesulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese. Journal of Dairy Research, London, v. 55, n. 4, p. 585-596, 1988.

PRIETO, B., FRESNO, J.M., CARBALLO, J., BERNARDO, A., MARTIN SARMIENTO, R. Biochemical characteristics of León raw cow milk cheese, a Spanish craft variety. Sciences des Aliments, Paris, v. 14, n. 2, p. 203-215, 1994.

PUCHADES, R., LEMIEUX, L., SIMARD, R.E. Sensitive, rapid and precise determination of L-glutamic acid in cheese using a flow injection system with immobilized enzyme column. Journal of Food Science, Chicago, v. 54, n. 2, p. 423-426, 1989.

RAMOS, M., CACERES, I., POLO, C., ALONSO, L., JUAREZ, M. Effect of freezing on soluble nitrogen fraction of Cabrales cheese. Food Chemistry, London, v. 24, n. 4, p. 271-278, 1987.

RANK, T.C., GRAPPIN, R., OLSON, N.F. Secondary Proteolysis of cheese during ripening. A review. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 68, n. 4, p. 801-805, 1985.

REID, J.R., NG, K.H., MOORE, C.H., COOLBEAR, T., PRITCHARD, G.G. Comparison of bovine β-casein hydrolysis by P_I and P_{III}-type proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Applied of Microbiology and Biotechnology,, Berlin, v. 36, n. 3, p. 344-351, 1991.

REIF, G.D., SHAHANI, K.M., VAKIL, J., CROWE, L.K. Factors affecting B-complex vitamin content of Cottage cheese. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 59, n. 3, p. 410-415, 1976.

REITER, B., SOROKIN, Y., PICKERING, A., HALL, A.J. Hydrolysis of fat and protein in small cheeses made under aseptic conditions. Journal of Dairy Research, London, v. 36, n. 1, p. 65-76, 1969.

RENNER, E. Nutritional aspects of cheese. In: FOX, P.F., ed. Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects. London: Elsevier Applied Science, v. 1, 1987. p. 345-363.

RESMINI, P., MAZZOLINI, C., PELEGRINO, L. Determination of whey proteins in cheese. Latte, Milan, v.7, n. 7/8, p. 548-558, 1982.

REVILLE, W.J., FOX, P.F. Soluble proteins in Cheddar cheese: a comparison of analytical methods. Irish Journal of Food Science and Technology, Dublin, v. 2, n. 1, p. 67-76, 1978.

RICHARDSON, B.C., PEARCE, K.N. The determination of plasmin in dairy products. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 16, n. 3, p. 209-220, 1981.

ROEFS, S.P..F.M., WALSTRA, P., DALGLEISH, D.G., HORNE, D.S. Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 39, n. 2, p. 119-122, 1985.

ROGICK, F.A. Estudo sobre a tecnologia do queijo Prato. Boletim de Indústria Animal, Nova Odessa, v. 12, p. 131-148, 1951.

ROTHE, G.A.L., HARBOE, M.K., MARTINY, S.C. Quantification of milk-clotting enzymes in 40 commercial bovine rennets, comparing rocket immunoelectrophoresis with an activity ratio assay. Journal of Dairy Research, London, v. 44, n. 1, p. 73-77, 1977.

SAMPLES, D.R., RICHTER, R.L., DILL, C.W. Measuring proteolysis in Cheddar cheese slurries: Comparison of Hull and trinitrobenzene sulfonic acid procedures. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 67, n. 1, p. 60-63, 1984.

SANTORO, M., LEONE, A.M., LA NOTTE, E., LIUZZI, V.A. Fractionation of soluble nitrogen in Provolone cheese. I. Milchwissenschaft, Munich, v. 42, n. 11, p. 709-712, 1987.

SCHIFTAN, T.Z., KOMATSU, I. Estudos sobre a composição do queijo Prato consumido na cidade de São Paulo. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 35, n. 207, p. 33-38, 1980.

SCHIMIDT, D.G. Colloidal aspects of caseins. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v.34, n. 1, p. 42-64, 1980.

SCHIMIDT, D.G. Association of caseins and casein micelle structure. In: FOX, P.F., ed. Developments in dairy chemistry. London: Elsevier Applied Science, 1982. v. 1, p. 61-86.

SCOTT, K.J. Micronutrients in milk products. In: RENNER, E. Micronutrients in milk and milk-based food products. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 71-123

SERRES, L., AMARIGLIO, S., PETRANSXIENE, D. Controle de la qualité des produits laitiers. Paris: Ministère de l'Agriculture. Direction des Services Vétérinaires. 1973, v. 1 [Chimie VII-6].

SHALABI, S.I., FOX, P.F. Electrophoretic analysis of cheese: Comparison of methods. Irish Journal of Food Science and Technology, Dublin, v.11, n.2, p. 135-151, 1987.

SILVA, P.H.F., PINHEIRO, A.J.R., GOMES, J.C., PARREIRAS, J.F.M., FURTADO, M.M. Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 50, n. 295, p. 15-29, 1995.

SINGH, A., SRINIVASAN, R.A., DUDANI, A.T. Studies on exocellular and endocellular lipases of some of the lipolytic bacteria. Milchwissenschaft, Munich, v. 28, n. 3, p. 164-166, 1973.

SINGH, T.K., FOX, P.F., HEALY, A. Water-soluble peptides in Cheddar cheese: Isolation and identification of peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction. Journal of Dairy Research. London, v. 62, n. 4, p. 629-640, 1995.

SINGH, T.K., FOX, P.F., HØJRUP, P., HEALY, A. A scheme for the fractionation of cheese nitrogen and identification of principal peptides. International of Dairy Journal, London, v. 4, n. 2, p. 111-122, 1994.

SMID, E.J., POOLMAN, B., KONINGS, W.N. Casein utilization by *Lactococci*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 57, n. 9, p. 2447-2452, 1991.

SMITH, A.M., NAKAI, S. Classification of cheese varieties by multivariate analysis of HPLC profiles. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, Ottawa, v. 23, n. 1, p. 53-61, 1990.

SNOEREN, T.H.M., KLOK, H.J., VAN HOOYDONK, A.C.M., DAMMAN, A.J. The voluminosity of casein micelles. Milchwissenschaft, Munich, v.39, n. 8, p. 461-463, 1984.

SPACKMAN, D.C., STEIN, W.H., MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. Analytical Chemistry, Washington, v. 30, n. 9, p. 1190-1206, 1958.

STADHOUDERS, J., VERINGA, H.A. Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 27, n. 2, p. 77-91, 1973.

STADHOUDERS, J., TOEPEL, L., WOUTERS, J.T.M. Cheese making with Prt^- and Prt^+ variants of N-streptococci and their mixtures. Phage sensitivity, proteolysis and flavour development during ripening. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 42, n. 2, p. 183-193, 1988.

STEPANIAK, L., FOX, P. F. Characterization of the principal intracellular endopeptidase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MG1363. International of Dairy Journal, London, v. 5, n. 6, p. 699-713, 1995.

STERNBERG, M.Z. Microbial rennets. Advances in Applied Microbiology, New York, v. 20, p. 135-152, 1976.

STRANGE, E.D., MALIN, E.L., VAN HEKEN, D.L., BASCH, J.J. Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. Journal of Chromatography, Amsterdam, v. 624, n. 1, p.81-102,1992.

TAN, P.S.T., KONINGS, W.N. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 56, n. 2, p. 526-532, 1990.

TAN, P.S.T., CHAPOT-CHARTIER, M.P., POS, K.M., ROSSEAU, M., BOQUIEN, C.Y., GRIPON, J.C., KONINGS, W.N. Localization of peptidases in lactococci. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 58, n. 1, p. 285-290, 1992.

TAN, P.S.T., POOLMAN, B., KONINGS, W.N. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. Journal of Dairy Research, London, v. 60, n. 2, p. 269-286.1993.

TAN, P.S.T., POS, K.M., KONINGS, W.N. Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 57, n. 12, p. 3593-3599, 1991.

THOMAS, T.D. Acetate production from lactate and citrate by non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 22, n.1, p. 25-38, 1987.

THOMAS, T.D. Oxidative activity of bacteria from Cheddar cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 21, n.1, p. 37-47, 1986.

THOMAS, T.D., CROW, V.L. Mechanism of D(-) lactic acid formation in Cheddar cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 18, n. 2, p. 131-141, 1983.

THOMAS, T.D., MILLS, O.E. Proteolytic enzymes of starter bacteria. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 35, n. 3/4, p. 255-273, 1981.

THOMAS, T.D., PEARCE, K.N. Influence of salt on lactose fermentation and proteolysis in Cheddar cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 16, n. 3, p. 253-259, 1981.

THOMAS, T.D., PRITCHARD, G.G. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 46, n.2, p. 245-268, 1987.

TRIEU-CUOT, P., GRIPON, J.C. A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. Journal of Dairy Research, London, v. 49, n. 3, p. 501-510, 1982.

TUNICK, M.H., MACKEY, K.L., SHIEH, J.J., SMITH, P.W., COOKE, P., MALIN, E.L. Rheology and microstructure of low-fat Mozzarella cheese. International of Dairy Journal, London, v. 3, n. 6, p. 649-662, 1993.

TURNER, K.W., THOMAS, T.D. Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 15, n. 3, p. 265-276, 1980.

TURNER, K.W., MORRIS, H.A., MARTLEY, F.G. Swiss-types cheese. II. The role of thermophilic lactobacilli in sugar fermentation. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 18, n. 2, p. 117-124, 1983.

VAKALERIS, D.G., PRICE, W.C. Rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 42, n. 2, p. 264-276, 1959.

VAKALERIS, D.G., OLSON, N.F., PRICE, W.V., KNIGHT, S.G. A study of the ripening of Dariworld and Cheddar cheese with special emphasis on proteolysis. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 43, n. 12, p. 1058-1067, 1960.

VAN BOVEN, A., TAN, P.S.T., KONINGS, W.N. Purification and characterization of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris* Wg2. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 54, n. 1, p. 43-49, 1988.

VAN DENDER, A.G.F., VALLE, J.L.E. do, ARDITO, E.F.G., FIGUEIREDO, I.B. Estudo de métodos de aceleração no processo de fabricação do queijo tipo Prato. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 11, n. 247, p. 3-13, 1986.

VENEMA, D.P., HERSTEL, H., ELENBAAS, H.L. Determination of the ripening time of Edam and Gouda cheese by chemical analysis. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 41, n. 3, p. 215-226, 1987.

VISSER, F.M.W. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 2. Development of bitterness and cheese flavour. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 31, n. 3, p. 188-209, 1977a.

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 soluble nitrogen and aminoacid nitrogen fractions. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 31, n. 3, p 210-239, 1977b.

VISSER, F.M.W., de GROOT-MOSTERT, A.E.A. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretical study. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 31, n. 3, p 247-264, 1977.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 35, n. 1, p. 65-88, 1981.

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

VISSER, S., SLANGEN, K.J. On the specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine β-casein. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 31, n. 1, p. 16-30, 1977.

VISSER, S., EXTERKATE, F.A., SLANGEN, C.J., VAN DE VEER, G.J.C.M. Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine αs_1-, β- and κ-casein. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 52, n. 5, p. 1162-1166, 1986.

VISSER, S., ROBBEN, A.J.P.M., SLANGEN, C.J. Specificity of a cell envelope-located proteinase (P_{III}-type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM1 and its action on bovine β-casein. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 35, n. 4, p. 477-483, 1991.

VISSER, S., SLANGEN, K.J., EXTERKATE, F.A., de VEER, G.J.C.M. Action of a cell wall proteinase (P_I) from *Streptococcus cremoris* HP on bovine β-casein. Applied Microbiology Biotechnology, Berlin, v. 29, n. 1, p. 61-66, 1988.

VISSER, S., SLANGEN, K.J., HUP, G. Some bitter peptides from rennet-treated casein. A method for their purification, utilizing chromatographic separation on silica gel. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, v. 29, n. 4, p. 319-334, 1975.

VISSER, S., SLANGEN, K.J., HUP, G., STADHOUDERS, J. Bitter flavour in cheese. 3. Comparative gel-chromatographic analysis on hydrophobic peptide fractions from twelve Gouda-type cheeses and identification of bitter peptides isolated from a cheese made with *Streptococcus cremoris* strain HP. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, 37, n. 3, p. 181-192, 1983.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

WALSTRA, P., JENNESS, R. Dairy chemistry and physics. New York: John Wiley, 1984. p. 96-122.

WALSTRA, P., VAN VLIET, T. Rheology of cheese. Bruxelas: International Dairy Federation, 1982, n.153, p.22-27.

WALSTRA, P., NOOMEN, A., GEURTS, T.I. Dutch types varieties. In: FOX, P.F., ed. Cheese: chemistry, physics and microbiology. London: Elsevier Applied Science 1987a. v. 2, p 45-93.

WALSTRA, P., van DIJK, H.J.M., GEURTS, T.J. The syneresis of Curd. In: FOX, P.F., ed. Cheese: chemistry, physics and microbiology. General Aspects. London: Elsevier Applied Science, 1987. v. 1, p 135-178.

WEAVER, J.C., KROGER, M., THOMPSON, M.P. Free amino acid and rheological measurement on hydrolysed lactose Cheddar cheese during ripening. Journal of Food Science, Chicago, v. 43, n. 2, p. 579-583, 1978.

WOHLRAB, Y., BOCKELMANN, W. Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B14. International of Dairy Journal, London, v. 2, n. 3, p. 345-361, 1992.

WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. Boletim do Leite, Rio de Janeiro, v. 51, n. 661, p. 1-8, 1983.

YAN, T. R., AZUMA, N., KAMINOGAWA, S., YAMAUCHI, K. Purification and characterization of a novel metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61 A metalloendopeptidase that recognizes the size of its substrate. European Journal of Biochemistry, Berlin, v. 163, n.2, p. 259-265, 1987a.

YAN, T.R., AZUMA, N., KAMINOGAWA, S. & YAMAUCHI, K. Purification and characterization of a substrate-size-recognizing metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 53, n. 10, p. 2296-2302, 1987b.

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

ZEVACO, C., DESMAZEAUD, M.J. Hydrolysis of β-casein and peptides by an intracellular neutral protease of *Streptococcus diacetylactis*. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 63. n.1, p. 15-24, 1980.

ZEVACO, C., MONNET, V., GRIPON, J. C. Intracellular X-prolyldipeptidyl peptidase from *Lactococcus lactis* subsp.*lactis*, purification and properties. Journal of Applied Bacteriology, London, v. 68, p. 357-366, 1990.

8. RESUMO

A proteólise é provavelmente o fenômeno mais importante que ocorre durante a maturação da maioria dos tipos de queijos e influencia fortemente suas características de aroma, sabor e textura.

Neste trabalho estudou-se a aplicação de diferentes técnicas analíticas para extração e determinação dos compostos nitrogenados liberados durante a maturação do queijo Prato, compostos esses indicadores da extensão e da profundidade da maturação. Complementando esses estudos, utilizou-se métodos mais específicos como eletroforese em uréia-PAGE e RP-HPLC para avaliação dos peptídeos e aminoácidos formados.

Os resultados mostraram que as frações nitrogenadas estudadas e os métodos utilizados na avaliação direta da proteólise se mostraram adequados para uso em análises de rotina. A determinação espectrofotométrica da tirosina e triptofano comprovou ser uma metodologia adequada para avaliação da intensidade de maturação, podendo ser usada como um método rápido alternativo ao de Kjeldahl. Os grupamentos amínicos livres analisados com TNBS ou ninidrina-cádmio também são técnicas mais rápidas e de fácil execução, além de fornecer informações que refletem melhor as degradações das proteínas durante a maturação.

O acompanhamento da proteólise do queijo Prato ao longo da maturação indicou alto grau de associação entre os resultados obtidos em todos os métodos utilizados, sugerindo que todos podem ser empregados na sua avaliação e monitoramento.

A avaliação instrumental da textura demonstrou a correlação dos atributos adesividade, elasticidade e coesividade com os outros índices usados na avaliação da proteólise, evidenciando que as alterações percebidas pelos consumidores podem ser medidas por parâmetros objetivos.

A análise eletroforética demonstrou o aumento na concentração de peptídeos ao longo da maturação, sendo evidente o desdobramento gradual da αs_1-caseína formando a fração αs_1-I (f24-199) e da β-caseína, formando as frações γ_1, γ_2 e γ_3. A análise por RP-HPLC também demonstrou um aumento no número de picos durante a maturação, com maior variação naqueles eluídos nas regiões intermediária e final da separação.

9. SUMMARY

Proteolysis is probably the most important biochemical event which occurs during the ripening of most cheese varieties, with a major impact on flavour and texture.

This work is about the application of different analytical techniques for extraction and determination of the nitrogen fractions liberated during the maturation of Prato cheese. These compounds are indicators of the extension and depth of maturation. Complementing these studies, more specific methods such as urea-PAGE electrophoresis and RP-HPLC were applied.

The results showed that the nitrogen fractions studied and the methodology used in direct evaluation of the proteolysis are of potential for use in routine applications. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophane confirmed that this procedure is good for estimating the extent of cheese ripening. Although they are considered gross indices, they could be used as an alternative fast method for Kjeldahl. Determinations of total free aminic groups by reaction with TNBS or ninhydrin-cadmium are also fast and easy.

Proteolysis of Prato cheese during the maturation showed a high degree of correlation with the results obtained in all tested methods, suggesting that all of them can be used for its evaluation and monitoring.

Instrumental measurement of texture indicated correlation of the attributes adhesiveness, elasticity and cohesiveness with the other indices used for proteolysis evaluation, meaning that the alterations noticed by the consumers can be measured by objective parameters.

Electrophoretical analysis demonstrated an increase in peptides concentration as ripening progressed, revealing a gradual breakdown of αs_1-casein to αs_1-I (f24-199). There was a degradation of β-casein with a concomitant increase in concentration of γ-caseins. The RP-HPLC analysis also showed an increase in the number of peaks, with large variation in those eluted in the middle and final portion of the chromatogram.