

UTILIZAÇÃO DE PROTEASES DE *CENTAUREA CALCITRAPA* L. NO FABRICO DE QUEIJO DE VACA: EFEITOS MICROBIOLÓGICOS



Patrícia J. M. Reis¹, Pedro L. Lourenço², Ana Domingos²,
Alda Clemente² e F. Xavier Malcata¹

¹Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, P - 4200 - 072 Porto, Portugal

²Departamento de Biotecnologia, Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, P - 1649 - 038 Lisboa, Portugal

Introdução

A proteólise é considerada como o evento bioquímico mais importante durante a maturação do queijo (Fox, 1989; Rank *et al.*, 1985); as caseínas são convertidas em compostos azotados solúveis em água, tais como péptidos e aminoácidos livres, os quais contribuem para o sabor e textura finais do queijo (Fox, 1989). O tipo de coagulante, as enzimas nativas do leite (ex.: plasmina) e a acidificação microbiana são factores que contribuem para a proteólise durante a manufatura e maturação do queijo. A evolução da maturação pode ser seguida por vários métodos, incluindo: fraccionamento com água, ácido tricloroacético (ATC), ácido fosfotúngstico (AFT); cromatografia por exclusão molecular ou troca iónica; e electroforese em gel de poliacrilamida com ureia (EGPA-ureia).

A *Centaurea calcitrapa* é uma planta que se encontra largamente distribuída em Portugal, sendo caracterizada por ser capaz de acumular nas suas folhas e flores enzimas proteolíticas com actividade coagulante sobre as caseínas do leite (Domingos *et al.*, 1992; Tavaría *et al.*, 1997). Extractos obtidos a partir de células em suspensão desta planta foram utilizados como aditivo no processo de manufatura de queijo de vaca pasteurizado. Para estudar a aplicabilidade destas proteínases, compararam-se as características microbiológicas, químicas e bioquímicas destes queijos, com as de queijos manufaturados sem tal extracto, mas coagulados com coalho animal comercial.

Materiais e Métodos

Manufatura do queijo

Os queijos foram manufaturados segundo o protocolo utilizado na fábrica da Lactogal, Avis. O leite de vaca pasteurizado foi dividido em duas porções: 8 queijos foram manufaturados sem mais aditivos e 8 queijos foram manufaturados adicionando extracto vegetal. Dois queijos de cada tipo foram então seleccionados aleatoriamente para análise.

Análises microbiológicas

As amostras de queijo (10 g) foram homogeneizadas em 90 ml de solução de citrato de sódio 2 % (w/v) durante 3 min. As diluições décimais foram feitas em água peptonada a 0.1 % (w/v) e plaqueadas em duplicado sobre meios selectivos para enterobactérias, bactérias ácido-lácticas (*Lactococcus* e *Lactobacilli*), e bolores e leveduras. Todas as determinações foram feitas em duplicado e os resultados expressos em cfu/g_{queijo}.

Análises químicas

O extracto seco dos queijos foi determinado por aquecimento a 160 °C durante 13 min, o conteúdo em sal (NaCl) foi determinado segundo o método modificado de Volhard (Kosikowski, 1982), o pH foi medido directamente no queijo com um eléctrodo de perfuração, o conteúdo de azoto total (AT) foi determinado pelo método do micro Kjeldahl e o conteúdo de gordura foi determinado pelo método de Van Gulik.

Análises bioquímicas

O azoto solúvel em água (ASA), em ATC (ASATC) e em AFT (FSAFT) (McSweeney *et al.*, 1993) foi determinado de acordo com o método do micro Kjeldahl. O índice de extensão da maturação, representado pela razão ASA/AT, o índice de profundidade da maturação, representado pela razão ASATC/AT, e o índice de aminoácidos livres, representado pela razão ASAFT/AT, foram calculados a partir dos dados experimentais. Todas as determinações foram feitas em duplicado, e a média das réplicas utilizada como dado para análises subsequentes. As amostras de ASA e AISA foram analisadas em EGPA-ureia (Andrews, 1983; Shalabi e Fox, 1987), tendo os géis sido corados segundo o método de Blakesley e Boezi (1977). A quantificação das caseínas β e α_s intactas foi feita por densitometria utilizando um densitómetro modelo GS-700 (Bio-Rad).

Análise estatística

Para tratamento estatístico dos resultados, foi feita uma análise de variância utilizando o programa Statview[®] v.4.0 (Haycock *et al.*, 1992).

Referências

- Andrews, A. T. J. 1983. *J. Dairy Res.* 50: 45-55.
Blakesley, R. W., Boezi, J. A. 1977. *Anal. Biochem.* 82: 55-58.
Domingos, A., Clemente, A., Pais, M. S. 1992. *Mededelingen-Van-de-Faculteit-Landbouwwetenschappen-Rijksuniversiteit-Gent*, 57: 1909-1910.
Fox, P. F. 1989. *J. Dairy Sci.* 72: 1379-1400.
Haycock, K., Roth, J., Gagnon, J., Finzer, W. F., Soper, C. 1992. *Statview v.4.0: The ultimate integrated data analysis and presentation system*. Abacus concepts, Berkeley, CA, USA.
Kosikowski, F. V. 1982. *Cheese and Fermented Milk Foods*. Kosikowski and Associates, Brooktondale, New York, USA.
McSweeney, P. L. H., Pochet, S., Fox, P. F., Healy, A. 1994. *J. Dairy Res.* 61: 587-590.
O'Keefe, R. B., Fox, P. F., Daly, C. 1976. *J. Dairy Res.* 43: 97-107.
Rank, T. C., Grappin, R., Olson, N. F. 1985. *J. Dairy Sci.* 68: 801-805.
Shalabi, S. I., Fox, P. F. 1987. *J. Food Sci. Technol.* 11: 135-151.
Sousa, M. J., Malcata, F. X. 1997. *Z. Lebensmittel. Unters. Forsch.* A 205: 97-103.
Tavaría, F. K., Sousa, M. J., Domingos, A., Malcata, F. X., Brodelius, P., Clemente, A., Pais, M. S. 1997. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3760-3765.
Visser, F. M. W. 1977. *Neth. Milk Dairy J.* 31: 210-239.

Resultados e Conclusões

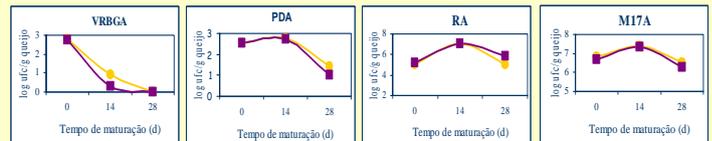


Fig. 1 - Número de enterobactérias em VRBGA, lactococos em MI7A, lactobacilos em RA, e bolores e leveduras em PDA, de queijos produzidos com leite de vaca pasteurizado, coagulado com quimosina, sem (-) ou com (-) adição de extracto de *Centaurea calcitrapa*.

➔ A microbiologia dos queijos contendo extracto vegetal (Fig. 1) não foi significativamente diferente da apresentada por queijos sem tal extracto. O número de enterobactérias decresceu significativamente ao longo da maturação, contrariamente ao número de lactococos e lactobacilos que atingiram o máximo de crescimento aos 14 dias, decrescendo para valores de 10^5 ufc/g_{queijo} no fim da maturação. Os bolores e leveduras estiveram sempre presentes nos queijos, tendo diminuído significativamente em número a partir dos 14 dias de maturação.

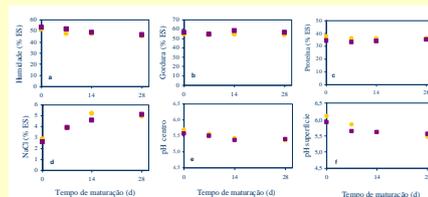


Fig. 2 - Valores médios ao longo da maturação para: (a) conteúdo de humidade, (b) conteúdo de gordura, (c) conteúdo de proteína, (d) conteúdo de NaCl, (e) pH no centro e (f) pH à superfície, em queijos de leite de vaca pasteurizado, coagulado com quimosina, sem (○) ou com (●) adição de extracto de *Centaurea calcitrapa*. Os erros padrões das médias foram: a) 0.872 (○) e 0.520 (●); b) 0.716 (○) e 0.680 (●); c) 0.620 (○) e 0.853 (●); d) 0.417 (○) e 0.077 (●); e) 0.04 (○) e 0.02 (●); f) 0.02 (○) e 0.03 (●).

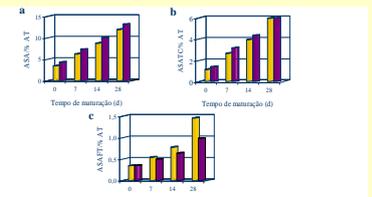


Fig. 3 - Valores médios para o índice de maturação: (a) ASA/AT (índice de extensão da maturação), (b) ASATC/AT (índice de profundidade da maturação), (c) ASAFT/AT (índice de aminoácidos livres), em queijos de leite de vaca pasteurizado, coagulado com quimosina, sem (○) ou com (●) adição de extracto de *Centaurea calcitrapa*. Os erros padrões das médias foram: a) 0.386 (○) e 0.300 (●); b) 0.238 (○) e 0.104 (●); c) 0.097 (○) e 0.113 (●).

➔ Quando adicionado, o extracto vegetal influenciou a composição química dos queijos, mais propriamente o conteúdo de humidade, ao longo do período de maturação, ao nível de significância de 1%. A percentagem maior de humidade foi registada nos queijos contendo tal extracto (Fig. 2-a). O pH à superfície dos queijos foi influenciado pela presença do extracto vegetal, que atingiu os valores mais baixos aos 14 dias (Fig. 2-e e f). A diminuição do pH no centro e à superfície, durante o dessoramento, poderá ser devida à actividade metabólica dos microorganismos no interior do queijo (lactococos e lactobacilos). Os teores de proteína e gordura mantiveram-se constantes ao longo do tempo (Fig. 2-b e c), sem diferenças significativas entre os dois tipos de queijo. O conteúdo de NaCl (Fig. 2-d) aumentou durante os primeiros 14 dias, permanecendo constante sem quaisquer diferenças significativas entre os dois tipos de queijo, ao longo da maturação.

➔ Os níveis de ASA/AT e ASATC/AT (Fig. 3-a e b) em queijos manufaturados com ou sem o extracto de *C. calcitrapa* aumentaram ao longo do tempo de maturação, mas não foram significativamente diferentes entre os dois tipos de queijos. A fracção de azoto solúvel no queijo não só é produzida maioritariamente por acção do coalho (O'Keefe *et al.*, 1976), como também por acção de culturas lácticas de arranque e da plasmina do leite (Visser, 1977). Dado que as diferenças microbiológicas não foram significativas entre os dois tipos de queijo, e as quantidades de plasmina no leite foram supostamente iguais deduziu-se que o extracto possui uma actividade proteolítica insignificante. A razão ASAFT/AT foi significativamente menor em queijos aos quais se adicionou o extracto vegetal relativamente aos queijos manufaturados unicamente com quimosina, o que sugere uma baixa actividade peptídica do extracto de *C. calcitrapa* utilizado. Resultados análogos foram obtidos por Sousa e Malcata (1997) em queijos de ovelha coagulados com *Cynara cardunculus*.

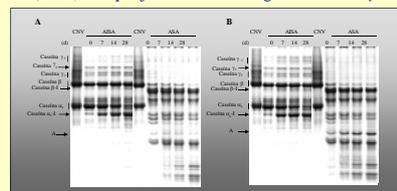


Fig. 4 - EGPA-ureia (12.5 % C, 4 % T; pH 8.9) do azoto solúvel em água (ASA) e do azoto solúvel em água (ASA) em queijos de leite de vaca pasteurizada, coagulados com quimosina, sem (A) ou com (B) adição de extracto de *Centaurea calcitrapa* após 0, 7, 14 e 28 dias de maturação. O caseinato de vaca (CNV) foi utilizado como padrão.

➔ A análise por EGPA-ureia do AISA indicou uma maior percentagem de degradação da caseína α_s do que da caseína β , a qual não foi afectada pela adição de extracto de *C. calcitrapa*. A extensão da degradação da caseína α_s foi superior aos 7 dias de maturação em queijos com extracto vegetal (14.9 % vs. 10.8 % em queijos sem tal extracto), mas aos 28 dias as diferenças deixaram de ser significativas (72.9 % vs. 73.3 % em queijos sem tal extracto). As caseínas γ aumentaram de densidade ao longo da maturação, especialmente em queijos com extracto vegetal. Nos electroforetogramas do ASA observou-se um aumento do número de bandas ao longo do tempo de maturação, com algumas diferenças entre os dois tipos de queijo; uma banda (banda A, Fig. 4) com maior mobilidade electroforética do que caseína α_s , produzida desde o início da maturação, foi produzida mais intensamente nos queijos aos quais se adicionou o extracto de *C. calcitrapa*.

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa Lactogal, S.A. pela colaboração técnica no decurso das experiências. Este trabalho foi desenvolvido no âmbito de um projecto financiado pelo PAMAF.