

OBTENÇÃO DE QUEIJO MODELO TIPO “PRATO” PARA SELEÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE BACTÉRIAS LÁTICAS

NATÁLIA C. AZAMBUJA¹; PATRICIA B. ZACARCHENCO²; IZILDINHA MORENO³; ADRIANA TORRES; ALCINA M. LISERRE³; ARIENE G. VAN DENDER³; DARLILA D.A. GALLINA³; ELZA E.T. GRAEL³; FABIANA K.H.S. TRENTO³; LEILA M. SPADOTI³

Nº801022

RESUMO

Neste projeto se estabeleceu metodologia para preparo de queijo modelo, determinou a composição centesimal dos queijos modelo e avaliou-se a capacidade autolítica e proteolítica de culturas lácticas no queijo modelo ao longo de 21 dias a 13°C. Este tempo e temperatura de incubação simulou as condições de maturação de queijo tipo Prato. Foram avaliadas 5 culturas previamente selecionadas quanto a capacidade autolítica e perfil enzimático: *Pediococcus pentosaceus*; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus paracasei*; *Streptococcus uberis* e *Lactobacillus rhamnosus*. O método utilizado para a obtenção do queijo modelo tipo Prato foi adequado, mas requer ajustes para adequação da composição físico-química, principalmente com relação ao teor de umidade. Em função disso, não foi possível confirmar a autólise das culturas avaliadas. Com relação à proteólise, os resultados apresentados pelas culturas estão relacionados com a ação do coalho adicionado. A concentração de leucina não foi um bom indicador para acompanhamento da atividade de peptidases citoplasmáticas das culturas.

ABSTRACT

This project established the methodology used to the preparation of model cheese, determined the centesimal composition of model cheeses and evaluated the autolysis and proteolysis of lactic bacteria in the model cheese storage during 21 days at 13°C. These conditions of time and temperature intended to simulate the conditions of the ripening of Prato cheese. The five cultures selected according their autolytic capacity and enzymatic profile were: *Pediococcus pentosaceus*; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus paracasei*; *Streptococcus uberis* and *Lactobacillus rhamnosus*. The method used in the preparation of the Prato model cheese was successful. However, it will be necessary some adaptations to achieve the humidity level of the Prato cheese. This fact could caused the impossibility in the confirmation of autolysis of the studied cultures. The results obtained in the proteolysis evaluation were related to added rennet like extract activity. The leucine concentration was not adequated to study the cytoplasmatic peptidases of studied cultures.

1. Bolsista CNPq: Graduanda em Engenharia de Alimentos, FEAU/UNIMEP, ✉nathy_egal@yahoo.com.br

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

3. Colaborador: Pesquisadores do TECNOLAT/ITAL /ITAL, Campinas-SP

INTRODUÇÃO

No Brasil há um grande consumo de queijos e outros produtos lácteos. Segundo SILVA et al. (2006) o queijo tipo Prato é a variedade de queijo maturado mais consumida e apreciada. Nos últimos tempos ele vem perdendo suas características e, seu valor comercial devido ao reduzido tempo de maturação a que é submetido por alguns fabricantes sem uso adicional qualquer tecnologia. Hoje a maior parte dos queijos Prato se encontra com maturação incompleta, o que afeta as características para consumo nacional e impossibilita a exportação. Segundo MORENO (2003), a maneira mais promissora de acelerar a maturação é o uso de culturas lácticas com propriedades autolíticas que aceleram a proteólise pela liberação precoce de enzimas no queijo. Além da tendência à forte autólise, as culturas devem apresentar um sistema enzimático ativo nas condições de maturação para o desenvolvimento do aroma, sabor e aroma. Contudo, avaliar o desempenho de um grande número de enzimas, culturas “starters” ou adjuntas em queijos é dispendioso e demorado. Assim, um sistema modelo onde esse desempenho possa ser avaliado rapidamente é desejável, contanto que as principais condições possam ser reproduzidas o mais próximo possível daquelas encontradas no queijo (DI CAGNO et al., 2006), trazendo benefícios econômicos para os laticínios e inserindo no mercado produto com características adequadas para queijo Prato, atendendo melhor o consumidor nacional e potencializando o comércio internacional.

Assim esse projeto objetivou estabelecer metodologia para preparo de queijo modelo, determinar a composição centesimal dos queijos modelo, avaliar a capacidade autolítica das culturas em queijo modelo e suas atividades quanto à proteólise.

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas avaliadas e obtenção dos extratos celulares das culturas

Foram avaliadas as seguintes culturas *Pediococcus pentosaceus* (TR 285); *Lactobacillus plantarum* (TR 260); *Lactobacillus paracasei* (PN 16); *Streptococcus uberis* (TR 570) e *Lactobacillus rhamnosus* (PN 270). Os extratos celulares foram obtidos através da ativação das culturas, inoculadas em 20mL de MRS caldo (Merck) e incubado a 37°C por 24 horas, antes de serem usados para a etapa de inóculo na massa do queijo modelo, no dia de processamento.

Preparo do sistema de queijo modelo

O queijo foi obtido a partir de leite desnatado pasteurizado e microfiltrado, em câmara de fluxo laminar, em assepsia. O leite foi microfiltrado na unidade piloto de microfiltração (Tetra-

Laval, França) equipada com membranas cerâmicas UTP menbralox, com tamanho médio de poro de 1,4 μ m e área de permeação de 0,24m². Ao leite microfiltrado foi adicionado ácido láctico 80% diluído em água estéril, e glucona-delta-lactona a 5%. Em seguida, incorporou-se o coalho (Christian Hansen). A massa obtida foi dividida em 6 porções iguais às quais se adicionou os extratos celulares. A porção sem adição de cultura constituiu o queijo controle. As massas inoculadas foram acondicionadas, assepticamente, em recipientes estéreis, mantidas a 13°C e avaliadas quanto a autólise e proteólise durante 21 dias. A manutenção dos queijos modelos a 13°C, objetivou simular a maturação de queijo Prato. Foram realizados três processamentos.

Determinação da autólise

A autólise foi avaliada pelo decréscimo na viabilidade celular das culturas que foi determinada por inoculação em Agar MRS (APHA, 2004). As placas foram incubadas em temperatura de 37°C por 48 horas.

Análise da Proteólise no queijo modelo

As amostras foram preparadas pela homogeneização de 5g de queijo modelo e 10 mL de água destilada durante 5 minutos (KUCHROO & FOX, 1982). A solução foi mantida a 40°C por 1h, centrifugada a 3.300x g por 30 minutos a 4°C. Esta fração, com a porção nitrogenada solúvel em água, foi usada para determinação dos teores de aminoácidos livres totais. A determinação de α -aminonitrogênio (aminoácidos livres totais) na fração de nitrogênio solúvel em água foi feita pela reação com TNBS (ADLER-NISSEN (1979) e CLEGG et al., 1982). A reação colorimétrica foi realizada com 0,25ml de amostra, 2,0ml de solução tampão fosfato 0,2125M pH 8,2 e 2,0ml de solução TNBS a 0,1%. A mistura foi incubada por 1 hora a 50°C ao abrigo da luz. A reação foi paralisada pela adição de 4,0ml de HCl 0,1N, seguido de repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. A absorbância foi lida a 340nm contra o branco. A concentração de α -NH₂ foi calculada por curva padrão de L-leucina feita com solução contendo 30 μ moles/ml deste aminoácido (BALDINI, 1998).

Caracterização microbiológica das matérias-primas e dos queijos modelo

Foram feitas as análises de coliformes a 30°C e 45°C, contagem total de mesófilos e bactérias lácticas do leite desnatado pasteurizado (LDP), do leite desnatado pasteurizado microfiltrado (LDPM) e do queijo modelo (QM), no dia do processamento. As análises foram realizadas de acordo com SILVA et al. (2007).

Determinação da composição centesimal das matérias-primas e dos queijos modelo

Foram avaliados os seguintes parâmetros: pH (LANARA, 1981) por potenciômetro digital B375 (Micronal); gordura e fosfatase (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985); extrato seco total (IDF, 1982), cinzas (HORWITZ, 1975), densidade, acidez titulável, nitrogênio total e nitrogênio não protéico (AOAC, 1997), nitrogênio não caseíco (BYNUM *et al*, 1985), os valores de nitrogênio foram multiplicados pelo fator 6,38 para a obtenção dos valores equivalentes de proteína, lactose (ACTON, 1977), peroxidase e crioscopia (MARSHALL, 1993). Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização microbiológica e composição físico-química das matérias-primas e queijo modelo

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas e físico-químicas do leite desnatado pasteurizado (LDP), do leite desnatado pasteurizado microfiltrado (LDPM) e do queijo modelo (QM), estão apresentados nas **Tabelas 1 e 2**.

TABELA 1. Caracterização Microbiológica do Leite Desnatado Pasteurizado (LDP), Leite Desnatado Pasteurizado Microfiltrado (LDPM) e Queijo Modelo (QM).

Processamento	Contagem total de mesófilos (UFC)	Contagem de bactérias lácticas (UFC)	Coliformes totais (NNP)	Coliformes fecais (NNP)
LDP	1	< 10	< 10	< 0,3
	2	< 25	<10	< 0,3
	3	< 25	<10	< 0,3
LDPM	1	< 10	< 10	< 0,3
	2	< 25	< 10	< 0,3
	3	< 10	< 10	< 0,3
QM	1	< 10	< 10	< 3
	2	< 10	< 10	< 3
	3	8,0x10	< 10	< 3

UFC unidade formadora de colônias; NMP número mais provável

De acordo com os valores obtidos para as determinações microbiológicas, as amostras de leite e de queijo modelo atendem a legislação brasileira para produtos semelhantes.

TABELA 2. Análises físico-químicas do leite desnatado pasteurizado (LDP), do leite desnatado pasteurizado microfiltrado e do queijo modelo tipo Prato.

Análises	LDP	LDPM	QM
Extrato Seco Total (g/100g)	8,61±0,15	8,38±0,13	33,68±2,97
Gordura (g/100g)	0,10±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Cinzas (g/100g)	0,70±0,03	0,70±0,03	2,27±0,30
Proteína (g/100g)	3,24±0,19	3,09±0,16	28,63±3,40
Lactose (g/100g)	5,40±0,17	4,68±0,21	2,69±0,24
pH	6,72±0,00	6,75±0,00	6,02±0,09
Acidez	16,86±0,45 (°D)	15,56±0,98 (°D)	0,18±0,03 (g/100g)

De acordo com a legislação brasileira os valores indicados de umidade e teor de gordura para queijo tipo Prato são: 36-45% e 45-59 (umidade) e 9% (gordura). Assim, a umidade dos queijos modelo foi superior a estes valores (aproximadamente de 66%), assemelhando-se aos valores de um queijo com muita alta umidade. Quanto ao teor de gordura o queijo modelo apresenta as características próximas a de um queijo desnatado. Embora isto tenha acontecido vale destacar, como colocaram WATKINSON et al. (2001), que um sistema de queijo modelo exige um processo mais simples do que a elaboração de queijo padrão. Por se tratar de sistema modelo, nem todas as características serão as mesmas do queijo padrão.

Evolução do crescimento das bactérias lácticas e proteólise durante a maturação

Na **Tabela 3** são apresentados os resultados das contagens de bactérias lácticas totais dos queijos modelo inoculados com os microrganismos estudados e do queijo controle ao longo do período de maturação.

TABELA 3. Contagem de bactérias lácticas em ágar MRS.

Dias de estocagem	Processamento	Controle	UFC/g				
			PN 16	TR 260	PN 270	TR 285	TR 570
0	1	< 10	1,5x 10 ⁸	1,7x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁷
	2	< 10	7,5x 10 ⁷	1,3x 10 ⁸	7,5x 10 ⁷	5,5x 10 ⁷	3,4x 10 ⁷
	3	< 10	1,7x 10 ⁸	1,6x 10 ⁸	2,4x 10 ⁷	4,8x 10 ⁷	6,3x 10 ⁷
7	1	4,4 x 10 ⁴	8,9x 10 ⁸	3,5x 10 ⁸	4,8 x 10 ⁸	3,9 x 10 ⁸	9,7 x 10 ⁸
	2	< 10	1,1x 10 ⁹	2,5x 10 ⁸	7,8x 10 ⁷	3,9x 10 ⁷	1,1x 10 ⁷
	3	< 10	7,3x 10 ⁸	4,1x 10 ⁸	3,3x 10 ⁸	1,5x 10 ⁹	3,0x 10 ⁸
14	1	8,9 x 10 ⁷	1,2x10 ¹⁰	2,8x 10 ⁹	3,8 x 10 ⁸	1,4 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁹
	2	< 10	8,4x10 ⁸	1,1x10 ⁹	3,0 x 10 ⁸	1,1x10 ⁹	1,1x10 ⁷
	3	< 10	3,2x10 ⁹	1,5x10 ⁹	1,1x10 ⁸	8,7x10 ⁹	4,0x10 ⁸
21	1	1,4 x 10 ⁹	6,5x 10 ⁹	5,6x 10 ⁹	2,6 x 10 ⁸	8,0 x 10 ⁹	4,3 x 10 ⁸
	2	1,3 x 10 ⁹	1,2x 10 ⁹	5,6x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁹	4,5 x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁹
	3	1,0 x 10 ⁹	1,4x 10 ⁹	2,1x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁸	6,3 x 10 ⁹	6,1 x 10 ⁸

Lactobacillus paracasei (PN 16); *Lactobacillus plantarum* (TR 260); *Lactobacillus rhamnosus* (PN 270); *Pediococcus pentosaceus* (TR 285) e *Streptococcus uberis* (TR 570); UFC/g Unidade formadora de colônias por grama de amostra

Verificou-se nos queijos modelo inoculados com as linhagens de bactérias estudadas, que as contagens aumentaram de 1 a 2 ciclos log ao longo do tempo de estocagem das amostras a 13°C. No queijo controle observa-se que as contagens foram maiores aos 21 dias de estocagem. Este fato parece estar relacionado ao crescimento de bactérias chamadas NSLAB. BOURDAT-DESCHAMPS et al. (2004), estudando a autólise de *Lactococcus lactis* spp. em pasta de queijo modelo obtiveram contagens iniciais de NSLAB de 10⁵ UFC/g, e após 28 dias de incubação as contagens de NSLAB atingiram 10⁷ UFC/g. Com relação a autólise, as linhagens estudadas já haviam sido selecionadas, em etapas

anteriores do projeto, dentre as de melhor capacidade autolítica, porém no queijo modelo não se verificou autólise expressiva destas culturas.

Na **Tabela 4** são apresentados os resultados da concentração de leucina nos queijos modelo inoculados com os microrganismos estudados e do queijo controle ao longo do período de maturação.

TABELA 4. Concentração de Leucina presente nos queijos.

Período de manutenção (dias)	Concentração de Leucina ($\mu\text{mols/ml}$)					
	Controle	PN 16	TR 260	PN 270	TR 285	TR 570
0	5,50	5,48	5,36	5,45	5,64	5,59
7	5,58	5,69	5,74	5,70	5,72	5,78
14	13,32	11,03	11,18	10,75	12,87	13,82
21	32,66	27,49	27,60	27,41	27,79	28,25

* médias de dois processamentos

Verificou-se, ao longo do tempo de maturação, um aumento da concentração de leucina de aproximadamente 500% nos queijos modelo para todas as culturas estudadas. Contudo, verificou-se também no queijo controle um aumento similar da concentração de leucina. Estes resultados indicam a forte capacidade proteolítica do coalho adicionado na obtenção dos queijos modelo.

CONCLUSÕES

O método utilizado para a obtenção do queijo modelo tipo Prato foi adequado, mas requer ajustes para adequação da composição físico-química do queijo, principalmente com relação ao teor de umidade. Provavelmente, em função disso, não foi possível confirmar a autólise das culturas avaliadas. Com relação à proteólise, os resultados apresentados pelas culturas estão relacionados com a ação do coalho adicionado. A concentração de leucina não foi um método adequado para acompanhamento da atividade de peptidases citoplasmáticas das culturas autolíticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, G.H. **The Australian journal of dairy technology**. V. 32 n. 3 p. 111-114, 1977.

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

APHA, 2004. **Standard methods for the microbiological examination of dairy products**. 17th ed. American Public Health Association Washington, D.C.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17a edição, Gaithersburg, 1997.

BOUTROU, R., SEPULCHRE, A., GRIPON, J.C. & MONNET, V. Simple tests for predicting the lytic behavior and proteolytic of Lactococcal strains in cheese. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.9, p. 2321-2328, 1998.

BYNUM, D.G., BARBANO, D.M. Whole milk reverse osmosis retentates for Cheddar cheese manufacture: chemical changes during ageing. **Journal Dairy Science.**, v. 68, p. 1-10, 1985.

CLEGG, K.M., LEE, Y.K. & MCGILLIGAN, J.F. Technical note: Iritrobenzene 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.

DI CAGNO, R., QUINTO, M., CORSETTI, A., MINERVINI, F. & GOBBETTI, M. Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. **International Dairy Journal**, v.16, p.119-130, 2006.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 12.ed. Washington : Analytical Chemistry, 1094p. 1975.

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

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

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, 1982.

LANARA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem**. 1981.

MARSHALL, R.T., ed. 1993. **Standard Methods for Examination of Dairy Products**. American Publ. Health Assoc., Washington.

MORENO, I. **Efeito da autólise de culturas lácticas na proteólise do queijo Prato**. São Paulo, 2003. 180p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

SILVA, A.T.; MORENO, I.; VAN DENDER, A. G. F. Alternativas tecnológicas para controlar o “flavour” e acelerar a maturação de queijos. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, Ano10, n.62, p. 52-57. 2006.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo, 3ªed.,Varela, 2007.

WATKINSON, P., COKER, C., CRAWFORD, R., DODDS, C., JOHNSTON, K., MCKENNA, A. & WHITE, N. Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. **International Dairy Journal**. v.11, p.455-464, 2001.