

ESTUDO DO EFEITO DE CULTURAS ADJUNTAS COMO ALTERNATIVA TECNOLÓGICA PARA MELHORAR A QUALIDADE DO QUEIJO PRATO

IZABELLA T. LOSCALZO¹; LEILA M. SPADOTI²; IZILDINHA MORENO³

N°0801021

RESUMO

Lactobacillus helveticus (LH) apresenta potencial de aplicação em queijo Prato porque apresenta propriedades tecnológicas importantes, como um sistema enzimático mais robusto e maior aptidão à autólise em relação à *Lactococcus lactis* ssp. Este estudo avaliou a influência desta espécie termofílica no crescimento da cultura LD, na composição físico-química e na proteólise do queijo Prato elaborado com leite microfiltrado. Foram elaborados queijos contendo a cultura LD e queijos contendo a cultura LD mais 1% de células viáveis de *Lb. helveticus* (queijos LD+LH). A maturação dos queijos foi realizada a $13^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 60 dias. Os resultados mostraram o efeito positivo da autólise de *Lb. helveticus* na maturação do queijo Prato, sem promover alterações da composição físico-química. Foi concluído que *Lb. helveticus* pode ser empregado como adjunto para reduzir o sabor amargo do queijo Prato.

ABSTRACT

Lactobacillus helveticus has a high potential for use in Prato cheese due to several interesting technological properties, such as a more robust enzyme system and greater susceptibility to autolysis as compared to *Lactococcus lactis* species. This study evaluates the influence of this thermophilic species on the growth of the lactic culture (type LD), the physical-chemical composition and proteolysis of Prato cheese made from microfiltered milk. Cheeses containing a mesophilic aromatic culture (LD cheeses) and cheeses containing a LD culture+1% viable *Lb. helveticus* cells (LD+LH cheeses) were made for the purpose of this study. Ripening was conducted at $13^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 60 days. The results showed the positive effect on the growth and autolysis of *Lb. helveticus* on the manufacture of Prato cheese, without alterations in the physical-chemical composition. It was concluded that *Lb. Helveticus* may be used as adjuncts to to reduce bitterness in Prato cheese.

INTRODUÇÃO

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Nutrição, UNIP, Campinas-SP, e_mail: izalscalzo@yahoo.com.br

² Orientadora: Pesquisadora, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP.

³ Co-orientadora: Pesquisadora, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP.

O sabor e aroma (*flavour*) são desenvolvidos no queijo Prato pelo equilíbrio de diferentes compostos formados pela atividade das bactérias lácticas (BAL) nos principais constituintes do queijo. Da proteólise se originam os pequenos peptídeos e os aminoácidos aromáticos responsáveis pelo sabor e, do catabolismo subsequente dos aminoácidos, são formados os compostos voláteis aromáticos (YVON; RIJNEN, 2001). Neste processo podem também ser originados os compostos promotores de defeitos de sabor e aroma (*off-flavour*) (URBACH, 1993). O amargor, um dos principais defeitos de qualidade dos queijos maturados, é originado por peptídeos de alto peso molecular contendo aminoácidos hidrofóbicos, tais como leucina, prolina e fenilalanina (DESMAZEAUD; GRIPON, 1977).

As espécies *Lactococcus lactis* spp. e *Leuconostoc mesenteroides* spp. são normalmente utilizadas como cultura láctica, denominada de LD, na produção de queijo Prato. Estas espécies são responsáveis pela produção de compostos, nas etapas iniciais de processamento, que desempenham importantes funções tecnológicas, como a acidificação por meio da produção de ácido láctico a partir da lactose (*L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*) e que originam as características típicas deste queijo, como o diacetil produzido do citrato pelas espécies aromatizantes (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*) e o gás carbônico (CO₂) a partir da lactose por *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*. (COGAN, 1995).

A participação do fermento LD na proteólise é mais pronunciada na etapa de estocagem do queijo, sendo realizada sob condições de temperatura e umidade controladas (maturação). Após autólise celular, as peptidases citoplasmáticas das BAL são liberadas no queijo, onde desempenham importantes funções tanto na formação dos compostos responsáveis pelo *flavour*, ou de seus precursores (BERESFORD et al., 2001), como na degradação de peptídeos amargos formados nesse processo (HABIBI-NAJAFI, LEE, 1996). Assim, o desenvolvimento do *flavour* do queijo Prato demanda certo período de tempo, o que consiste num dos principais problemas de competitividade para a indústria de produtos lácteos. Tradicionalmente, este queijo deveria ser maturado por, pelo menos, 60 dias para apresentar suas melhores propriedades sensoriais (ROGICK, 1951). Mas, por fatores econômicos, este período foi diminuído para 45 dias e, atualmente, a legislação (BRASIL, 1997) determina 25 dias, no mínimo.

O Brasil é o sexto produtor mundial de queijos, verificando-se um volume de produção total, em 2005, de 413.618 ton. (ABIQ 2005). A maior parte desta produção é considerada como de consumo popular, correspondendo ao queijo Mussarela (33%), queijo Prato (25%), queijo

Minas Frescal (8%) e requeijão cremoso (7%). Portanto, o queijo Prato consiste no tipo de queijo maturado mais consumido do país, demonstrando sua importância econômica. Esta produção tende a aumentar, mas devido a vários fatores, principalmente a aceleração da maturação, verifica-se que este produto vem perdendo seus padrões de identidade. Portanto, estudos são necessários para se definir alternativas tecnológicas de aceleração da maturação do queijo Prato, sem prejuízos ao seu padrão de identidade e qualidade.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a contribuição da cultura adjunta *Lactobacillus helveticus* (LH) na aceleração da maturação e/ou melhoria do *flavour* do queijo Prato como uma alternativa tecnológica para melhorar a qualidade do queijo Prato. Esta espécie apresenta propriedades tecnológicas importantes, como a capacidade de produzir peptídeos pequenos e aminoácidos livres a partir das caseínas (SASAKI et al., 1995), de degradar peptídeos hidrofóbicos (HABIBI-NAJAFI, LEE, 1996), e de rápida atividade autolítica em condições tecnológicas (DEUTSCH et al., 2002; KENNY et al., 2006).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do leite microfiltrado padronizado

O leite desnatado e o creme de leite utilizados nos processamentos foram obtidos da empresa Salute (Campinas, SP). O leite desnatado foi microfiltrado (leite MF) a $46\pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizando-se uma unidade piloto de microfiltração - MS1 (Tetra-Laval, França), equipada com membranas cerâmicas UTP Membralox (Societe des Céramiques Techniques, Bazet, França), com tamanho médio de poro de $1,4\mu\text{m}$ e área de permeação de $0,24\text{m}^2$. O creme de leite foi tratado a 80°C por 20 minutos. Ambos os produtos, leite MF e o creme de leite, a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$, foram misturados (p/p) de modo a se obter leite MF padronizado a $3,4\pm 1\%$ de gordura.

Processamento do queijo Prato

Foram realizados 4 processamentos de queijos, sendo que em cada um deles foram preparados dois lotes: o controle: adicionado da cultura mesofílica aromática CHN-22 (*Direct Vac Sec* - Chr. Hansen), na concentração recomendada pelo fabricante (queijo QLD), e o teste: adicionado da cultura LD mais 1% (v/v) de *L. helveticus* (Lh-B 02 - Chr. Hansen) (QLD+LH. A cultura LH foi ativada em leite desnatado reconstituído a 12,5% (Molico, Nestlé), previamente esterilizado a $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Os ingredientes foram adicionados na seguinte ordem: cloreto de cálcio (Shynt) a 50% (0,5 ml/kg de leite); corante natural de urucum A-200-WS (Chr. Hansen) (0,082 ml/kg de leite), 20 mL de coalho líquido Estrella

(Chr. Hansen). Após a padronização do leite MF, seguiu-se as seguintes etapas: (i) coagulação do leite (35°C por 60 minutos), (ii) corte da massa (liras de 1,0-1,5cm cada), (iii) descanso da massa (5 minutos), (iv) primeira mexedura a 35-36°C (15 minutos, com agitação lenta), (v) segunda mexedura, elevando-se de 35°C para 41°C a temperatura da mistura (massa+soro), com agitação rápida, e continuando-se esta agitação até obter-se o “ponto de massa” (90 minutos), (vi) pré-prensagem (10 kg/peso para 2 kg de massa por 20 minutos); enformagem (formas de 0,5 kg); (vii) prensagem por 4 horas, com viragens das formas (após 60 minutos e 120 minutos da enformagem); (viii) salga (salmoura a 20° Bé) a 7-8° C por 4,5 horas; (ix) secagem em câmaras a 8-9° C por 3 dias; (x) embalagem em sacos plásticos termoencolhíveis BB300-INC® (Cryovac) e vácuo gerado em Digimat SuperVac GK 185; maturação dos queijos a 13±1°C durante 60 dias. Os queijos foram caracterizados no 3º dia e avaliados com 10, 17, 23, 34, 45 e 60 dias de maturação.

Determinação das características físico-químicas dos queijos

Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas nas amostras de queijos: a) com 3 dias de maturação a 13±1°C: EST, umidade, gordura, GES, Nitrogênio total - NT, proteína total - PT, cinzas, lactose, sal, atividade de água, pH e acidez e b) com 10, 17, 24, 31, 38, 45 e 60 dias de maturação a 13±1°C: NT, PT, NspH4,6 e NNP. As metodologias adotadas foram: extrato seco total (IDF, 1982), Umidade ($U=100-EST\%$), gordura (IAL, 2005), gordura no extrato seco total ($GES\% = G\% \times 100 / EST\%$), NT (IDF, 1964), PT ($NT \times 6,38$), NspH4,6 (VAKALERIS, PRICE, 1959), NNP (ASCHAFFENBURG, DREWRY, 1959), cinzas (HORWITZ, 2005), lactose (ACTON, 1977), NaCl (SERRES et al., 1973), atividade de água (MARCOS et al., 1981), acidez titulável (IAL, 2005), e pH (IAL, 2005).

Evolução do crescimento e autólise das culturas LD e LH

A viabilidade das culturas lácticas foi determinada nos seguintes meios e condições de cultivo: meio diferencial de Nickels e Leesment, modificado segundo VOLGENSEN (1987) (IDF 149:1991) e incubação aeróbica 30°C por 5 dias para a cultura LD; ágar MRS a pH 5,4 e incubação anaeróbica gerada com AnaeroGen (Oxoid, Hampshire, England), a 37°C por 5 dias. Os queijos foram preparadas homogeneizando-se 10g do produto em 90g de solução de citrato de sódio 2% a 40-45°C, durante 4 minutos, em *stomacher* Lab-Blender 400 (Seward Medical., London, United Kingdom) (APHA, 2004). A verificação do decréscimo da viabilidade celular das culturas lácticas, nos queijos, durante processamento e maturação indicou a autólise celular (MORENO, 2003).

Determinação da proteólise

Os queijos foram avaliados durante a maturação quanto aos índices de extensão (IEP) e de profundidade de proteólise (IPM). Os índices foram obtidos em função dos teores de nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH4,6) e nitrogênio solúvel em TCA 12% ou nitrogênio não-protéico (NNP), segundo WOLFSCHOON-POMBO (1983). A proteólise foi também avaliada pela determinação do perfil de proteínas em géis de poliacrilamida em condição renaturante (SDS-PAGE) (gel de separação a 14%, pH 8,8 e gel de concentração a 4%). Foi utilizada uma unidade vertical (Hofer mini VE, Amersham Biociences, EUA). Alíquotas de 20µl dos extratos de queijos tratados com tampão TDL e de 10µl do padrão de peso molecular (Full Range Rainbow™ (RPN 800 – 10.000 a 250.000 KDa, Amersham Biociences, Inglaterra) foram aplicadas aos géis. A separação das amostras foi realizada à voltagem constante de 180V e temperatura ambiente (aproximadamente 35°C) por aproximadamente 1 hora. Os géis foram coloridos com solução de Azul de Coomassie (Amersham Pharmacia Biotech A8, EUA), descoloridos em solução descolorante e documentados em fotodocumentador (Image Master VDS – Pharmacia Biotech, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da cultura LH no crescimento da cultura LD durante o processamento e maturação do queijo Prato

Os resultados médios (n= 4 processamentos) das contagens de células viáveis dos constituintes da cultura LD e de *L. helveticus*, realizadas em diferentes etapas de elaboração e maturação dos queijos, são apresentados na **FIGURA 1**. Comparando-se a evolução dessas culturas nos queijos, observa-se a influência da cultura adjunta LH no crescimento da cultura LD durante as etapas de pré-prensagem, prensagem, salga e de secagem do queijo QLD+LH. A contagem da cultura LD foi maior (4,0 Log UFCmL⁻¹) no queijo LD, no 3º dia de maturação, do que no queijo LD+LH (1,0 Log UFCmL⁻¹) neste mesmo período. Esta população manteve-se praticamente constante durante a maturação, apresentando fraca autólise em determinados períodos, principalmente no 33º e 60º dias. Com relação à cultura LH, verifica-se que esta cultura permaneceu em número elevado durante o processamento do queijo QLD+LH, constatando-se expressiva autólise no período inicial de maturação (3º e 17º dias).

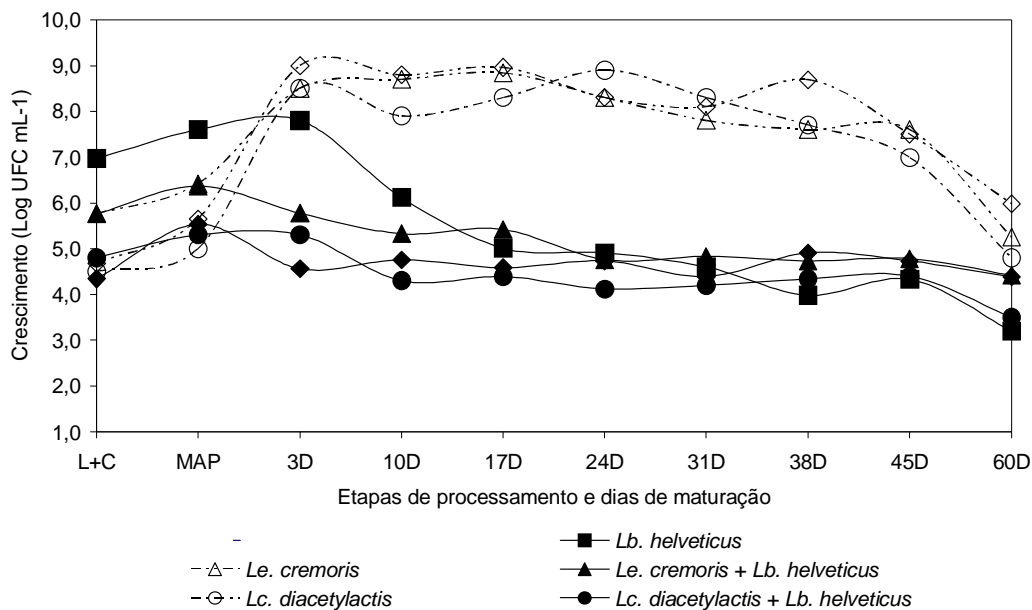


FIGURA 1. Evolução das culturas LD (símbolos vazados) e LD+LH (símbolos cheios) nas etapas de elaboração (L+C: leite inoculado as culturas, MAP: massa antes da pré-prensagem) e nos queijos durante 60 dias de maturação a $13\pm 1^{\circ}\text{C}$. (n=4 processamentos).

Efeito da cultura LH na composição físico-química dos queijos

Os valores médios (n= 4 processamentos) dos parâmetros utilizados para a avaliação da composição físico-química dos queijos QLD e QLD+LH, no 3º dia de maturação, são apresentados na **TABELA 1**. Comparando-se a composição dos queijos QLD e QLD+LH, verifica-se que a adição de LH afetou os parâmetros pH, acidez, lactose, umidade e cinzas do queijo QLD+LH. Isto ocorreu devido à maior capacidade de acidificação desta espécie nos estágios iniciais de processamento do queijo, como verificado pelos valores de lactose residual, pH e acidez. Sabe-se que massas de queijos mais ácidas apresentam uma diminuição da carga elétrica das micelas e, como consequência, há uma menor ligação destas com moléculas de água, resultando na obtenção de queijos mais secos. Assim, os queijos LD+LH, mais ácidos, apresentaram-se mais secos e com maior teor de proteínas. Embora os queijos LD tenham apresentado valores de acidez significativamente maiores que os queijos LD+LH, estes valores encontram-se dentro da faixa encontrada na literatura (SHIFTAN; KOMATSU, 1980). A maior acidez dos queijos LD+LH também influenciou no teor de cinzas. Queijos mais ácidos sofrem uma maior desmineralização, durante seu processo de fabricação, resultando em produtos com menores porcentagens de minerais. Com relação a porcentagem de sal, os valores de ambos os queijos (LD e LD+LH) situaram-se de acordo com a faixa média desejada, de 1,6 a 1,9% (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994 e SHIFTAN; KOMATSU, 1980).

TABELA 1. Composição físico-química média (n=4 processamentos) dos queijos elaborados com fermento LD (QLD) e com fermento LD + *L. helveticus* (QLD+LH), no 3º dia de maturação a 13±1°C.

Parâmetro	Queijo	
	QLD	QLD+LH
Gordura no extrato seco total (GES %)	52,81 ^a	53,87 ^a
Extrato seco total (EST %)	52,25 ^b	55,14 ^a
Umidade (%)	47,75 ^a	44,86 ^b
Gordura (%)	27,61 ^b	29,71 ^a
Proteína (%)	20,14 ^b	21,96 ^a
Cinzas (%)	3,62 ^a	3,37 ^b
Lactose (%)	0,91 ^a	0,15 ^b
Sal (%)	1,71 ^a	1,51 ^a
Atividade de água (Aw)	0,98	0,98
pH	5,54 ^a	4,96 ^b
Ácido lático (%)	0,56 ^b	1,23 ^a

* Médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Avaliação da evolução da proteólise durante a maturação dos queijos

A **FIGURA 2** mostra a evolução média (n=4 processamentos) dos índices de extensão (IEP) e de profundidade de proteólise (IPP) dos queijos QLD e QLD+LH, durante a estocagem a 13±1°C. Verifica-se um aumento significativo destes índices nos queijos QLD (IEP=155% e IPP=288%) e nos queijos QLD+LH (IEP=102% e IPP=282%) durante a maturação. Entre os queijos não são observadas diferenças. Apenas uma tendência dos queijos QLD+LH apresentarem valores superiores (2 vezes) de profundidade de proteólise em relação aos queijos elaborados sem o uso desta cultura adjunta.

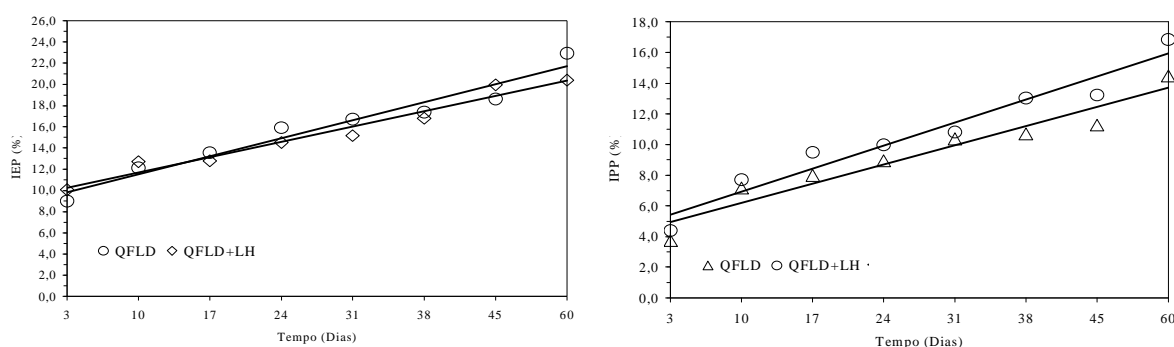


FIGURA 2. Evolução dos índices de extensão da proteólise (IEP) e de profundidade da proteólise (IPP) nos queijos Prato QLD e QLD+LH durante 60 dias a 13±1°C.

Por outro lado, os perfis de proteínas em SDS-PAGE, apresentados na **FIGURA 3**, mostram diferenças qualitativas de proteólise, entre os queijos QLD e QLD+LH, durante a estocagem. A autólise de *L. helveticus* verificada pela diminuição do número de células viáveis, no

período inicial de estocagem do queijo QLD+LH, pôde ser verificada, explicando desta forma, a tendência de maior índice de profundidade da proteólise (IPP) detectada neste queijo. Portanto, a autólise de *L. helveticus* e sua subsequente liberação de peptidases citoplasmáticas no queijo Prato influenciaram na redução do sabor amargo do queijo QLD+LH, conforme verificado por meio da análise sensorial descritiva realizada por uma equipe de especialistas.

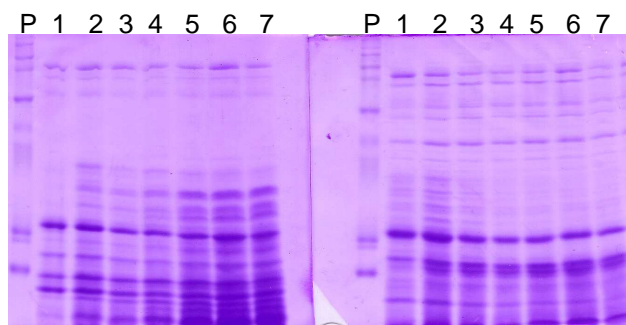


FIGURA 3. Perfil de proteínas dos queijos QLD (A) e QLD+LH (B) durante diferentes dias de estocagem a $13^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. (P - Padrão de peso molecular – 250.000 e 10.000 Kda; 1 e 7 – Queijo no 3^o, 10^o, 17^o, 24^o, 31^o, 38^o e 45^o dias de estocagem).

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a utilização de *L. helveticus* como cultura adjunta complementou o sistema enzimático da cultura LD, promovendo um impacto positivo na redução do sabor amargo no queijo Prato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTON, G H. The determination of lactose in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology** Victoria, v. 32, n. 3, p. 111-114, 1977.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16^a Ed., 2004.
- 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. v.3, p.1631-1637.

BERESFORD, T.P., FITZSIMONS, N.A., BRENNAN, N.L., COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.11, n.4, p.259-274, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Regulamento Técnico para Fixação de Identificação e Qualidade do Queijo tipo Prato**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1997.

COGAN, T.M. Flavour production by dairy starters cultures. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79 suppl., p. 49S-64S, 1995.

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

DEUTSCH, S-M., FERAIN, T., DELCOUR, J., LORTAL, S. Lysis of lysogenic strains of *Lactobacillus helveticus* and first evidence of concomitant *Streptococcus thermophilus* lysis. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 12, p. 591-600, 2002.

HABIB-NAJAFI, M.B., LEE, B.H. Bitterness in cheese: A review. **Critical Reviews of Food Science Nutrition**, Lauderdale, v.36, p.397-411, 1996.

HORWITZ, W. (Ed.) **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 17th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. cap 50, met. 985.35 e 984.27, p. 15-18.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-químicos para Análises de Alimentos**. 4. ed. Brasilia: MS, 2005. 1018p

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Bruxelas: FIL/IDF, 1964. 3p. (FIL/IDF, 25); FIL/IDF, 1962. 3p. (FIL/IDF, 20); FIL/IDF, 1982. 2p. (FIL/IDF, 4A); FIL/IDF, 1991. 3p. (FIL/IDF, 149).

KENNY, O., FITZGERALD, R.J., O'CUINN, BERESFORD, T., JORDAN, K. Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.16, p. 797-804, 2006.

ROGICK, F.A. Estudo sobre a tecnologia do queijo Prato. **Boletim Indústria Animal**, Nova Odessa, v.12, p. 131-148, 1951.

SASAKI, M.; BOSMAN, B.W.; TAN, P.S.T. Immunological and electrophoretic study of the proteolytic enzymes from various *Lactococcus* e *Lactobacillus* strains. **Journal of Dairy Research**, v.62, p.611-620, 1995.

SCHIFTAN, T.Z; KOMATSU, I. Estudos sobre a composição de queijo prato consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n.207, p. 33-38, jan./fev. 1980.

URBACH, G. Relations between cheese flavour and chemical composition. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.3, p.389-422, 1993.

VAKARELIS, D.G., PRICE, W.C. Rapid spectrophotometer method for measuring cheese ripening. **Journal of Dairy Science** Savoy, v.42, n.2, p.264-276, 1959.

VONGENSEN, F. K.; KART, T.; LARSEN, J. J.; KRINGELUN, B.; ELLEKLAER, D.; NIELSEN, E. W. Improved direct differentiation between *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. diacetylactis, and *Streptococcus cremoris* / *Streptococcus lactis* on agar. **Milchwissenschaft** v. 42, n.10, p.646-648, 1987

WOLFSCHOON-POMBO, A.L. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Boletim do Leite**, v.55, n.661, p.1-8, 1983.

YVON, M., RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.11, p.185-201, 2001.