

NATÁLIA CHINELLATO DE AZAMBUJA FERREIRA

**“DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO PRATO COM
ADIÇÃO DE CULTURAS ADJUNTAS VISANDO
MELHORIA DA QUALIDADE E OBTENÇÃO DE
PEPTIDEOS BIOATIVOS”**

**LIMEIRA
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

NATÁLIA CHINELLATO DE AZAMBUJA FERREIRA

**“DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO PRATO COM
ADIÇÃO DE CULTURAS ADJUNTAS VISANDO
MELHORIA DA QUALIDADE E OBTENÇÃO DE
PEPTIDEOS BIOATIVOS”**

Dissertação apresentada a
Faculdade de Ciências Aplicadas
para obtenção do Título de Mestra
em Ciência da Nutrição, Esporte e
Metabolismo.
Área de Concentração: Nutrição.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Adriane Elisabete Antunes de Moraes
Coorientador(a): Dr(a). Izildinha Moreno

Este exemplar corresponde à versão final
dissertação defendida pela aluna Natália
Chinellato de Azambuja Ferreira e orientada pela
Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes



LIMEIRA, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

F413d Ferreira, Natália Chinellato de Azambuja, 1985-
Desenvolvimento de queijo prato com adição de culturas adjuntas visando melhoria da qualidade e obtenção de peptídeos bioativos / Natália Chinellato de Azambuja Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Adriane Elisabete Antunes de Moraes.

Coorientador: Izildinha Moreno.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Queijo Prato. 2. Maturação. 3. Análise sensorial. 4. Proteólise. I. Antunes, Elisabete de Moraes. II. Moreno, Izildinha. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of prato cheese with addition of adjunct cultures aiming at improving the quality and obtaining bioactives peptides

Palavras-chave em inglês:

Prato cheese

Ripening

Sensorial analyze

Proteolysis

Área de concentração: Nutrição

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Adriane Elisabete Antunes de Moraes [Orientador]

Caroline Dário Capitani

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Data de defesa: 12-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Autora: Natália Chinellato de Azambuja Ferreira

Título: “DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO PRATO COM ADIÇÃO DE CULTURAS ADJUNTAS VISANDO MELHORIA DA QUALIDADE E OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS”

Natureza: Mestrado

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas

Data da Defesa: Limeira, 12 de dezembro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes (Orientadora)



Profa. Dra. Caroline Dário Capitani



Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco



RESUMO

A utilização de culturas adjuntas é uma das novas alternativas tecnológicas que vem sendo estudada por pesquisadores de diversos países visando a melhoria da qualidade geral de produtos alimentícios, em especial produtos lácteos como queijos, leites fermentados, iogurte e outros. Outra vantagem é a obtenção de novas variedades de produtos que passam a apresentar sabor, aroma e outras características diferenciadas. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação do papel da cultura de *L. helveticus* (LH-B02 / CHR-Hansen) na acidificação, proteólise, redução do amargor, determinação do perfil de aminoácidos das amostras de queijo Prato e possível liberação de peptídeos bioativos. No estudo os queijos foram fabricados com cultura CHN-22 (cultura mesofílica aromática / CHR-Hansen) com e sem adição da cultura adjunta *L. helveticus* (LH) de modo a verificar se a presença da cultura adjunta influencia na qualidade da maturação do queijo Prato e se esta cultura é possível produtora de peptídeo bioativo inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Para obtenção dos queijos Prato foram realizados três processamentos em planta piloto, com dois tratamentos diferentes, com e sem adição da cultura adjunta de *L. helveticus*. Dentro do período de maturação, ou tempo de estocagem, dos queijos, foram realizadas as análises microbiológicas, físico-químicas, eletroforéticas, cromatográficas e análise sensorial. Os queijos elaborados apresentaram composição típica de queijo Prato e atenderam aos padrões microbiológicos exigidos para o consumo do produto. Em relação ao perfil eletroforético observou-se aumento no desdobramento da fração α_{s1} -caseína pela ação do coalho, com surgimento de uma banda de maior intensidade, correspondente à α_{s1} -caseína, mais evidente no queijo com a adição da cultura de *L. helveticus*. Essa cultura também intensificou a degradação da β -caseína com aparecimento das bandas de γ_{3-} , γ_{1-} e γ_{2-} , já visíveis com 10 dias de maturação. A amostra de queijo adicionado da cultura adjunta foi mais bem aceita sensorialmente do que a amostra controle (apenas adicionado de CHN-22) e queijo comercial diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) destes em alguns parâmetros, tais como aceitação global, aroma, sabor e intenção de compra. Os índices de extensão de proteólise (IEP) e profundidade da proteólise (IPP) dos queijos Prato com e sem adição de cultura adjunta, praticamente não diferiram entre si,

embora em todos os casos tenham sido observados aumento dos índices ao longo do tempo de maturação. Através da análise de aminoácidos livres, as amostras de queijo adicionadas de *L. helveticus* apresentaram teores maiores de aminoácidos comparadas com as amostras sem adição desta cultura. Pelo teste estatístico apenas os aminoácidos histidina, cistina e triptofano não diferiram quantitativamente entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). Na eletroforese capilar (CE) foi encontrado apenas para a amostra adicionada da cultura adjunta aos 31 dias de maturação um pico com tempo de retenção na faixa de 9 a 12 minutos, indicando a possível presença dos tripeptídeos de interesse na amostra.

Palavras-chave: Queijo Prato, *Lactobacillus helveticus*, Maturação, Análise Sensorial, Aminoácidos Livres e Peptídeos Bioativos.

ABSTRACT

The use of adjunct cultures is a new alternative technology that has been studied by researchers from several countries in order to improve the overall quality of food products, especially dairy products such as cheese, fermented milk, yogurt and others. Another advantage is to obtain new varieties of products with new flavors and textures. This study aimed to evaluate the role of the culture *L. helveticus* (LH-B02 / CHR-Hansen) in the acidification, proteolysis, reduction in bitterness, determination of the amino acid profile of Prato cheese and the possible release of bioactive peptides. In the present study the cheeses were manufactured with the culture CHN-22 (mesophilic aromatic culture / CHR-Hansen) with and without the addition of the adjunct culture *L. helveticus* (LH), in order to verify if the presence of the adjunct culture influenced the quality of cheese ripening, and if this culture produced a bioactive peptide that could inhibit the Angiotensin Converting Enzyme (ACE). To obtain the Prato cheese three batches were processed in the pilot plant with two different treatments, with and without the addition of the adjunct culture *L. helveticus*. The microbiological, physicochemical, electrophoretic, chromatographic and sensory analyses were carried out during the period of maturation or storage time of the cheeses. The cheeses produced presented a typical composition of Prato cheese and complied with the microbiological standards required for the consumption of the product. Regarding the electrophoretic profile, an increase in the rupture of the α 1-casein fraction due to the action of the rennet was observed, with the appearance of a band of greater intensity, corresponding to α _{1-I}-casein, more evident in the cheese with the addition of the culture *L. helveticus*. This culture also intensified the degradation of β -casein with the appearance of the bands γ ₃, γ ₁ and γ ₂-casein, already visible after 10 days of ripening. The sample of cheese with the addition of the adjunct culture showed greater sensory acceptability than the control sample (only CHN-22 added) and was statistically different ($p \leq 0.05$) from the commercial cheese for some parameters, such as overall acceptability, aroma, taste and purchase intent. The proteolysis extension (PEI) and depth of proteolysis (DPI) indexes of the Prato cheese with and without addition of the adjunct culture did not differ one from the other, although in all cases increases were observed in these indexes during

the maturation time. The analysis of the free amino acids showed that the samples of cheese with added *L. helveticus* had higher levels of amino acids than the samples without the addition of this culture. The statistical test showed that only the amino acids histidine, cysteine and tryptophan did not differ between the treatments ($p \leq 0.05$). Capillary electrophoresis (CE) showed a peak with a retention time in the range from 9 to 12 minutes after 31 days of ripening in the sample with added adjunct culture, indicating the possible presence of tripeptides of interest in this sample.

Keywords: Prato Cheese, *Lactobacillus helveticus*, Ripening, Sensorial Analyze, Free Amino Acid and Bioactive Peptides.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
1.QUEIJO PRATO.....	26
2.ALIMENTO FUNCIONAL.....	29
2.1.Alimentos funcionais de natureza protéica.....	30
2.1.2. Atividade anti-hipertensiva.....	31
3.PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....	33
4. PRODUTOS ADICIONADOS DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....	34
5.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	37
CAPÍTULO 2 - CONTAGEM SELETIVA DE <i>L. HELVETICUS</i> (LH-B02) UTILIZADO COMO CULTURA ADJUNTA EM QUEIJO PRATO.....	45
RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47
1.INTRODUÇÃO.....	48
2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.1. Culturas Empregadas.....	51
2.2. Processamento de obtenção do queijo Prato.....	51
2.3. Condições de cultivo.....	53
2.4. Preparo do meio de cultura.....	54
2.5. Procedimento de contagem.....	55
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.CONCLUSÃO.....	61
5.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	61
CAPÍTULO 3 - MELHORA DA QUALIDADE DE QUEIJO PRATO PÓS ADIÇÃO DE CULTURA ADJUNTA DE <i>Lactobacillus helveticus</i> (LH-B02).....	64
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	67
1.INTRODUÇÃO.....	68

2.OBJETIVO.....	70
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
3.1. Origem, preparação e avaliação das culturas.....	70
3.2. Fabricação dos queijos.....	71
3.3. Caracterização microbiológica do leite pasteurizado e dos queijos.....	72
3.4. Caracterização físico-química do leite pasteurizado e dos queijos.....	73
3.5. Avaliação dos queijos durante a maturação.....	74
3.5.1. Índices da maturação.....	74
3.5.1.1. Índice de extensão da proteólise.....	74
3.5.1.2. Índice de profundidade da proteólise.....	74
3.5.2. Perfil eletroforético dos queijos (URÉIA-PAGE).....	74
3.6. Determinação de aminoácidos livres.....	75
3.7. Detecção de peptídeos bioativos por Eletroforese Capilar (CE).....	75
3.8. Análise sensorial.....	76
3.9. Análise Estatística.....	77
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4.1. Composição da matéria-prima (leite pasteurizado).....	78
4.2. Caracterização físico-química e microbiológica dos queijos.....	79
4.2.1. Evolução quantitativa de culturas lácticas durante a maturação.....	80
4.3. Avaliação dos queijos durante a maturação.....	83
4.3.1. Índices da maturação.....	83
4.3.2. Perfil Eletroforético dos queijos (URÉIA-PAGE).....	85
4.4. Determinação de aminoácidos livres.....	86
4.5. Detecção da possível presença de peptídeos bioativos por Eletroforese Capilar (CE).....	89
4.6. Análise sensorial.....	91
5.CONCLUSÃO.....	94
6.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	95
ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética.....	100

ANEXO 2. Modelo da ficha utilizada para avaliação sensorial.....	102
---	------------

Aos meus pais, Sebastião e Roberta e a toda minha família, em especial a minha avó Maria Luisa, agradeço toda dedicação, atenção, carinho e pelos ensinamentos que me deram ao longo do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao meu marido, Fernando, que está ao meu lado em todos os momentos com seu amor, sua dedicação, e com seu apoio e incentivo.

Dedico

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me conduzido por todo o meu caminho, me capacitando, dando saúde e forças para superar todas as dificuldades.

À minha orientadora Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes, por todos os ensinamentos, amizade, conselhos, apoio e principalmente, pela confiança que sempre teve em mim e em meu trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Izildinha Moreno, pelas portas que me abriu dando a oportunidade para o desenvolvimento do meu trabalho, pela amizade e confiança depositada em mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À agência financiadora Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro do projeto.

A Profa. Flávia Maria Netto (Laboratório de Bioquímica Nutricional da Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/UNICAMP) pela concessão do espaço do laboratório e pelos ensinamentos a mim passados.

A técnica responsável pelo Laboratório de Bioquímica Nutricional Eliana pela sua dedicação, paciência e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A profa. Mirna Lúcia Gigante da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/FEA) pela participação na minha banca de qualificação, pelos conselhos que engrandeceram meu trabalho através da sua experiência.

A aluna de pós-doutorado Carolina Merheb Dini, pela sua atenção em me ajudar na realização das análises de eletroforese capilar e a técnica do laboratório de instrumentação do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos Dra. Renata M. S. Celeghini pela dedicação do seu tempo durante a realização das análises.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios, que compartilharam experiências pessoais e profissionais, em especial a Rafaela Franco Gatti.

Às amigas muito especiais, Mariana Alves Gragnani Vido e Thaís Marini, essas meninas com quem eu tenho a sorte de conviver dentro e fora do laboratório, fazem meus dias mais alegres com suas palhaçadas, seguraram minhas mãos em momentos difíceis e são pessoas que, com certeza, estarão ao meu lado sempre.

Aos pesquisadores, funcionários e amigos do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios do Instituto de Tecnologia de Alimentos (TECNOLAT / ITAL) Mirela Cristina Martins, Claudia Teixeira, Newton Claudio de Souza Junior, Leila Spadoti, Darlila Aparecida Galina, Patrícia B. Z. Rodrigues de Sá, Ariene Gimenes VandenDender, pelo apoio e por toda ajuda no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

À diretora Dra. Adriana Torres Silva e Alves por me abrir as portas do TECNOLAT possibilitando o desenvolvimento do meu trabalho, através da infraestrutura do centro de pesquisa.

A minha família, meus queridos tios Cláudia e Eder, Luciane e André, aos meus avós Ronaldo, Sebastião e Marimília, Nelson (*in memoriam*) e Maria (*in memoriam*), por toda preocupação, carinho e amor que sempre tiveram por mim. À minha avó Maria Luisa, que sempre vibrou intensamente por mim, sempre me incentivou e, embora não esteja presente fisicamente, com certeza está muito feliz por mais esta conquista.

As minhas cunhadas, Mariana e Carolina, aos seus esposos Umberto e Ruy pela torcida, pelo carinho sempre e por serem pessoas especiais. E sem dúvidas aos meus príncipes, meus sobrinhos Bruno, Guilherme e meu afilhado Felipe por me alegrarem com amor, com seus olhares e com seus sorrisos.

Aos meus irmãos, Luis Augusto (Guto) e Giovanni, que me completam, pelos momentos felizes e de carinho que temos em nossa família, pela nossa amizade, pela nossa união e, principalmente pelo nosso amor, Amo vocês!

Ao meu marido, Fernando, por ser uma pessoa especial, por estar sempre ao meu lado, pela paciência, pelo apoio e incentivo durante o mestrado. Você é muito importante para mim. Amo você!

A minha mãe, Roberta e seu esposo Nelson, ao meu pai Sebastião e sua esposa Sandra por serem presentes e pelo exemplo de seres humanos maravilhosos. Obrigada por tudo, amo vocês!

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

TABELA 1. Variações de MRS Ágar (formulado e suplementado com galactose ou lactose) e condições de incubação para detectar crescimento seletivo de <i>Lactobacillus helveticus</i>	54
TABELA 2. Formulação para obtenção de Ágar MRS.....	55
TABELA 3. Contagens em log UFC.mL ⁻¹ de microrganismos em diferentes meios e condições de incubação.....	57
TABELA 4. Contagem seletiva de <i>L. helveticus</i> em log ufc.g ⁻¹ em queijo Prato no período de 45 dias de maturação, no meio de cultura Ágar MRS acidificado a pH 5.4 e incubação a 45°C.....	60

CAPITULO III

TABELA 1. Caracterização físico-química e microbiológica do leite pasteurizado.....	78
TABELA 2. Caracterização físico-química de queijo Prato com 3 dias de fabricação.....	79
TABELA 3. Caracterização microbiológica de queijo Prato com 3 dias de fabricação.....	80
TABELA 4. Quantificação de aminoácidos livres nos queijos Prato sem e com adição da cultura adjunta de <i>L. helveticus</i>	89
TABELA 5. Resultados obtidos no teste para avaliação da aceitabilidade da aparência, aroma, textura, sabor e do produto de modo global e quanto à intenção de compra das amostras de queijo Prato com 7 dias de fabricação.....	92
TABELA 6. Resultados obtidos no teste para avaliação da aceitabilidade da aparência, aroma, textura, sabor e do produto de modo global e quanto à intenção de compra das amostras de queijo Prato com 30 dias de fabricação.....	94

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

FIGURA 1. Mecanismo vasoconstrictor renina-angiotensina para controle da pressão arterial.....	32
---	----

CAPITULO II

FIGURA 1. Fluxograma geral do processamento do queijo Prato com modificações.....	51
FIGURA 2. Imagem de microscopia eletrônica (aumento de 1000 vezes) da cultura MAC CHN-22 após plaqueamento e contagem em meio de cultura seletivo.....	56
FIGURA 3. Imagem de microscopia eletrônica (aumento de 1000 vezes) da cultura LH-B02 após plaqueamento e contagem em no meio de cultura Ágar MRS (Difco, França) acidificado a pH 5.4.....	59
FIGURA 4. Imagem de microscopia eletrônica (aumento de 1000 vezes) das culturas avaliadas após plaqueamento e contagem nos meios testados para seletividade de <i>L. helveticus</i> , onde observa-se presença de cocos característicos do fermento MAC CHN-22 e bacilos típicos da cultura adjunta LH-B02.....	59

CAPITULO III

FIGURA 1 - Fluxograma geral do processamento do queijo Prato segundo com modificações.....	71
FIGURA 2: Evolução da microbiota no ágar M17 durante os 45 dias de maturação para os queijos fabricados com e sem adição de cultura adjunta.....	81
FIGURA 3. Evolução da contagem no ágar LBS durante os 45 dias de maturação para os queijos fabricados com e sem adição de cultura adjunta.....	81
FIGURA 4. Evolução da contagem seletiva em ágar MRS pH 5,4 durante os 45 dias de maturação para os queijos fabricados com e sem adição de cultura adjunta.....	83

FIGURA 5. Índice de Extensão de Proteólise (IEP) nos queijos com e sem adição de cultura adjunta durante o período de maturação (45 dias).....	84
FIGURA 6. Índice de Profundidade de Proteólise (IPP) nos queijos com e sem adição de cultura adjunta durante o período de maturação (45 dias).....	84
FIGURA 7. Perfil eletroforético dos queijos Prato com e sem adição de cultura adjunta de <i>L. helveticus</i> durante o período de maturação (45 dias). A: Queijo Prato CHN-22 e B: Queijo Prato CHN-22 adicionado de LH.....	86
FIGURA 8. Esquema geral de proteólise decorrente da ação microbiana durante a maturação de queijos: 1 = descarboxilação; 2 = transaminações; 3 = desaminações oxidativas; 4 = degradações; 5 = reduções; 6 = oxidações.....	88
FIGURA 9. Eletroferograma dos padrões Valina-Prolina-Prolina (VPP) e Isoleucina-Prolina-Prolina (IPP) e mistura dos dois padrões.....	90
FIGURA 10. Eletroferograma das amostras de queijo Prato adicionado de <i>L. helveticus</i> após 31 dias de maturação.....	91

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

RESUMO

Nas últimas décadas tem sido observado aumento da consciência dos consumidores e maior busca por alimentação promotora de saúde. Produtos com propriedades funcionais têm sido pesquisados, desenvolvidos e lançados no mercado constantemente. Determinadas culturas microbianas adjuntas têm sido empregadas em queijo visando aceleração da maturação de queijo duro e semi-duro e obtenção de melhorias na qualidade. A cultura *L. helveticus* pode ser empregada em queijo Prato para melhorar as características sensoriais do produto, evitando o sabor amargo e auxiliando na aceleração da proteólise durante o período de maturação do queijo. Outra propriedade de interesse para a cultura de *L. helveticus* é a possibilidade de liberação de tripeptídeos com capacidade de agir como inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) com diminuição da pressão arterial sanguínea, o que resulta em um produto atrativo para pessoas que sofram de hipertensão arterial sistêmica.

Palavras-chave: Queijo Prato, *Lactobacillus helveticus*, Alimentos com Propriedades Funcionais.

ABSTRACT

In recent decades there has been an increase in consumer awareness and interest in health promoting food. Products with functional properties have constantly been researched, developed and launched onto the market. Certain microorganisms have been employed as adjunct cultures to accelerate cheese ripening in hard and semi-hard cheeses and achieve quality improvements. The culture *L. helveticus* may be used in Prato cheese to improve the sensory characteristics by avoiding the bitter taste, and accelerating proteolysis during cheese ripening. Another property of interest of the culture *L. helveticus* is the possible release of tripeptides that have the ability to act as inhibitors of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE), resulting in a decrease in arterial blood pressure, and the production of an attractive product for people suffering from hypertension.

Keywords: Prato Cheese, *Lactobacillus helveticus*, foods with functional properties.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. QUEIJO PRATO

O queijo Prato é um queijo típico brasileiro e atualmente o terceiro mais consumido no país (ABIQ, 2012). Dados recentes da ABIQ (2012) apontam que em 2011, a produção de queijos no país foi de 812.638 toneladas, representando um crescimento de 9,3% quando comparado ao ano anterior. Do total produzido, 161.450 toneladas, aproximadamente 20% foram de queijo Prato. Este produto foi introduzido na década de 20, na região sul de Minas Gerais, por imigrantes dinamarqueses, sendo originário dos queijos Dambo dinamarquês e Gouda holandês. No Brasil, a tecnologia de fabricação do queijo Prato foi adaptada às condições locais, o que explica as diferenças de textura e sabor em relação aos queijos que lhe deram origem (GARCIA, 2007). Sua fabricação é obtida por coagulação enzimática, adicionado de uma pequena quantidade de corante. Por apresentar massa semi-cozida e maturação mais prolongada ganha textura elástica e “cremosa” e sabor pouco ácido. Tipicamente apresenta entre 42-44% de umidade, 1,6-1,9% de sal, pH de 5,2 a 5,4 e 26-29% de gordura (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). Os produtos apresentam características diferentes quanto ao formato e tamanho relacionadas ao tratamento do leite e condições de maturação. A variedade “lanche” é a mais predominante no mercado, apresentando-se em vários tamanhos, moldado na forma de tijolo ou paralelepípedo, pesando entre 0,5 e 3,0 kg (GARCIA, 2007).

De acordo com a Portaria nº 358, de 4 de Setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), o queijo Prato é um “queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como queijo gordo e de média umidade. Para estabilização de suas características específicas, o queijo Prato deve apresentar um período de maturação maior ou igual que 25 dias, devendo ser conservado a uma temperatura não superior a 12°C (BRASIL, 1997). Ainda de acordo com a legislação, o queijo Prato deve apresentar as seguintes características: consistência semidura, elástica, textura compacta, lisa, fechada com alguns olhos pequenos arredondados e/ou algumas

olhaduras mecânicas, cor amarelo ou amarelo-palha, sabor e odor característico de queijo Prato, não possuir crosta, caso possua a crosta deve ser fina, lisa, sem trincas, olhaduras pequenas, bem distribuídas, ou sem olhaduras”.

O queijo Prato apresenta características próprias, as quais são adquiridas por meio do processo de maturação. Nesta etapa do processamento, realizada em condições de temperatura e umidade controladas, 12°C e 70-85% UR (umidade relativa), ocorrem reações bioquímicas que provocam alterações de sabor, odor, textura e consistência (SILVA, 1998).

Os parâmetros de textura de um queijo maturado estão relacionados principalmente com a degradação das proteínas e influenciados por outros fatores, tais como: umidade, relação umidade/caseína, sal e atividade proteolítica e peptidolítica das culturas lácticas (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

O fermento mesofílico MAC CHN-22 (contendo as linhagens acidificantes *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* e as linhagens aromatizantes *L. lactis* subsp. *lactis* biov. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*) é amplamente utilizado na elaboração do queijo Prato. Um período de 45-60 dias de maturação é recomendado para o produto apresentar as suas características ideais de textura e *flavour* (ROGICK, 1951). Com o passar dos anos, entretanto, o tempo de maturação passou a ser um grande desafio econômico para a indústria. Além disso, a evolução crescente da produção, o advento de novas tecnologias, máquinas e equipamentos, e as mudanças de hábitos dos consumidores impulsionaram a indústria a efetuar alterações na tecnologia de elaboração do queijo Prato, no sentido de se obter qualidade e produtividade (VILELA et al., 2012).

Vários estudos demonstraram a influência positiva da microbiota NSLAB na intensificação do *flavour* de vários tipos de queijos, em função da maior atividade proteolítica das mesmas, e em alguns casos, encurtando o período de maturação (BHOWMIK, 1990; GOBBETI ET AL., 1997; REHMAN ET AL., 2000; ALBENZIO ET AL., 2001; BERESFORD ET AL., 2001; CROW ET AL., 2002; WOUTERS ET AL., 2002; WILLIAMS & BANKS, 1997). Portanto, a aplicação de NSLAB como cultura adjunta para acelerar a maturação e intensificar o desenvolvimento do *flavour* dos queijos

maturados passou a ser uma alternativa tecnológica interessante no sentido de melhorar a qualidade sensorial do queijo Prato.

Em estudo recente, três processamentos independentes de queijo Prato foram elaborados: A, contendo somente a cultura CHN-22; B, contendo a cultura CHN-22 mais *L. helveticus* (LH-B02); e C, contendo a cultura CHN-22 mais *L. paracasei subsp. paracasei* PN16 (MORENO, 2003). No sentido de minimizar o efeito da acidificação, as culturas adjuntas foram adicionadas na forma desidratadas a mistura coalhada/soro antes da etapa de cozimento da massa do processamento do queijo. Os queijos B e C adicionados de cultura adjunta apresentaram um aumento da atividade de aminopeptidases específicas para glutamina durante a maturação comparativamente ao queijo A (controle). Entre as culturas adjuntas, o queijo B apresentou maior atividade de glutamina (2,5 vezes maior) que o queijo C (1,4 vezes maior) em relação ao queijo A. Estas diferenças resultaram na maior aceitação do queijo B do que os queijos A e C na avaliação sensorial. A aceitabilidade do aroma e textura aumentou em função da maturação para o queijo B, ao mesmo tempo em que houve diminuição da aceitabilidade para a amostra controle, gerando diferenciação entre as amostras quanto a estes atributos, que não foram detectadas aos 15-16 dias de maturação. Para o queijo B, a classificação da maciez como ideal aumentou com o tempo maturação no período estudado, assim como a percepção como ideal do gosto salgado, ácido e amargo pelos consumidores para estas amostras (MORENO, 2003).

Esse estudo demonstrou conjuntamente que as culturas adjuntas apresentando atividade autolítica e perfil de aminopeptidases específicas para hidrólise dos peptídeos amargos é uma alternativa potencialmente aplicável no sentido de melhorar as propriedades sensoriais do queijo Prato. Inclusive, a adição de cultura adjunta pode direcionar a uma fermentação desejável, suprimindo, dessa forma, o crescimento de espécies de NSLAB potencialmente produtoras de defeitos nos queijos (MORENO, 2003).

Além da promoção de melhorias nas propriedades sensoriais do queijo Prato, independentemente da redução do período de maturação, atualmente os benefícios promovidos à saúde do consumidor por espécies NSLAB tem direcionado as pesquisas

no sentido de agregar maior valor aos queijos maturados. Assim sendo, além da função do *L. helveticus* de hidrolisar peptídeos hidrofóbicos, bem como os peptídeos amargos produzidos da β -caseína (193-209), e de reduzir gradativamente o amargor do queijo; esta espécie também foi associada à produção de peptídeos bioativos (SADAT-MEKMENE et al., 2011). Outras espécies NSLAB apontadas em função dos seus efeitos benéficos são as seguintes (SETTANNI & MOSCHETTI, 2010): (i) efeito probiótico: *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*, (ii) produção de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA): *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*, *E. faecalis*, (iii) produção de ácido γ -aminobutírico: *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. plantarum*, (iii) propriedades antígenotóxicas: *L. paracasei subsp. paracasei*.

2. ALIMENTOS FUNCIONAIS

O termo “alimentos funcionais” foi inicialmente proposto no Japão, em meados de 1980, principalmente em função de uma população sempre crescente de idosos e da preocupação, tanto da população em geral como do governo, na prevenção das doenças crônicas e degenerativas (ARAI, 1993).

Hoje em dia a procura dos consumidores por produtos alimentícios de qualidade e que beneficiam a saúde, têm gerado um aumento na busca por alimentos intitulados “saudáveis”, estimulando dessa forma, inovações e desenvolvimento de novos produtos (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Dentre os “alimentos saudáveis” destacam-se os “alimentos funcionais”. Estes alimentos são definidos como quaisquer alimentos ou ingredientes alimentares capazes de promover benefícios a saúde além de possuírem os nutrientes já tradicionais (HALSTED, 2003). Essa promoção se dá por mecanismo não previsto pela nutrição convencional (SANDERS, 1998).

Uma definição abrangente de alimento funcional seria qualquer alimento, natural ou preparado pelo homem, que contenha uma ou mais substâncias, classificadas como nutrientes ou não-nutrientes, capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos à saúde, podendo retardar o estabelecimento de doenças crônicas e/ou degenerativas e melhorar a qualidade e a expectativa de vida das pessoas (PACHECO & SGARBIERI, 2001). São efeitos que vão além da função

meramente nutricional há muito conhecida, qual seja, a de fornecer energia e nutrientes essenciais em quantidades equilibradas, para a promoção do crescimento normal e evitar desequilíbrios nutricionais (PACHECO & SGARBIERI, 2001).

É importante atentar para o fato de que tais substâncias, fisiologicamente ativas, devem estar presentes nos alimentos funcionais, em quantidades suficientes e adequadas, para produzir o efeito fisiológico desejado. Em outras palavras, não é suficiente que um determinado alimento contenha determinadas substâncias com propriedades funcionais fisiológicas, para que ele seja imediatamente classificado como funcional, fazendo-se necessário a condução de estudos experimentais e clínicos para comprovação do efeito pretendido.

Existem numerosos trabalhos de investigação científica com o objetivo de esclarecer as funções saudáveis dos mais diversos tipos de alimentos ou nutrientes funcionais. Isso fortalece a teoria da real potencialidade da nutrição preventiva que atrai cada vez mais os consumidores preocupados em melhorar seu estado de saúde através da alimentação, sem se importarem demasiadamente com seu custo (BELLO, 1995).

O futuro desta indústria tem apontado para o desenvolvimento de produtos dirigidos para setores específicos do mercado como alimentos para idosos, fórmulas lácteas infantis, produtos recomendados para pacientes imunodeprimidos, diabéticos e hipertensos (BELLO, 1995).

2.1. Alimentos funcionais de natureza protéica

Neste trabalho serão mencionadas apenas algumas das atividades biológicas desempenhadas por alimentos funcionais de natureza protéica, com maior ênfase será dada aos peptídeos com ação anti-hipertensiva.

Os peptídeos em geral são absorvidos principalmente pela via paracelular (vias que não necessitam de transportadores), podendo ser absorvidos por difusão passiva entre os enterócitos (SHIMIZU, 1999). Em seguida, entram para a circulação sanguínea via sistema porta-hepático, atingindo os órgãos específicos, onde exercem suas atividades.

Dentre as propriedades fisiológico-funcionais que os peptídeos podem desempenhar destacam-se:

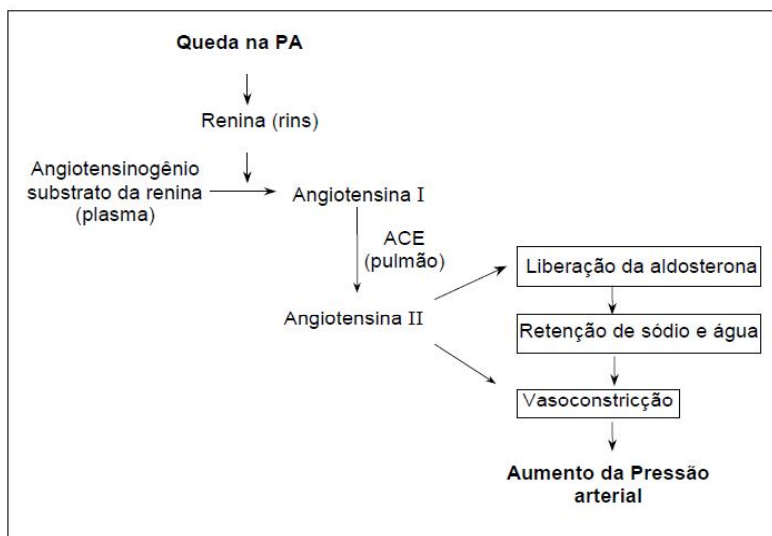
- atividade opióide;
- ação estimulante do sistema imunológico;
- aumento da biodisponibilidade de minerais, particularmente do cálcio;
- atividade anti-úlceras, anti-oxidante e anti-carcinogênica;
- capacidade de complexação aos ácidos biliares; e
- atividade anti-hipertensiva.

2.1.2. Atividade anti-hipertensiva

A pressão arterial (PA) é regulada por vários sistemas inter-relacionados. Os rins têm um papel essencial durante o controle a longo prazo da pressão, através do sistema rim-líquidos corporais, ou seja, quando o corpo tem líquido extracelular em excesso, a PA se eleva provocando um efeito direto sobre os rins que excretam líquido e sódio, fazendo com que a PA volte ao normal. Ao passo que, se a pressão estiver abaixo do normal, haverá um aumento na reabsorção de sódio e na retenção de fluidos (GUYTON e HALL, 2001).

Os rins também controlam o sistema renina-angiotensina. A renina é uma enzima sintetizada e armazenada sob a forma inativa nas células justaglomerulares dos rins. Quando a PA cai, ocorre a liberação da renina para a corrente sanguínea, resultando em uma quebra de seu substrato natural, o angiotensinogênio, e a liberação da angiotensina I (decapeptídeo). Após a formação desse peptídeo, dois de seus aminoácidos são removidos para formar a angiotensina II (PELISSON, 2008).

Essa reação é catalisada pela enzima conversora da angiotensina (ECA), presente no endotélio dos vasos pulmonares. A angiotensina II é um hormônio vasoconstrictor que contribui para o aumento da resistência periférica e também atua sobre as glândulas supra-renais estimulando a secreção de aldosterona que aumenta a reabsorção de sal e água pelos túbulos renais e excreção de potássio (GUYTON e HALL, 2001). O mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina está esquematizado na Figura 1.



ACE = Enzima Conversora de Angiotensina

FIGURA 1. Mecanismo vasoconstrictor renina-angiotensina para controle da pressão arterial (GUYTON & HALL, 2001)

O tratamento da hipertensão está baseado no emprego de medicamentos natriuréticos e vasodilatadores. Os natriuréticos reduzem a reabsorção renal de sódio e água pelo bloqueio do transporte ativo de sódio pelas membranas luminiais e basolaterais do epitélio tubular (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSAO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010). Os medicamentos vasodilatadores aumentam o fluxo sanguíneo renal, relaxando os músculos lisos dos vasos renais ou ainda bloqueando o sistema renina-angiotensina sobre a vasculatura renal (LIMA, 1999).

A importância clínica da ECA só foi reconhecida após a descoberta de que seus inibidores específicos podem ser drogas potenciais no combate à hipertensão (SANJULIANI et al., 2011). Uma variedade de peptídeos obtidos por hidrólise proteolítica manifesta a capacidade de inibir a ACE. Esta ação inibitória foi primeiramente descrita por Oshima (1979) a partir de um hidrolisado de gelatina obtido pelo uso de uma colagenase bacteriana. Posteriormente, Maruyama e Suzuki (1982) testaram caseína intacta e seu hidrolisado triptico, sendo que apenas este último inibiu a ECA. Dando sequência a estes estudos, Maruyama et al. (1985) submeteram os

hidrolisados de caseína a uma digestão adicional com uma endopeptidase prolina-específica extraída do *Flavobacterium meningosepticum*, obtendo um heptapeptídeo bem mais potente.

O efeito dos peptídeos anti-hipertensivos tem sido demonstrado principalmente pela capacidade em inibir a ECA e pela redução da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SRH). A atividade da ECA pode ser expressa em percentual ou como valor IC50, que corresponde à quantidade de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%.

Roy et al. (2000) descreveram a purificação e caracterização de uma enzima sintetizada por *Saccharomyces cerevisiae* e seu emprego na obtenção de um hidrolisado de proteínas do leite com atividade inibitória da ECA. O hidrolisado mais eficiente foi produzido após 3 horas de hidrólise, em pH 4,8, onde o IC50 foi de 0,42mg/mL. No trabalho realizado por Costa (2004), a capacidade em inibir a ECA diminuiu com o aumento do tempo de hidrólise.

3. PEPTÍDEOS BIOATIVOS

As proteínas do leite são consideradas, no momento, as principais fontes conhecidas de uma variedade de peptídeos bioativos (PBA). Os peptídeos podem apresentar propriedades fisiológicas que são benéficas à saúde. Atualmente existem estudos sobre as diversas ações de diferentes peptídeos como, por exemplo, estimulante do sistema imunológico, ação anti-oxidante, ação anti-hipertensiva, ação anti-carcinogênica dentre outras propriedades multifuncionais (PACHECO, ANTUNES, SGARBIERI, 2008). Por administração oral, dependendo da sequência de aminoácidos, os PBA podem afetar os principais sistemas corpóreos - cardiovascular, digestivo, imune e nervoso (SPADOTI & MORENO, 2008).

Dentre as classes de PBA originados da proteólise das caseínas são destacadas as que apresentam, segundo Meisel (1997):

- ✓ Atividade antagonista opióide: Receptores opióides estão localizados no sistema nervoso, endócrino e imune e também no trato gastrointestinal de mamíferos. Proteínas do leites, em especial a β -caseína, após a digestão liberam seqüências peptídicas que ligam-se a receptores opióides, prolongando o tempo

de trânsito gastrointestinal, modulam o transporte intestinal de aminoácidos e influenciam no metabolismo pós prandial, pela estimulação da secreção de insulina e somatostatina.

- ✓ Efeitos imunomoduladores: Imunopeptídeos derivados da caseína, tanto fragmentos da α -caseína quanto β -caseína estimulam a fagocitose de células vermelhas do sangue de carneiros por macrófagos e exerceram efeito protetor contra infecção por *Klebsiella pneumoniae* após administração intravenosa dos peptídeos. Os mecanismos de ação dos peptídeos derivados de proteínas do leite, ao exercerem esse efeito imunomodulatório não está definido, No entanto, resultados obtidos sugerem que peptídeos opióides possam ter efeito imunoreativo de linfócitos via receptor opióide. Podendo haver relação entre sistema imune e peptídeos opióides porque receptores opióides para endorfina estão presentes em linfócitos T e em leucócitos fagocitários humanos. Também é conhecido que linfócitos e macrófagos expressam receptores a vários mediadores biologicamente ativos. E foi sugerido que um resíduo do aminoácido arginina na porção C- ou N- terminal pode ser dominante no reconhecimento de receptores de superfície de membrana.
- ✓ Atividade Antimicrobiana: Peptídeos com potencial antimicrobiano são derivados de proteínas do soro, como por exemplo a lactoferrina. Lactoferrina é uma glicoproteína ligante de ferro presente em muitos fluidos de mamíferos, inclusive no leite. Considerada como sendo um importante componente na defesa contra infecções. Assim como estas ações de interesse dos peptídeos bioativos existem outros tais como carregadores de minerais, bem como a de interesse neste trabalho a ação anti-hipertensiva.

4. PRODUTOS ADICIONADOS DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Lactobacillus helveticus tem sido relacionado com liberação de peptídeos com potencial atividade anti-hipertensiva. Estes peptídeos agem sobre a enzima conversora da angiotensina (ECA), reduzindo a pressão arterial o que pode auxiliar no tratamento de pessoas hipertensas. Segundo alguns estudos a presença de peptídeos anti-hipertensivos têm sido demonstrada em leite fermentado, iogurte e queijos. Desde

então, o interesse nesta área levou pesquisadores a buscarem peptídeos anti-hipertensivos a partir de proteínas diversas. Exemplificando de forma sucinta, a literatura mostra que inibidores eficientes da ECA têm sido isolados a partir dos hidrolisados de pescado (BYUN & KIM; 2001 FUJITA et al., 1995); soja (KINOSHITA et al., 1993; WU & DING 2002); proteínas do plasma (HYUN & SHIN, 2000); e principalmente a partir das proteínas do leite, onde a capacidade de inibir a ACE foi demonstrada a partir de produtos fermentados (HATA et al., 1996), maturação de queijos (ABUBAKAR et al., 1998; GÓMEZ-RUIZ et al., 2002; HAILESELASSIE et al., 1999) e hidrólise enzimática das proteínas do soro (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2002; NURMINEN et al., 2000; SIPOLA et al., 2002; VAN DER VEN et al., 2002).

As doenças cardiovasculares (DCV) são uma das principais causas de morbimortalidade no mundo (29,2% da mortalidade), segundo Reis e Glashan (2000). A hipertensão ocorre aproximadamente, em uma de cada cinco pessoas antes do término de suas vidas, em geral, na meia idade ou na velhice (GUYTON & HALL 2001). Segundo o Ministério da Saúde, a pessoa é considerada hipertensa quando a pressão arterial é igual ou superior a 14 por 9. No Brasil, Miranzi et al. (2008), salientam que 17,6% das internações são em virtudes da HAS e que os gastos com esse agravo correspondem a 5,9% dos recursos dispendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A hipertensão arterial sistêmica (HAS) pode provocar a ruptura dos vasos sanguíneos cerebrais, dando origem aos “acidentes vasculares cerebrais” (AVC), bem como dos vasos renais, causados “insuficiência renal”, ou dos vasos de outros órgãos vitais, podendo resultar em cegueira, surdez, ataques cardíacos etc. Por outro lado, também pode representar carga excessiva para o coração, levando a sua insuficiência. Os principais fatores de risco para a HAS incluem: hereditariedade, idade, raça, gênero, obesidade, estresse, vida sedentária, consumo de álcool, uso de anticoncepcionais e alta ingestão de sódio (REIS & GLASHAN, 2000; FEIJÃO et al., 2005; SIMONETTI et al., 2002). Outros fatores podem estar associados com o aumento da pressão tais como hipercolesterolemia e diabetes *mellitus* (ARSLANTAS et al., 2008). Assim, pela estreita correlação com estilo de vida, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) pode ser evitada, tratada ou minimizada com a adoção de hábitos saudáveis (CARVALHO et al., 2013).

A obtenção de peptídeos bioativos (PBA) inibidores de ECA foi demonstrada para o leite fermentado por diversas culturas. A atividade estimulante do sistema imunológico também pode ser manifestada por peptídeos derivados da hidrólise de outras proteínas do leite, como a κ -caseína e α -lactalbumina (KAYSER and MEISEL, 1996).

Yamamoto et al. (1994) observou uma redução significativa na pressão sistólica dos animais, efeito que durou até 10 horas após a administração oral. Nakamura et al. (1995) isolaram dois tripeptídeos anti-hipertensivos contendo Valina, Prolina, Prolina (Val-Pro-Pro) e Isoleucina, Prolina, Prolina (Ile-Pro-Pro) no leite fermentado por *L. helveticus*. Yamamoto et al. (1999) demonstrou um efeito dose-dependente na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos. Um efeito mais potente na pressão arterial desses animais, foi obtido após a administração oral do leite fermentado contendo o dipeptídeo Tyr-Pro, identificado também a partir do leite fermentado por *L. helveticus*. Segundo Sadat-Mekmene et al. (2011), os PBA Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro apresentam maior atividade anti-hipertensiva com um IC50 (concentração de peptídeos necessários para inibir 50% da atividade ECA) de 9 e 5 μm , respectivamente. Além disso, eles são resistentes às enzimas digestivas gastrintestinais e alcançam o intestino delgado sem perder sua atividade biológica.

Recentemente, Wang et al. (2011) demonstraram que queijo Gouda elaborado com a adição de 5 log UFC mL⁻¹ de *L. helveticus* ND01 (isolado de leite fermentado natural) como cultura adjunta apresentou um maior desenvolvimento da proteólise em relação aos queijo controle (sem adição de cultura adjunta), e influenciou positivamente no desenvolvimento do *flavour* do queijo. Além disso, a atividade de ECA (enzima conversora de angiotensina) e de GABBA (ácido aminobutírico gama) nos queijos contendo *L. helveticus* ND01 após 6 semanas de maturação variou de 53,7 a 83,1% e 189,6 a 368,2 mg/Kg, respectivamente, comparativamente aos queijos controle. Os autores concluíram que *L. helveticus* ND01 apresenta um potencial de aplicação para o controle da hipertensão. Meira et al. (2012) também demonstraram forte atividade de ECA nos extrato solúveis em água, a qual variou de 46% para o queijo tipo Feta a 85% para o queijo tipo Roquefort produzidos no Brasil.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABIQ (2012). Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Evolução do Mercado de queijos.
- ABUBAKAR A, SAITO T, KITAZAWA H, KAWAI Y, ITOH T (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.12 , p.3131-3138.
- ALBENZIO M, CORBO MR, REHMAN SU, FOX PF, DE ANGELIS M, CORSETTI A, SEVI A, GOBBETTI M (2001). Microbiological e biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.67, p.35-48.
- ARAI S (1993). Physiological functions of foods. *Proceedings of the 6th International Congress on Engineering and Food*, pp.48-53, Chiba, Japan.
- ARSLANTAS D, AYRANCI U, UNSAL A, TOZUN M (2008). Prevalence of hypertension among individuals aged 50 years and over and its impact on health related quality of life in a semi-rural area of western Turkey. *Chinese Medical Journal (Engl)*. v.121, n.16, p.1524-31.
- BELEM MAF, LEE BH (1998). Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.38, n.7, p.565-598.
- BELLO J (1995). Los alimentos funcionales o nutraceuticos. I Nueva gama de productos en la indústria alimentaria. *Alimentaria*, v.32, n.265, p.25-30.
- BERESFORD T P, FITZSIMONS N A, BRENNAN N L, COGAN T M (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.11, n.4, p.259-274.

BHOWMIK T, RIESTERER R, VANBOEKEL MA, MARTH EH (1990). Characteristics of low-fat Cheddar cheese made with added micrococcus or pediococcus species. *Milchwissenschaft, Muenchen*, n.45, p.230-235.

BRASIL. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF*, 8 set. 1997. n. 172, p. 19690.

BYUN H, KIM S (2001). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*, v.36, n.12, p.1155-1162.

CARVALHO MV, SIQUEIRA LB, SOUSA ALL, JARDIM PCBV (2013). A influência da hipertensão arterial na qualidade de vida. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. [online]. v.100, n.2, p.164-174.

COSTA EL (2004). Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisado de soro de leite com atividade anti-hipertensiva. Tese apresentada para obtenção do título de doutorado da Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Campinas-SP.

CROW V, CURRY B, CHRISTISON M, HELLIER K, ROLLAND R (2002). Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. *Austr. J. Dairy Technol., Glen Iris*, v.57, n.2, p.99-104.

FEIJÃO AM, GADELHA FV, BEZERRA AA, OLIVEIRA AM, SILVA MS, LIMA JW (2005). Prevalência de excesso de peso e hipertensão arterial, em população urbana de baixa renda. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. v.84, n.1, p.29-33.

FUJITA H, YOKOYAMA K, YASUMOTO R, YOSHIKAWA M (1995). Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, suppl.1, p.304-305.

FURTADO MM, LOURENÇO NETO JPM. (1994). Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar.

GARCIA GAC (2007). Efeito do uso de enzimas proteolíticas na maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. São José do Rio Preto, 154p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.

GOBBETTI M, LOWNEY S, SMACCHI E, BATTISTOTTI B, DAMIANI P, FOX PF (1997). Microbiology and biochemistry of Tallegio cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.7, p.509-517.

GÓMEZ-RUIZ JA, RAMOS M, RECIO I (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in manchego cheese manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, v.12, n.8, p.697-706.

GUYTON AC, HALL JE (2001). *Textbook of Medical Physiology*. 10ed. Philadelphia: Saunders. 1064p.

HAILESELASSIE SS, LEE BH, GIBBS BF (1999). Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *Journal of Dairy Science*, v.82, n.8, p.1612-1617.

HALSTED CH (2003). Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? *American Journal Clinical Nutrition*, v.77, Suppl.4, p.1001S–1007S.

HATA Y, YAMAMOTO M, OHNI M, NAKAJIMA K, NAKAMURA Y (1996). A placebocontrolled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.64, n.5, p.767-771.

HERNÁNDEZ-LEDESMA B, RECIO I, RAMOS M, AMIGO L (2002). Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification

of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal*, v.12, n.10, p.805-812.

HYUN CK, SHIN HK (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, v.36, n.1-2, p.65-71.

KAYSER H, MEISEL H (1996). Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters*. v.383, n.1-2, p.18-20.

KINOSHITA E, YAMAKOSHI J, KIKUCHI M (1993). Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.57, n.7, p.1107-1110.

LAWRENCE RC, CREAMER LK, GILLES J (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 70, n. 8, p. 1748-1760.

LIMA PD (1999). Synthesis of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors: an important class of antihypertensive drugs. *Química Nova*, v.22, n.3, p.375-381.

MARUYAMA S, NAKAGOMI K, TOMIZUKA N, SUZUKI H (1985). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykininpotentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.49, n.5, p.1405-1409.

MARUYAMA S, SUZUKI H (1982). A peptide Inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.46, n.5, p.1393-1394.

MATTILA-SANDHOLM T, MYLARINEN P, CRITTENDEN R, MOGENSEN G, FONDEN R, SAARELA M (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, v.12. p173-182.

MEIRA SMM, DAROIT DJ, HELFER VE, CORRÊA JS, CARRO S, BRANDELLI A (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil. *Food Research International*, v. 48, p 322-329.

MEISEL HANS (1997). Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock productions science*, v.50, p.125-138.

MEISEL HANS (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy journal*, v.8, p.363-373.

MIRANZI SS, FERREIRA FS, IWAMOTO HH, PEREIRA GA, MIRANZI MA (2008). Qualidade de vida de indivíduos com diabetes mellitus e hipertensão acompanhados por uma equipe de saúde da família. *Texto & Contexto Enfermagem*. v.17, n.4, p.672-8.

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

NAKAMURA Y, YAMAMOTO N, SAKAI K, TAKANO T (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, v.78, n.6, p.1253-1257.

NURMINEN ML, SIPOLA M, KAARTO H, PIHLANTO-LEPPÄLÄ A, PIIOLA K, TOSSAVAINEN O, KORHONEN H, VAPAATALO H (2000). α -Lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive rats and spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, v.66, n.16, p.1535-1543.

PACHECO MTB, SGARBIERI VC (2001). Fibra e Doenças Gastrointestinais. In: LAJOLO FM et al. *Fibra dietética em Iberoamérica. Tecnologia y salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos*. São Paulo: Varela. cap.28, p.385-397.

PACHECO MTB, ANTUNES AEC, SGARBIERI VC (2008). New Technologies and physiological functional properties of milk proteins. In: Alan B. Boscoe, Charles R. Listow. (Org.). Protein Research Progress. 1 ed. New York: NovaPublisher, p.117-168.

PELISSON MV (2008). Hipertensão arterial sistêmica, fatores de risco e qualidade de vida em um grupo de pacientes hipertensos em uma unidade básica de saúde de Novo Hamburgo, Trabalho apresentado para conclusão do curso de fisioterapia do Centro Universitário Feevale, Instituto de Ciência da Saúde de Novo Hamburgo - RS, 125p.

REHMAN S-U, BANKS JM, MAcSWEENEY PLH, FOX PF (2000). Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. Int. Dairy J., Amsterdam, v.10, p.45-53.

REIS MG, GLASHAN RQ (2000). Adultos hipertensos hospitalizados: percepção de gravidade da doença e de qualidade de vida. Revista Latino-americana de Enfermagem. v.9, n.3, p.51-7.

ROGICK FA (1951). Estudo sobre a tecnologia do queijo Prato. Boletim Industria Animal, Nova Odessa, v.12, p.131-148.

ROY MK, WATANABE Y, TAMAI Y (2000). Yeast pretease B-digested skimmed milk inhibits angiotensin-I-converting enzyme activity. Biotechnology and Applied Biochemistry, v.31, n.4, p.95-100.

SADAT-MEKMENE L, GENAY M, ATLAN D, LORTAL S, GAGNAIRE V (2011). Original features of cell-envelop proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A Review. International Journal of Food Microbiology, v.146, p.1-13.

SANDERS ME (1998). Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. International Dairy Journal, v.8, p.341-347.

SANJULIANI AF, TORRES MRSG, PAULA LN, BASSAN FB (2001). Eixo renina-angiotensina-aldosterona: Bases fisiológicas e fisiopatológicas. Revista Hospital Universidade Pedro Ernesto. v.10, n.3, p.20-30.

SETTANNI L, MOSCHETTI G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health. Food Microbiology, v. 27, p. 691-697.

SILVA AT (1998). Maturação do queijo tipo Prato: Influência da Adição de enzimas proteolíticas no processo. Campinas. 119p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SIMONETTI JP, BATISTA L, CARVALHO LR (2002). Hábitos de salud y factores de riesgo en pacientes con hipertensión arterial. Revista Latino-americana de Enfermagem. v.10, n.3, p.415-22.

SIPOLA M, FINCKENBERG P, VAPAATALO, KORPELA R, VAPAATALO H, NURMINEN ML (2002). Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. Journal of Dairy Research, v.69, n.1, p.103-111.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSAO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq. Bras. Cardiol. [online]. 2010, vol.95, n.1, suppl.1, pp. I-III. ISSN 0066-782X.

SPADOTI LM, MORENO I (2008). Peptídeos bioativos de produtos lácteos. Funcionais e Nutracêuticos. Ed. Insumo. No 1 (março), p. 26-38.

VAN DER VEN C, GRUPEN H, BONT DBA, VORAGEN AGJ (2002). Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. International Dairy Journal, v.12, n.10, p.813-820.

VILELA SC, MALLMANN DB, SAITO MM (2012). Evolução das culturas lácticas para fabricação de queijo Prato no Brasil. Revista Indústria de Laticínios. No 92, p. 68-69.

WANG H, CUI L, CHEN W, ZHANG H (2011). An application in Gouda cheese manufacture for a strain of *Lactobacillus helveticus* NCD01. International Journal of Dairy Technology, v.64, n. 3, p. 386-393.

WILLIAMS AG, BANKS JM (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from cheddar cheese manufactured in The United Kingdom. Int. Dairy J., Amsterdam, v.7, p.763-774.

WOUTERS JTM, AYAD EHE, HUGENHOLTZ J, SMIT G (2002). Microbes from raw milk fermented dairy products. Int. Dairy J., Amsterdam, v.12, p.91-109.

WU J, DING X (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. Food Research International, v.35, n.4, p.367-375.

YAMAMOTO N, AKINO A, TAKANO T (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. Journal of Dairy Science, v.77, n.4, p.917-922.

YAMAMOTO N, MAENO M, TAKANO T (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. Journal of Dairy Science, v.82, n.7, p.1388-1393.

CAPÍTULO 2

CONTAGEM SELETIVA DE *Lactobacillus helveticus* (LH-B02) UTILIZADO COMO CULTURA ADJUNTA EM QUEIJO PRATO

CAPÍTULO 2 – CONTAGEM SELETIVA DE *Lactobacillus helveticus* (LH-B02) UTILIZADO COMO CULTURA ADJUNTA EM QUEIJO PRATO

RESUMO

Um dos principais focos das indústrias alimentícias atualmente é o desenvolvimento contínuo de novos produtos e a indústria de lácteos tem investido na produção de alimentos que apresentem benefícios à saúde. O objetivo deste trabalho foi obter contagem seletiva para a cultura adjunta *Lactobacillus helveticus* (LH-B02) na presença das culturas empregadas na obtenção de queijo Prato presentes no fermento CHN-22 (composto por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*). Para atingir contagens seletivas de *L. helveticus* foram avaliados meios de culturas com modificações nos tipos de açúcares e com alteração do pH do meio. Paralelamente, foram avaliados dois diferentes tempos de incubação. O ágar MRS acidificado com ácido acético glacial até pH 5.4 e incubação na temperatura de 45°C por 48 horas, mostrou-se eficiente na inibição das culturas presentes no fermento MAC CHN-22. Foram obtidas contagens seletivas de *L. helveticus* de 4 log UFC.g⁻¹ no início do período de maturação (3 dias de fabricação) e de 3 log UFC.g⁻¹ ao término da maturação do queijo Prato (45 dias de fabricação).

Palavras-chave: Contagem Seletiva, *Lactobacillus helveticus* e Queijo Prato.

ABSTRACT

Currently, food industries focus on the continuous development of new products, and the dairy industry has invested in the production of foods with health benefits. In this study, our purpose was to obtain selective enumeration for *Lactobacillus helveticus* (LH-B02) adjunct culture in the presence of mesophilic aromatic cultures used to make Prato cheese (CHN-22, composed of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*). To achieve the selective enumeration of *L. helveticus*, we evaluated culture media with modifications in the types of sugar as well as with changes in the pH of the medium. Simultaneously, we evaluated two different incubation times. MRS agar acidified with glacial acetic acid up to pH 5.4 and incubation temperature of 45°C for 48 hours, proved to be efficient in inhibiting the cultures present in MAC CHN-22. In conclusion, we obtained the selective enumeration of *L. helveticus* of 4 log cfu.g⁻¹ at the beginning of the period of maturation (3 days) and 3 log cfu.g⁻¹ at the end of the ripening of the Prato cheese (45 days).

Keywords: Selective Enumeration, *Lactobacillus helveticus* and Prato cheese.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de culturas adjuntas é uma das novas alternativas tecnológicas que vem sendo estudada por pesquisadores de diversos países visando a melhoria da qualidade geral de produtos alimentícios, em especial produtos lácteos como queijos, leites fermentados, iogurte e outros. Outra vantagem é a obtenção de novas variedades de produtos que passam a apresentar sabor, aroma e outras características diferenciadas.

Além da promoção de melhorias nas propriedades sensoriais do queijo Prato, associado ou não à redução do período de maturação do produto, atualmente os benefícios promovidos à saúde do consumidor por espécies como por exemplo alguns microrganismos presentes na microbiota natural do leite, as NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria) tem direcionado as pesquisas no sentido de agregar maior valor aos queijos maturados. O *Lactobacillus helveticus*, por exemplo, além da capacidade de reduzir gradativamente o amargor do queijo por hidrolisar peptídeos hidrofóbicos e peptídeos amargos produzidos da β -caseína (193-209), também é capaz de produzir peptídeos bioativos (SADAT- MEKMENE et al., 2011). Outras espécies NSLAB e efeitos promotores de saúde são: (i) efeito probiótico: *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*, (ii) produção de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA): *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. plantarum* e *E. faecalis*, (iii) produção de ácido γ -aminobutírico: *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. plantarum*, (iii) propriedades antígenotóxicas: *L. paracasei subsp. paracasei* (SETTANNI & MOSCHETTI, 2010).

Os *L. helveticus*, foco deste estudo, são bactérias produtoras de ácido láctico e Torriani et al. (1994) consideram que esse microrganismo produz ácido láctico em concentrações maiores que 2%. Este microrganismo apresenta temperatura ótima de crescimento de 40-45°C e temperatura máxima de crescimento de 50-52°C, mas não se desenvolvem em temperaturas inferiores a 15°C (MELO et al., 2011), geralmente resistem a temperaturas de 60°C por 90 minutos (FURTADO, 1990). Estes microrganismos são homofermentativos e utilizam como substrato lactose, até concentração aproximada de 2,7% (FURTADO, 1990). Segundo Fortina et al. (1998) há

diferenças na capacidade de acidificação em cepas de *L. helveticus*, devendo-se então utilizar esta característica para seleção de culturas para perfis biotecnológicos de interesse. Quanto ao perfil de fermentação de carboidratos, este microrganismo pertence ao grupo das espécies que não fermentam amigdalina, arabinose, celobiose, esculina, gluconato, manitol, melezitose, melibiose, rafinose, ribose, salicina, sorbitol, sacarose e xilose (90% ou mais das cepas negativas), fermentam a galactose, glicose e lactose (90% ou mais cepas positivas), 11 a 89% das cepas positivas para frutose, maltose, manose e trealose e fermentação variável do N-acetil-glicosamina (TORRIANI et al., 1994).

A habilidade do *L. helveticus* (galactose positiva) de utilizar a galactose, pode ser usada para sua diferenciação em relação a outros lactobacilos do grupo galactose negativa, porém deve-se levar em consideração que cerca de 10% ou mais das cepas de *L. helveticus* podem não fermentar completamente a galactose (TORRIANI et al., 1994). O isolamento dos lactobacilos termófilos é relativamente simples, podendo ser utilizado para esse fim, o meio MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) com pH ajustado em 5,4, e incubação em anaerobiose a 43°C por 24-48 horas. Esse meio atende às exigências nutricionais da maioria dos lactobacilos e não contém nenhum agente inibidor, e quando utilizados na temperatura e pH indicados, realmente selecionam somente os lactobacilos termófilos acidúricos (KANDLER & WEISS, 1986; LORTAL et al., 1992).

O referido microrganismo é comumente utilizado na produção de queijo suíço-americano e queijo Emmental, mas às vezes também é usado para fazer outros tipos de queijos. A função primária de cultura de *L. helveticus* é auxiliar na melhora das características sensoriais, evitando o sabor amargo e auxiliando na aceleração da proteólise durante o período de maturação do queijo. Além do uso na maturação de queijos, outras aplicações têm sido evidenciadas para produtos do metabolismo proteico de *L. helveticus*. Em estudo com leite fermentado, *L. helveticus* promoveu a diminuição da pressão arterial sanguínea, devido à liberação de tripeptídeos com capacidade de agir como inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), cuja síntese ocorre durante a lise do microrganismo (AIHARA, et al., 2005). A produção de

PBA (peptídeos bioativos) inibidores de ECA foi demonstrada também para o leite fermentado onde Yamamoto et al. (1994) observaram uma redução significativa na pressão sistólica dos animais, efeito que durou até 10 horas após a administração oral. Nakamura et al. (1995) isolaram dois tripeptídeos anti-hipertensivos contendo Valina, Prolina, Prolina (Val-Pro-Pro) e Isoleucina, Prolina Prolina (Ile-Pro-Pro) no leite fermentado por *L. helveticus*. Yamamoto et al. (1999) demonstrou um efeito dose-dependente na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos. Um efeito mais potente na pressão arterial desses animais, foi obtido após a administração oral do leite fermentado contendo o peptídeo Tyr-Pro, identificado também a partir do leite fermentado por *L. helveticus*. Segundo Sadat-Mekmene et al. (2011), os PBA Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro apresentam maior atividade anti-hipertensiva com um IC50 (concentração de peptídeos necessários para inibir 50% da atividade ECA) de 9 e 5 μm , respectivamente. Além disso, eles são resistentes às enzimas digestivas gastrintestinais e alcançam o intestino delgado sem perder sua atividade biológica.

Recentemente, Wang et al. (2011) demonstraram que queijo Gouda elaborado com a adição de 5 log UFC mL⁻¹ de *L. helveticus* ND01 (isolado de leite fermentado natural) como cultura adjunta apresentou um maior desenvolvimento da proteólise em relação aos queijo controle (sem adição de cultura adjunta), e influenciou positivamente no desenvolvimento do *flavour* do queijo. Além disso, a atividade de ECA (enzima conversora de angiotensina) e de GABBA (ácido aminobutírico gama) nos queijos contendo *L. helveticus* ND01 após 6 semanas de maturação variou de 53,7 a 83,1% e 189,6 a 368,2 mg/Kg, respectivamente, comparativamente aos queijos controle. Os autores concluíram que *L. helveticus* ND01 apresenta um potencial de aplicação para o controle da hipertensão. Meira et al. (2012) também demonstraram forte atividade de ECA nos extrato solúveis em água, a qual variou de 46% para o queijo tipo Feta a 85% para o queijo tipo Roquefort produzidos no Brasil. Desta forma, o emprego de *L. helveticus* como cultura adjunta na fabricação de queijo Prato além de acelerar a maturação e melhorar características sensoriais do queijo pode liberar peptídeos bioativos com ação hipotensora, agregando funcionalidade ao produto.

Pelo acima exposto foram avaliadas formulações e condições de crescimento seletivas para *Lactobacillus helveticus* na presença de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* empregados para fabricação de queijo Prato.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

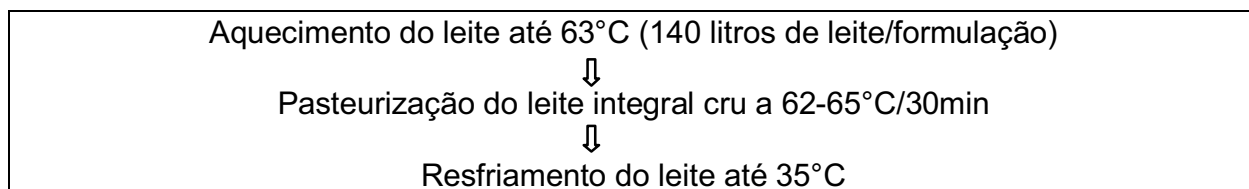
2.1. Culturas Empregadas

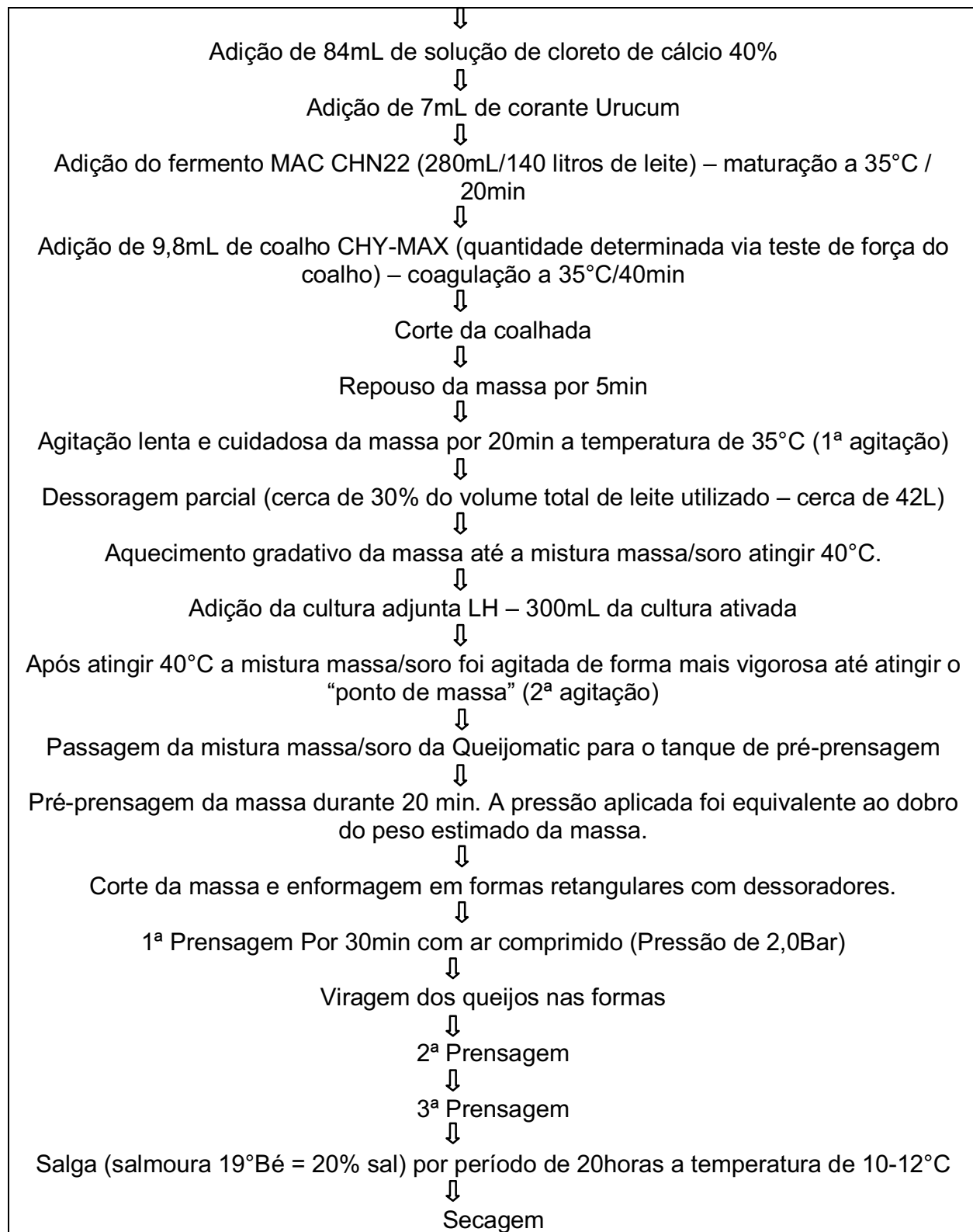
As culturas puras de *L. helveticus* (LH-B02) e a cultura mesofílica aromática (MAC CHN-22), composta por uma combinação de microrganismos contendo *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, usados neste trabalho, foram obtidas da empresa Christian Hansen (Brasil).

No processo de obtenção dos queijos foram empregadas as referidas culturas ativadas. A ativação foi realizada individualmente para cada fermento (LH-B02 e MAC CHN-22) em 1 litro de leite desnatado em pó reconstituído a 10% e esterilizado a 115°C por 12 minutos. Os fermentos DVS (direct vat set) foram adicionados ao leite estéril e incubados para a respectiva ativação, a cultura de *L. helveticus* a temperatura de 45°C por 18h e a cultura MAC CHN-22 sob 22°C por 16h. Após esta ativação foi realizada a contagem do fermento MAC CHN-22 e na cultura pura de *L. helveticus* para verificação da viabilidade celular em meio de cultura M17 Ágar (Dfico, França) incubado a 30°C, por 48 horas e em MRS Ágar (Dfico, França) incubado a 37°C por 72 horas, respectivamente.

2.2. Processamento de obtenção do queijo Prato

O queijo Prato foi processado em escala semi-industrial empregando-se Queijomatic (marca Biasinox, Brasil) de 200 litros e o fluxograma de processamento está apresentando na Figura 1.





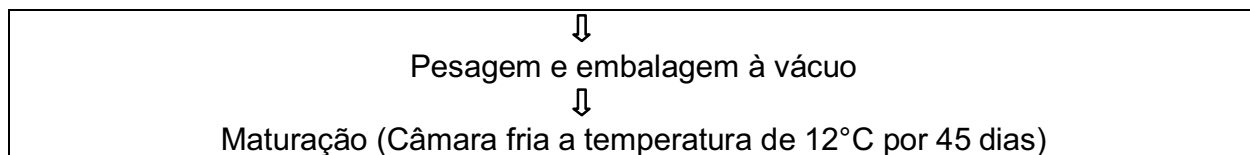


FIGURA 1. Fluxograma geral do processamento do queijo Prato segundo Furtado & Lourenço (1994), com modificações.

2.3. Condições de cultivo

Primeiramente foi realizada uma busca na literatura para verificar condições de cultivo capazes de promover crescimento de *L. helveticus*, porém não sabíamos se os meios empregados para contagem de *L. helveticus* seriam capaz de inibir as culturas *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* que compõem o fermento MAC CHN-22.

Então, realizou-se uma sequência de testes utilizando MRS Ágar (Dfico, França) com modificações no meio de cultura, por substituição ou suplementação dos açúcares, modificação do pH e aumento do tempo de incubação, de acordo com o que está descrito na Tabela 1.

Para os testes de seletividade 1g das culturas MAC CHN22 e LH-B02 foram suspensos individualmente em 9mL de água peptonada estéril a 0,1%. Para os queijos (obtidos empregando-se culturas ativadas) empregou-se citrato (Synth, Brasil) a 2% da seguinte maneira: foi pesado 25g de queijo Prato em saco estéril e adicionado 225mL de citrato a 2% e com o auxílio de um homogeneizador obteve-se a primeira diluição, as diluições seguintes foram feitas em 9mL de água peptonada estéril a 0,1%.

TABELA 1. Variações de MRS Ágar (formulado e suplementado com galactose ou lactose) e condições de incubação para detectar crescimento seletivo de *Lactobacillus helveticus*.

Meio	Lactose (g/L)	Galactose (g/L)	Ajuste pH	Tempo de incubação (h)
MRS Ágar manipulado com substituição da dextrose por lactose	20	-	-	48
MRS Ágar manipulado com substituição da dextrose por galactose	-	20	-	48
MRS Ágar suplementado com 2,7% de lactose	27	-	-	48
MRS Ágar suplementado com 2,7% galactose	-	27	-	48
MRS Ágar acidificado	-	-	5.4	48
MRS Ágar acidificado	-	-	5.4	72

2.4. Preparo do meio de cultura

Os fatores essenciais para o crescimento de *L. helveticus* de acordo com o Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (COWAN et al. 1975) são cálcio, pirodoxal ou piridoxamina, sendo que não são requeridos ácido fólico, vitamina B12 e tiamina. A partir de características de fermentação e temperatura ótima de crescimento do *L. helveticus*, descritas na literatura para contagem seletiva deste mesmo microrganismo foram selecionados as seguintes formulações de meios de cultura: (1) ágar MRS (Dfico, França) suplementado com 2,7% de galactose (Êxodo, Brasil); (2) ágar MRS (Dfico, França) suplementado com 2,7% de lactose (Synth, Brasil); (3) ágar MRS (Dfico, França) formulado com a substituição da dextrose presente do meio de cultura comercial por galactose (Êxodo, Brasil); (4) ágar MRS (Dfico, França) formulado com a substituição da dextrose presente do meio de cultura comercial por lactose (Synth, Brasil); (5) ágar MRS (Dfico, França) com acidificação, com ácido acético glacial (Synth, Brasil), até pH 5,4. Todos os testes foram incubados a temperatura de 45°C em aerobiose.

Na Tabela 2 estão descritos os reagentes utilizados para a elaboração de 1 litro dos meios de cultura Ágar MRS manipulados, ou seja, cada um dos ingredientes que compõem o meio foram pesados individualmente para possibilitar a substituição da dextrose por outras fontes de energia, conforme descrito na Tabela 2.

TABELA 2. Formulação para obtenção de Ágar MRS.

Reagentes	Quantidade (g/L)
Proteose peptone (Dfico)	10.0
Beef Extract (Himedia)	10.0
Yeast Extract (Himedia)	5.0
Polysorbate 80 (Inlab)	1.0
Ammonium Citrate (Synth)	2.0
Sodium Acetate (Synth)	5.0
Magnesium Sulfate (Synth)	0.1
Manganese Sulfate (Synth)	0.05
Dipotassium Phosphate (Êxodo)	2.0
Agar (Dfico)	15.0

Os demais meios foram obtidos com emprego de meio MRS ágar (Dfico, França) preparado conforme recomendações do fabricante, 70g para 1L de água destilada, e modificado pela suplementação com galactose ou lactose, ou acidificação até pH 5.4, com a utilização de Ácido acético glacial.

2.5. Procedimento de contagem

Os *Lactobacillus helveticus* e as culturas do fermento MAC CHN-22 foram enumerado, no queijo Prato, utilizando os meios descritos na Tabela 1.

As amostras foram plaqueadas utilizando-se a técnica de inoculação *pour plate* e os resultados foram expressos em $\log \text{ufc.g}^{-1}$. As placas contendo os meios de culturas MRS modificados foram incubadas em condições aeróbicas a 45°C por 48h, com exceção do meio de cultura MRS acidificado que foi incubado na mesma temperatura de 45°C, porém por períodos de 48 e 72h. Estas análises foram realizadas nos queijos Prato com três dias de fabricação. O meio de cultura e condições de cultivo selecionado

nestes testes para a contagem seletiva do microrganismo *L. helveticus* foram utilizados para contagem da cultura adjunta durante o período de maturação dos queijos (45 dias de estocagem em câmara fria sob a temperatura de $12\pm 1^{\circ}\text{C}$), estas análises foram realizadas a cada 7 dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiro de tudo, foi realizada a contagem da cultura MAC-CHN22 após ativação para determinar sua viabilidade em meio de cultura Ágar M17. Após o período de incubação de 48h foi obtida a contagem de $10,7 \log \text{ufc.g}^{-1}$. Adicionalmente foi realizada coloração de Gram e feita observação microscópica da cultura MAC-CHN22, conforme demonstrado na Figura 2.

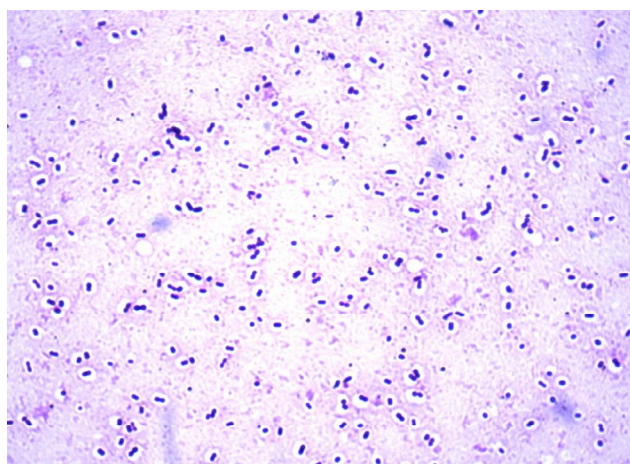


FIGURA 2. Imagem de microscopia eletrônica (aumento de 1000 vezes) da cultura MAC CHN-22 após semeada em meio de cultura seletivo (Ágar M17 – Difco, França).

As contagens obtidas nos diferentes testes estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3. Contagens em log UFC.mL⁻¹ de microrganismos em diferentes meios e condições de incubação.

Meio de cultura	Período de incubação	Amostra			
		Cultura (CHN-22)	Cultura <i>L. helveticus</i> (LH)	Queijo CHN-22 com 3 dias de fabricação	Queijo CHN-22 + LH com 3 dias de fabricação
MRS Ágar manipulado com substituição da dextrose por galactose	48h	<1	<1	<1	<1
MRS Ágar manipulado com substituição da dextrose por lactose	48h	5,02	10,24	6,92	6,50
MRS Ágar suplementado com 2,7% de galactose	48h	4,50	9,47	<1	2,84
MRS Ágar suplementado com 2,7% de lactose	48h	4,86	9,45	6,42	6,28
MRS Ágar acidificado pH 5.4	48h	<1	9,39	<1	3,34
MRS Ágar acidificado pH 5.4	72h	<1	9,47	<1	3,19

Todas as culturas avaliadas foram incapazes de empregar apenas galactose como fonte de energia, não observando-se crescimento no meio MRS Ágar manipulado, no qual foi feita substituição da dextrose por galactose, em nenhuma das amostras avaliadas.

Quando empregada a lactose como fonte de carbono, observou-se crescimento das culturas liofilizadas: *L. helveticus*, na forma de monocultura, e também da cultura mista CHN-22. Porém, em meio M17 observou-se contagem de 10,7 log ufc.g⁻¹ do fermento CHN-22. Assim sendo, o meio empregado proporcionou redução de 5 ciclos logarítmicos desta cultura comparativamente ao obtido em M17. Quando empregada suplementação do meio MRS com 2,7% de galactose ou 2,7% de lactose, observou-se crescimento microbiano na faixa de 4,5 e 4,8 log ufc.g⁻¹, valores que abaixo do que foi encontrado quando comparado com o valor obtido após ativação da cultura pura liofilizada em leite estéril.

Por outro lado, a cultura pura de *L. helveticus* apresentou crescimento na faixa de $10 \log \text{ ufc.g}^{-1}$ em todas as condições avaliadas, com exceção do emprego de galactose como substituinte da dextrose no meio de cultura formulado. Isso indica que o meio MRS é adequado para crescimento de *L. helveticus*, não recomendando-se apenas, das condições avaliadas, a substituição da dextrose por galactose.

Para as amostras de queijo contendo fermento MAC CHN-22, mas não adicionadas de *L. helveticus* foram obtidas contagens de 6,9 e 6,4 $\log \text{ ufc.g}^{-1}$ nos meios contendo substituição da dextrose por lactose e suplementação do meio manipulado e adicionado do mesmo dissacarídeo. Nas demais condições não foi observado crescimento de colônias, o que apontou para condições inibitórias das bactérias dos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* presentes no fermento empregado para obtenção do queijo Prato. Merece destaque que os resultados de inibição das culturas que compõem o fermento MAC CHN-22 quando avaliadas no queijo ou na forma liofilizada, observou-se coerência. Ou seja, nas condições de cultivo nas quais ocorreu inibição completa do crescimento das culturas liofilizadas, o mesmo foi encontrado quando analisado amostras de queijo. No entanto, ocorreu uma divergência no meio MRS Ágar suplementado (com 2,7% de galactose) no qual foi observado crescimento de culturas liofilizadas, mas não observado quando feita análise do queijo, no qual ocorreu inibição completa do crescimento de culturas cultiváveis. Ainda assim, a condição de cultivo eleita como a mais adequada para crescimento seletivo de *L. helveticus* foi o emprego de MRS Ágar acidificado pH 5.4, porque inibiu crescimento das culturas que compõem o fermentado CHN22 nas duas condições avaliadas (cultura liofilizada e presentes no queijo). E como o tempo de incubação de 72h resultou em contagens semelhantes às obtidas com 48h, optou-se pela seguinte condição para crescimento seletivo de *L. helveticus*: MRS Ágar acidificado pH 5.4 e 45°C / 48h. Para confirmação dos resultados da seletividade, realizou-se coloração de Gram e observou-se microscopicamente a presença exclusiva de bastonetes Gram positivo (indicativo da presença de *L. helveticus*), quando empregado o meio de cultura Ágar MRS acidificado a pH 5.4, conforme apresentado na Figura 3. Em contra partida verificou-se nos outros meios de culturas não seletivos a presença de cocos (característicos do fermento MAC CHN-22),

junto aos bastonetes típicos das espécies de lactobacilos (*L. helveticus*), utilizado como cultura adjunta neste trabalho (Figura 4).



FIGURA 3. Imagem de microscopia eletrônica (aumento de 1000 vezes) da cultura LH – B02 após sementeada em meio de cultura Ágar MRS (Difco, França) acidificado a pH 5.4.



FIGURA 4. Imagem de microscopia eletrônica (aumento de 1000 vezes) das culturas avaliadas após plaqueamento e contagem nos meios testados para seletividade de *L. helveticus*, onde observa-se presença de cocos característicos do fermento MAC CHN-22 e bacilos típicos da cultura adjunta LH – B02.

Os resultados encontrados durante o período de 45 dias de maturação dos queijos, utilizando o meio de cultura selecionado, são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. Contagem seletiva de *L. helveticus* (log ufc.g⁻¹) em queijo Prato no período de 45 dias de maturação, empregando-se meio de cultura Ágar MRS acidificado a pH 5.4 e incubação a 45°C.

Período de maturação (dias)	Queijo CHN-22	Queijo CHN-22 + LH
3	<1	4.06±0.18
10	<1	3.96±0.11
17	<1	3.78±0,01
24	<1	3.34±0.17
31	<1	3.07±0.31
38	<1	3.06±0.06
45	<1	2.97±0.17

Analisando os resultados apresentados na tabela a cima, pode-se observar a inibição completa de colônias cultiváveis das culturas aromáticas mesofílicas que fazem parte do fermento MAC CHN-22.

L. helveticus, apresentou contagens médias de 3,46±0,46 log ufc.g⁻¹. Espera-se, por efeito da diluição, uma redução de, no mínimo, 5 ciclos logarítmicos sobre a contagem de *L. helveticus* no queijo. Esta redução é desejável, pois a liberação de aminopeptidases citoplasmáticas (AMP) durante a lise de microrganismos na matriz do queijo pode influenciar na redução do sabor amargo, bem como conferir outras características sensoriais de interesse após o período maturação.

Assim sendo, além da função do *L. helveticus* de hidrolisar peptídeos hidrofóbicos, peptídeos amargos produzidos da beta-caseína (193-209), e de reduzir gradativamente o amargor do queijo; esta espécie também foi associada à produção de peptídeos bioativos (SADAT- MEKMENE et al., 2011). Em algumas pesquisas os *Lactobacillus helveticus*, durante sua lise celular, tem apresentado porções de peptídeos com potencial de ação anti-hipertensiva. Este peptídeo pode agir sobre a enzima conversora da angiotensina (ACE), reduzindo a pressão arterial de pessoas que apresentam hipertensão. Segundo alguns estudos realizados a presença de peptídeos anti-hipertensivos tem sido demonstrada em leite fermentado, iogurte e queijos

(YAMAMOTO et al.,1994; NAKAMURA et al.,1995; WANG et al.,2011; YAMAMOTO et al.,1999).

Com tudo, é importante ressaltar que, embora haja descrições de contagens de determinados microrganismos na literatura, sempre devem ser testados os meios, pois a seletividade está diretamente relacionada com a presença de outras cepas de microrganismos que possam estar presentes e até mesmo nas diferenciações genéticas das cepas de microrganismos.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, o meio efetivamente seletivo para contagem da cultura adjunta de *Lactobacillus helveticus*, adicionada em queijo Prato foi o MRS Ágar acidificado até pH 5.4 e incubação a temperatura de 45°C por 48 horas em aerobiose. Nesta condição não houve o desenvolvimento de colônias das culturas que compõem o fermento MAC CHN-22 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*).

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AIHARA K, KAJIMOTO O, HIRATA H, TAKAHASHI R, NAKAMURA Y (2005). "Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension". Journal Am. Coll. Nutrition. v.24, n.4, p.257–65.

COWAN ST, HOLT JG, LISTON J, MURRAY RGE, NIVEN CF, RAVIN AW, STANIER RY (1975). 8ª ed. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

FORTINA MG, NICASTRO G, CARMINATI D, NEVIANI E, MANACHINI PL (1998). *Lactobacillus heveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v.84, n.1, p.72-80.

FURTADO MM (1990). Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro, Minas Gerais. Viçosa, Brasil, 95p. (M.Sc. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa. UFV).

FURTADO MM, LOURENÇO NETO JPM (1994). Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar.

KANDLER O, WEISS N (1986). Regular non sporing Gram positive rods. In: SNEATH PHA, MARR NS, SHARPE ME, HOLT JG (eds). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wikins. v.2, p.1209.

LORTAL S, HEIJENOORT L VAN, GRUBER K, SLEYTR UR, VANHEIJENOORT L (1992). S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and reformation after extraction with lithium chloride. Journal of General Microbiology, London, v.138, n.3, p.611-618.

MEIRA SMM, DAROIT DJ, HELFER VE, CORRÊA JS, CARRO S, BRANDELLI A (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil. Food Research International, v.48, p.322-329.

MELO RT, MONTEIRO GP, COELHO LR, NALEVAIKO PC, FREITAS EA, MENDONÇA EP, ROSSI DA (2011). *Lactobacillus helveticus* e sua importância na indústria de laticínios. PUBVET, Londrina, v.5, n.9, Ed.156, Art.1057.

NAKAMURA Y, YAMAMOTO N, SAKAI K, TAKANO T (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. Journal of Dairy Science, v.78, n.6, p.1253-1257.

SADAT-MEKMENE L, GENAY M, ATLAN D, LORTAL S, GAGNAIRE V (2011). Original features of cell-envelop proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A Review. International Journal of Food Microbiology, v.146, p.1-13.

SETTANNI L, MOSCHETTI G (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health. Food Microbiology, v.27, p.691-697.

TORRIANI S, VESCOVO M, SCOLARI G (1994). An Overview on *Lactobacillus helveticus*. Annali di Microbiologia ed Enzimologia, Milano, v. 44, p.163-191.

WANG H, CUI L, CHEN W, ZHANG H (2011). An application in Gouda cheese manufacture for a strain of *Lactobacillus helveticus* NCD01. *International Journal of Dairy Technology*, v.64, n.3, p.386-393.

YAMAMOTO N, AKINO A, TAKANO T (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, v.77, n.4, p.917-922.

YAMAMOTO N, MAENO M, TAKANO T (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*, v.82, n.7, p.1388-1393.

CAPÍTULO 3

MELHORA DA QUALIDADE DE QUEIJO PRATO PÓS ADIÇÃO DE CULTURA ADJUNTA DE *Lactobacillus helveticus* (LH-B02)

CAPITULO 3 - MELHORA DA QUALIDADE DE QUEIJO PRATO PÓS ADIÇÃO DE CULTURA ADJUNTA DE *Lactobacillus helveticus* (LH-B02)

RESUMO

O uso de culturas adjuntas representa uma técnica promissora para aceleração da maturação de queijos duros e semi-duros, aprimoramento das características sensoriais, possível liberação de peptídeos bioativos e obtenção de uma maior variedade de queijos com sabor e aroma distintos. Objetivou-se avaliar o papel da cultura de *L. helveticus* (LH-B02 / CHR-Hansen) na acidificação, proteólise, redução do amargor, determinação do perfil de aminoácidos das amostras de queijo Prato e possível liberação de peptídeos bioativos. Foram realizados três processamentos, em escala semi-industrial, com dois tratamentos diferentes; com e sem adição da cultura adjunta de *L. helveticus*. Dentro do período de maturação, dos queijos, foram realizadas as análises microbiológicas, físico-químicas, eletroforéticas, cromatográficas e análise sensorial. Os queijos elaborados apresentam composição típica de queijo Prato e atenderam aos padrões microbiológicos exigidos para o consumo do produto. Em relação ao perfil eletroforético as amostras adicionadas de *L. helveticus* apresentaram banda mais evidentes correspondente à fração α_{s1-1} -caseína e γ_{3-} , γ_{1-} e γ_{2-} caseína. Na avaliação sensorial o queijo adicionado da cultura adjunta foi mais bem aceita sensorialmente do que a amostra controle (apenas adicionado de CHN-22) e queijo comercial diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) destes em alguns parâmetros. Observou-se aumento dos índices de extensão de proteólise (IEP) e profundidade da proteólise (IPP) ao longo da maturação dos queijos, porém não houve variação expressiva entre os tratamentos. Através da análise do aminograma, as amostras de queijo adicionadas de *L. helveticus* apresentaram teores maiores de aminoácidos comparadas com as amostras sem adição desta cultura. Pelo teste estatístico apenas os aminoácidos Histidina, Cistina e Triptofano não diferiram quantitativamente entre os tratamentos ($p < 0,05$). Na eletroforese capilar (CE) foi encontrado apenas para a amostra adicionada da cultura adjunta aos 31 dias de maturação um pico com tempo de retenção na faixa

de 9 a 12 minutos, indicando a possível presença dos tripeptídeos de interesse na amostra.

Palavras-chave: Queijo Prato, Maturação, Análise Sensorial, Aminoácidos livres e Eletroforese Capilar.

ABSTRACT

The use of adjunct cultures is a promising technique for accelerating the ripening of hard and semi hard cheeses, improving the sensory qualities, possibly releasing bioactive peptides and obtaining a greater variety of cheeses with distinct flavors and aromas. This study aimed to evaluate the role of the culture *L. helveticus* (LH -B02 / CHR-Hansen) in the acidification, proteolysis, reduction in bitterness, determination of the amino acid profile of samples of Prato cheese and the possible release of bioactive peptides. Three processes were carried out on a semi-industrial scale, with two different treatments, with and without the addition of the adjunct culture *L. helveticus*. Microbiological, physicochemical, electrophoretic, chromatographic and sensory analyses were carried out during the ripening period. The cheeses produced presented a typical composition of Prato cheese and complied with the microbiological standards required for consumption of the product. With regard to the electrophoretic profile, the samples with added *L. helveticus* showed a more evident band corresponding to the fraction α_{s1-1} -casein and also γ_3 - , γ_1 - and γ_2 -casein. The sample of cheese with the addition of the adjunct culture showed greater sensory acceptability than the control sample (only CHN-22 added) and was statistically different ($p \leq 0.05$) from the commercial cheese for some of the parameters. The proteolysis extension (PEI) and depth of proteolysis (DPI) indexes increased during cheese ripening, but with no significant variation between treatments. An analysis of the amino acid profiles showed that the samples of cheese with added *L. helveticus* presented higher levels of amino acids as compared with the samples without the addition of this culture. The statistical test showed that only the amino acids histidine, cysteine and tryptophan did not differ between treatments ($p \leq 0.05$). Capillary electrophoresis (CE) showed a peak with a retention time in the range from 9 to 12 minutes after 31 days of ripening in the sample with added adjunct culture, indicating the possible presence of tripeptides of interest in this sample.

Keywords: Prato Cheese, Ripening, Sensorial analyze, Free Amino acid and Eletroforesis Capillary.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Prato é um “queijo típico brasileiro e um dos mais consumidos no país. De acordo com dados da Associação Leite Brasil mostram que em 2007 cerca de 35% do leite produzido no país (6,3 bilhões de litros) foi destinado para a produção de queijos” (TURCO, 2008). Por definição, “entende-se como queijo Prato, o queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. Caracteriza-se como queijo gordo, de média umidade, de massa semicozida e lavada, e possui um corpo macio e sabor suave” (BRASIL, 1997).

A maturação do queijo é essencialmente um processo enzimático envolvendo a quebra da massa pela proteólise, glicólise, lipólise e outras reações catalisadas por enzimas, resultando em um queijo com sabor e textura típicos. A proteólise ocorre na maioria dos queijos e é considerada o evento bioquímico mais importante durante a maturação da maior parte dos queijos (FOX & MCSWEENEY, 1997; SOUZA & MCSWEENEY, 2001). A proteólise em queijos é afetada por inúmeros fatores, incluindo atividade residual do coagulante, proteases naturais do leite (como plasmina), proteinases e peptidases liberadas pelos microrganismos do fermento láctico, enzimas de microrganismos presentes no queijo, como contaminantes e/ou sobreviventes à pasteurização (ISEPON & OLIVEIRA, 1995). O coalho é responsável pela proteólise primária da caseína que resulta em mudanças na textura e formação dos compostos solúveis. O amolecimento inicial da estrutura dos queijos está relacionado com a hidrólise da α_{s1} -caseína, pela ação do coagulante liberando α_{s1-I} -caseína (CREAMER & OLSON, 1982; FOX, 1998).

As bactérias lácticas do fermento, responsáveis pela proteólise secundária, possuem um sistema proteinase/peptidase capaz de hidrolisar oligopeptídeos a peptídeos pequenos e aminoácidos que contribuem diretamente para o sabor. Os aminoácidos podem também servir como substratos para a formação de compostos de sabor adicionais. Outra importante consequência da proteólise é a liberação de compostos de sabor que podem estar aprisionados no coágulo (FOX & MCSWEENEY, 1997).

A proteólise contribui para o sabor do queijo através da produção de peptídeos e aminoácidos livres. Grandes peptídeos não contribuem diretamente para o sabor do queijo, mas são importantes para o desenvolvimento de uma textura adequada; contudo, grandes peptídeos podem ser hidrolisados pelas proteinases em pequenos peptídeos que podem ser sápidos (SOUZA & MCSWEENEY, 2001).

Além dos peptídeos serem responsáveis por modificações no sabor, maciez e outras características sensoriais, pesquisas têm mostrado que as proteínas do leite são consideradas, no momento, as principais fontes conhecidas de uma variedade de peptídeos bioativos (PBA). Os peptídeos podem apresentar propriedades fisiológicas que são benéficas à saúde. Atualmente existem estudos sobre as diversas ações de diferentes peptídeos como, por exemplo, estimulante do sistema imunológico, ação anti-oxidante, ação anti-hipertensiva, ação anti-carcinogênica dentre outras propriedades multifuncionais (PACHECO, ANTUNES, SGARBIERI, 2008). Por administração oral, dependendo da sequência de aminoácidos, os PBA podem afetar os principais sistemas corpóreos - cardiovascular, digestivo, imune e nervoso (SPADOTI & MORENO, 2008).

Dentre as classes de PBA originados da proteólise das caseínas podemos destacar a ação anti-hipertensiva: certos peptídeos originário das caseínas alfa e beta (chamados de casoquininas) e de soro proteínas alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina (chamados de lactoquininas) que possuem a propriedade de inibir a atividade da ECA (enzima conversora de angiotensina), auxiliando no controle da pressão arterial alta por meio da dilatação dos vasos sanguíneos e de seu efeito sobre a volemia.

A produção de PBA inibidores da ECA foi demonstrada para o leite fermentado. Yamamoto et al. (1994) observou uma redução significativa na pressão sistólica dos animais, efeito que durou até 10 horas após a administração oral de leite fermentado com *L. helveticus* CP790. Nakamura et al. (1995) isolaram dois tripeptídeos anti-hipertensivos contendo Valina, Prolina, Prolina (Val-Pro-Pro) e Isoleucina, Prolina, Prolina (Ile-Pro-Pro) no leite fermentado por *L. helveticus*. Recentemente, Wang et al. (2011) demonstraram que queijo Gouda elaborado com a adição de $5 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ de

L. helveticus ND01 (isolado de leite fermentado natural) como cultura adjunta apresentou um maior desenvolvimento da proteólise em relação aos queijo controle (sem adição de cultura adjunta), e influenciou positivamente no desenvolvimento do *flavour* do queijo. Além disso, a atividade de ECA (enzima conversora de angiotensina) e de GABBA (ácido aminobutírico gama) nos queijos contendo *L. helveticus* ND01 após 6 semanas de maturação variou de 53,7 a 83,1% e 189,6 a 368,2 mg/Kg, respectivamente, comparativamente aos queijos controle. Os autores concluíram que *L. helveticus* ND01 apresenta um potencial de aplicação para o controle da hipertensão. Meira et al. (2012) também demonstraram forte atividade de ECA nos extrato solúveis em água, a qual variou de 46% para o queijo tipo Feta a 85% para o queijo tipo Roquefort produzidos no Brasil.

2. OBJETIVO

Os objetivos principais são: observar se a contribuição da cultura adjunta de *Lactobacillus helveticus* adicionada para a aceleração da proteólise apresentará atividade autolítica e perfil enzimático adequado tanto para intensificar o *flavour* e melhorar sensorialmente o queijo Prato; investigar presença de peptídeos bioativos promotores de saudabilidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

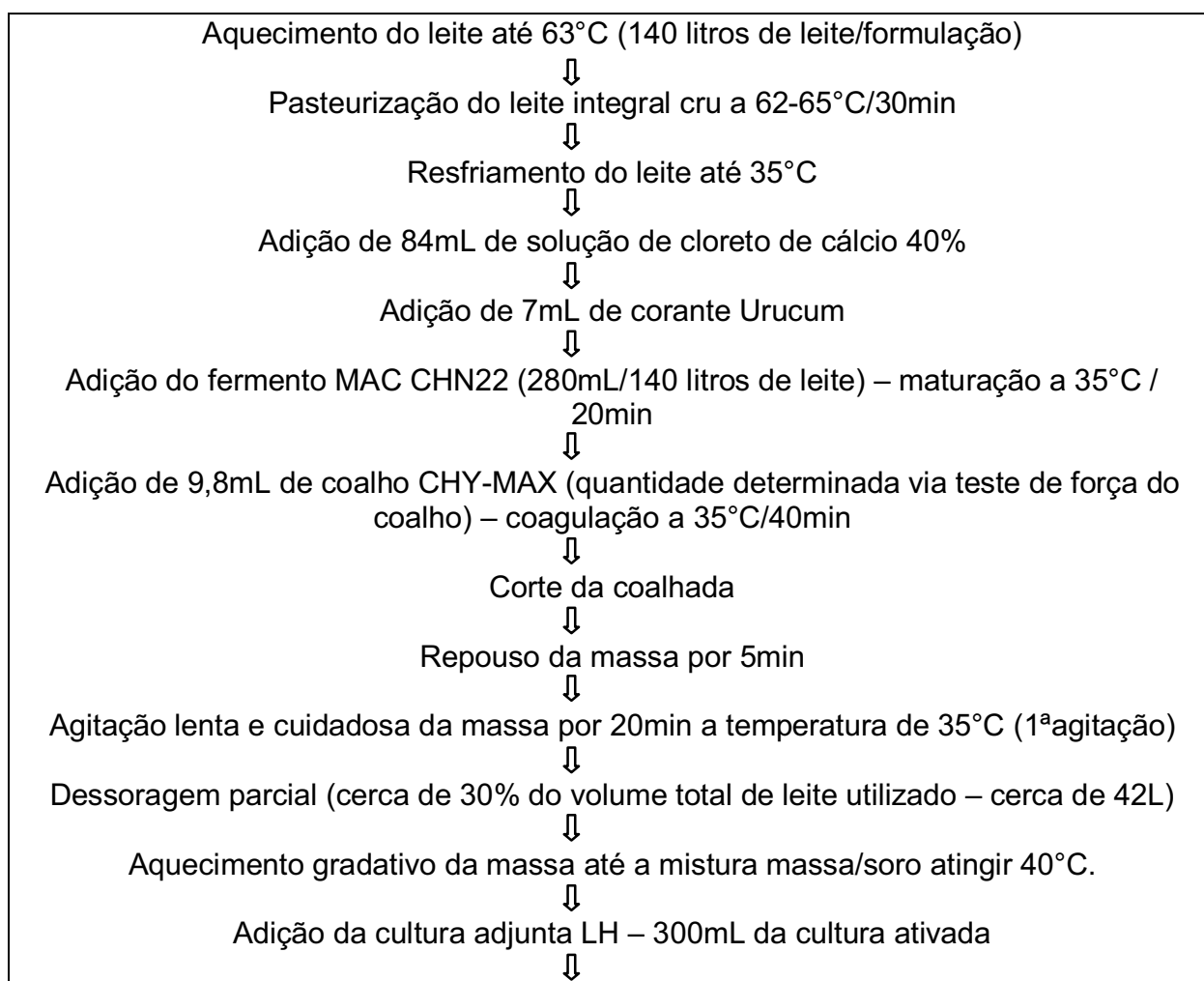
3.1. Origem, preparação e avaliação das culturas

As culturas puras de *L. helveticus* (LH-B02) e a cultura mesofílica aromática (MAC CHN-22), composta por uma combinação de microrganismos contendo *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactics*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, usados neste trabalho, foram obtidas da empresa Christian Hansen (Brasil). A ativação destas culturas foi realizada em 1 litro de leite desnatado em pó reconstituído a 10% e esterilizado a 115°C por 12 minutos, após o resfriamento do leite um sachê de cada cultura foi inoculado e incubado para a respectiva ativação, a cultura de *L. helveticus* a temperatura de 45°C por 18h e a cultura MAC CHN-22 sob 22°C por 16h. Após esta ativação foi realizada a contagem do fermento MAC CHN-22 para verificação da viabilidade celular em meio de cultura M17 Ágar (Dfico, França) incubado a 30°C, por

48 horas e dos *L. helveticus* em meio de cultura MRS acidificado a pH 5.4, incubado a 45°C por 48 horas.

3.2. Fabricação dos queijos

Os queijos foram obtidos em planta piloto de processamento de queijos, em escala semi-industrial empregando-se Queijomatic (marca Biasinox, Brasil) de 200 litros, no Instituto de Tecnologia de Alimentos no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios (ITAL/TECNOLAT). Foram processadas duas formulações diferentes, em cada uma das formulações foram utilizados 140 litros de leite integral cru para cada tratamento e o fluxograma de processamento está apresentando na Figura 1.



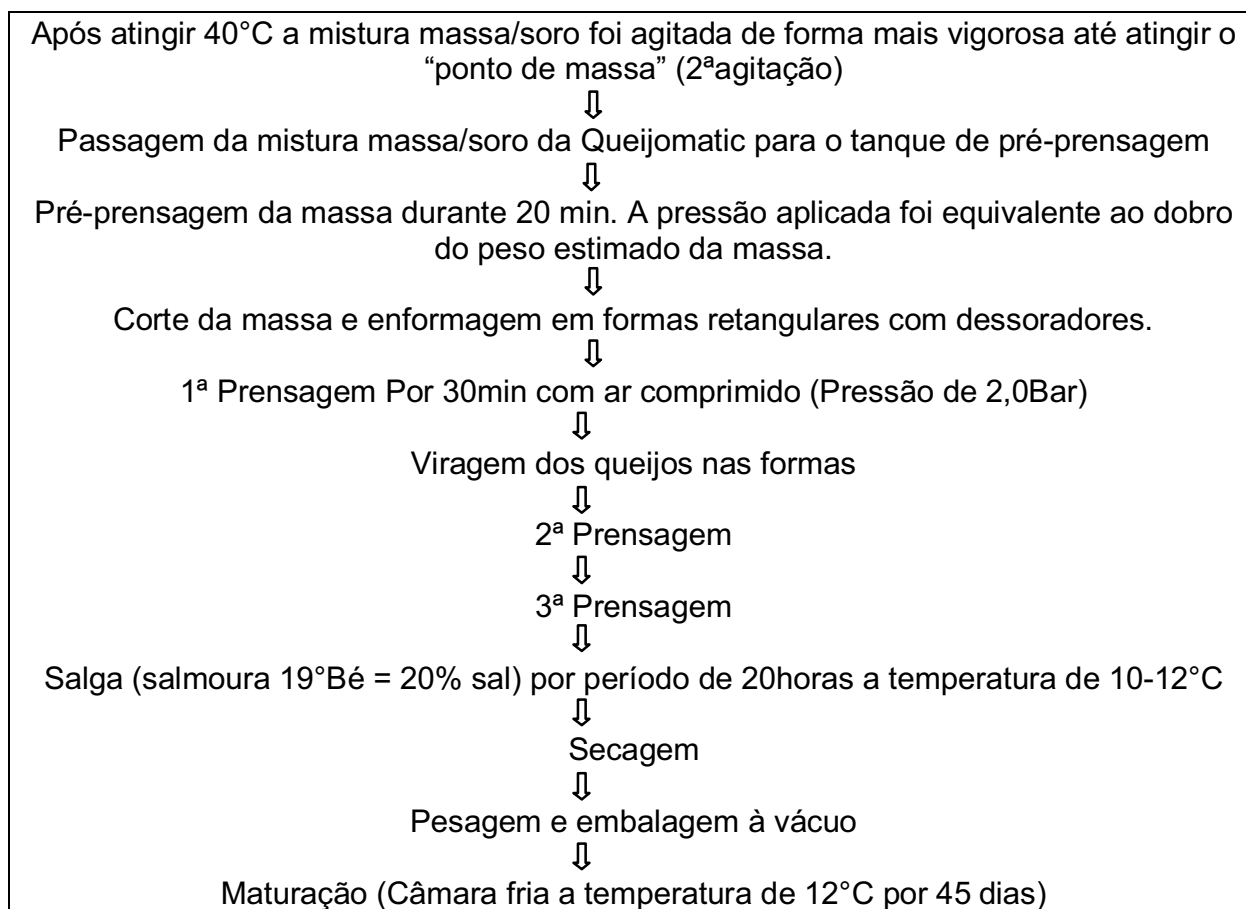


FIGURA 1 - Fluxograma geral do processamento do queijo Prato segundo FURTADO & LOURENÇO (1994), com modificações.

3.3. Caracterização microbiológica do leite pasteurizado e dos queijos

As análises realizadas no leite pasteurizado para caracterização foram, contagem padrão em placas (PCA), contagem de microrganismos psicrófilos, contagem total de bactérias lácticas, contagem de bactérias ácido lácticas, determinação de coliformes totais e termotolerantes, contagem de bolores e leveduras, contagem de *Staphylococcus aureus*, e determinação da presença de *Salmonella* sp. e de *Listeria monocytogenes*, de acordo com as metodologias da American Public Health Association (APHA, 2004), também foi realizada a contagem de bactérias lácticas non-starter (ONG & SHAH, 2008).

Para obtenção da diluição 10^{-1} foram pesados 25g do leite pasteurizado do tanque A e 25g do leite pasteurizado do tanque B (amostra composta) e em seguida foi

homogeneizado em garrafa de vidro tipo Schott, após esta etapa foi transferido 25mL desta amostra composta para um saco estéril e adicionado 225mL de água peptonada 0,01% tamponada pH 7,2 e homogeneizado por 2 minutos em *stomacker* (Lab-Blender 400). Esta mesma solução diluente foi utilizada para obtenção das demais diluições.

Três peças de queijos (de cada tratamento) foram tomadas aleatoriamente em cada data de análise e preparados para a caracterização do queijos recém processados e ao longo da sua maturação. Em condições assépticas o queijo foi dividido em três partes, sendo 25g para contra-prova, 25g para realizar análise microbiológica, 15g para análises de eletroforese e 100g foram separadas para as análises físico-químicas e bioquímicas. Os queijos, foram homogeneizados por 2 min, com o auxílio de um blender de amostras (Colworth, UL and CSA / Lab blender 400) em um saco estéril, utilizando o diluente citrato de sódio a 2% para obtenção da primeira diluição, as demais diluições foram feitas utilizando-se água peptonada 0,1% até a obtenção da diluição 10^{-9} .

3.4. Caracterização físico-química do leite pasteurizado e dos queijos

O pH foi determinado no leite e no queijo por leitura direta em um potenciômetro pH-Metro Micronal B 375 (LANARA, 1981). A acidez titulável em ácido láctico de acordo com metodologia descrita pelo manual de análise físico-química do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A densidade foi determinada através de um lactodensímetro com correção de temperatura (AOAC, 2006). A gordura foi determinada de acordo com o método de Gerber, para caracterização do leite e o método de Gerber-van Gulik, para caracterização do queijo (IDF, 1991). O extrato seco total foi determinado no leite e no queijo pelo método de secagem das amostras em cápsulas de alumínio, contendo areia tratada, até peso constante em estufa ($102\pm 2^{\circ}\text{C}$, 7 horas) (IDF, 1982). A gordura no extrato seco do queijo foi obtida mediante a fórmula: $\text{GES} = (\% \text{gordura} / \% \text{EST}) \times 100$. A lactose foi determinada no leite e no queijo de acordo com a metodologia de Acton (1977). O sal (NaCl) foi determinado no queijo pelo método de titulação com tiocianato de amônia (SERRES et al., 1973). A umidade foi calculada pelo método da diferença ($\text{U}\% = 100\% - \text{Extrato seco total}$). As cinzas foram determinadas no leite e no queijo, segundo a metodologia de Horwitz (1975) em mufla à 550°C . O nitrogênio total (NT): foi obtido de acordo com o método de Kjeldahl (IDF, 1962; IDF, 1964). A proteína total foi

calculada utilizando-se um fator de conversão de 6,38, onde se multiplica o valor do NT pelo fator de conversão resultando no valor de proteína contido no produto. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

3.5. Avaliação dos queijos durante a maturação

3.5.1. Índices da maturação

3.5.1.1. Índice de extensão da proteólise (IEP)

O índice de extensão da proteólise (IEP), obtido por meio da relação entre os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e de nitrogênio total (NT), é caracterizado pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis na fase aquosa dos queijos, resultantes da degradação da caseína pelo coalho e acumuladas durante a maturação, refletindo, portanto, a composição final e as características organolépticas do queijo. Por meio do IEP, é possível entender melhor o índice de aproveitamento dos elementos do leite na coalhada, a atividade proteolítica do coalho e das enzimas (SILVA, 1998).

3.5.1.2. Índice de profundidade da proteólise (IPP)

O índice de profundidade da proteólise (IPP) é diretamente proporcional à ação de endo e exopeptidases bacterianas (descarboxilases e desaminases) que liberam aminoácidos e outros compostos nitrogenados de baixo peso molecular, como oligopeptídeos e aminas, sendo, portanto, importante para a avaliação da atividade peptidolítica da cultura láctica (COSTA & PINHEIRO, 1998).

3.5.2. Perfil eletroforético dos queijos (URÉIA-PAGE)

A eletroforese foi realizada a partir de uma unidade vertical mini-PROTEAN® System Casting (Bio-Rad Laboratories Inc.), de acordo com o método descrito por Andrews (1983), durante o período de maturação do queijo Prato (45 dias). A concentração de poliacrilamida nos géis de separação e concentração foi respectivamente, 11% e 4%. Os extratos para eletroforese foram preparados dissolvendo-se 0,010g de amostra de queijo (equivalente a 0,4% de proteína) em 1 mL de tampão de amostra, com aquecimento a 37°C durante 1 hora. O tampão para dissolução da amostra foi preparado utilizando-se 1,5 g de tris-hidroximetil aminometano (TRIS), 84 g de uréia, ácido clorídrico concentrado até pH 6,7 e 0,1g de

azul de bromofenol, para um volume final de 200 mL com água destilada. Tanto para o padrão quanto para as amostras a quantidade aplicada no gel foi de 10µL. A separação das amostras foi feita a 120V utilizando tampão de corrida Tris 0,025M, glicina 0,192M pH 8,3. As bandas foram coradas *overnight* por imersão dos géis no corante Bio-Safe Coomassie G-250 Stain (Bio-Rad Laboratories Inc.) e descorados com água destilada.

3.6. Determinação de aminoácidos livres

A determinação dos aminoácidos livres foi realizada de acordo com as metodologias descritas por White et al. (1986) e Hagen et al. (1989). Foi realizada uma extração com reagentes específicos e reação em pré-coluna com fenilisotilcianato (PITC) e a quantificação foi realizada em CLAE fase reversa utilizando-se como padrão interno, o ácido α -aminobutírico e detecção por UV a 254 nm.

Para os aminoácidos livres as etapas realizadas foram, extração e desproteção em HCL 0,1M e metanol 99% respectivamente. Aos aminoácidos liberados na hidrólise ácida foi adicionado o ácido α -aminobutírico como padrão interno. Após a eliminação do ácido por evaporação a vácuo foi realizada um processo de re-evaporação com solução de acetato de sódio, metanol e trietilamina. Após este procedimento foi realizada a derivatização do hidrolisado com solução de metanol, água ultrapura, trietilamina e fenilisotilcianato (PITC). Os aminoácidos foram dissolvidos em diluente e introduzidos na coluna. Os eluentes com pH 6,60 contêm acetato de sódio, acetonitrila, água ultrapura, EDTA dissódico. As áreas dos picos obtidos a partir da amostra desconhecida foram quantificadas em comparação com as de uma mistura padrão de aminoácidos e padrão interno a 254 nm.

3.7. Detecção de peptídeos bioativos por Eletroforese Capilar (CE)

Os perfis eletroforético dos queijos, em relação a detecção da possível presença de peptídeos bioativos, foram determinados por eletroforese capilar (CE), seguindo o método descrito por Pacheco, Amaya-Farfan e Sgarbieri (2002) com modificações. As amostras diluídas (1mg/mL) foram homogeneizadas, filtradas em filtro milipore 45 µm e injetadas durante 8s, com pressão de 0,5 psi, em capilar de sílica fundida (60cm x 75µm d.i). Como fase móvel, utilizou-se tampão fosfato 0,01M pH 2,5 e fluxo de corrente do cátodo para o ânodo. As corridas foram conduzidas a temperatura de 30°C

em aparelho de eletroforese capilar da marca Beckman Coulter, modelo P/ACE com tensão mantida a 10kV e a absorvância monitorada a 200nm. Entre cada análise, o capilar foi lavado com solução de hidróxido de sódio 0,1N e água ultra pura, e em seguida, reconicionado com tampão de corrida.

As amostras foram centrifugadas duas vezes em centrifuga, por 30min a uma rotação de 1018g a temperatura de 0°C, entre cada centrifugação as amostras foram filtradas em filtro millipore 45µm (PVDF-tipo filtro hidrofílico-Millipore) e colocada em novo frasco, em seguida estas amostras foram liofilizadas. Para injeção no sistema capilar a amostra liofilizada foi dissolvida 0,1mg em tampão fosfato 0,01M pH 2,5 e filtrado em filtro millipore 45µm. Os padrões foram dissolvidos no mesmo tampão e filtrados para sua injeção no equipamento de CE na concentração (0,1mg/mL) e os picos foram comparados com os picos presentes no queijo de modo a identificar a possível semelhança e presença dos tripeptídeos bioativos VPP e IPP.

3.8. Análise sensorial

Foi conduzido um teste de aceitabilidade com 7 e 30 dias de fabricação sendo recrutados 100 consumidores de queijos em geral, sem restrições quanto ao sexo, idade ou classe social, apreciadores de queijo Prato.

Conforme diretrizes gerais para testes afetivos descritas por Meilgaard et al. (2006), as amostras foram avaliadas quanto à aceitabilidade da aparência, aroma, textura, sabor e do produto de modo global por meio de escalas hedônicas de nove pontos (9 = gostei muitíssimo, 5 = não gostei nem desgostei e 1 = desgostei muitíssimo), quanto à intensidade da cor, aroma, maciez, sabor característico de queijo Prato, gosto salgado, gosto ácido e gosto amargo por meio de escala do ideal de sete pontos (+3 = muito mais intenso do que eu gosto, 0 = do jeito que eu gosto e -3 = muito menos intenso do que eu gosto) e quanto à intenção de compra por meio de escala de cinco pontos (5 = certamente compraria, 3 = talvez sim, talvez não compraria e 1 = certamente não compraria), solicitando-se a descrição de gostos e desgostos associados a cada amostra, conforme modelo de ficha apresentado no Anexo 1.

Foram apresentadas três amostras, o queijo Prato controle, adicionado de *L. helveticus* e comercial “tipo lanche”. As amostras foram apresentadas com códigos de

três números aleatórios sendo oferecida água mineral natural para uso antes e entre as amostras visando limpar o palato, servidas de forma monádica sequencial segundo um delineamento de blocos completos balanceados em pratos descartáveis.

O teste foi conduzido em cabines individuais com iluminação de lâmpadas fluorescentes e equipadas com o sistema computadorizado *Compusense Five versão 5.4* para coleta e análise dos dados. Os dados relativos à intensidade da cor, aroma, maciez, sabor característico de queijo Prato, gosto salgado, gosto ácido e gosto amargo foram tratados em termos de distribuição em frequência dos valores da escala atribuídos pelos consumidores, calculando-se a soma das porcentagens de classificações acima do ideal (valores +3 a +1 da escala), ideal (valor 0) e abaixo do ideal (valores -3 a -1 da escala). Da mesma forma, para a intenção de compra também foram calculadas as somas das porcentagens relativas à pontuação acima do ponto médio da escala (valores 5 e 4 da escala), no ponto médio (valor 3) e abaixo do ponto médio (valores 2 e 1 da escala), correspondentes respectivamente à porcentagem de consumidores que indicaram intenção de compra positiva, incerta ou negativa.

Além das questões relacionadas à avaliação dos produtos, os consumidores responderam a questões sobre hábitos de consumo de queijos e características pessoais relacionadas à idade e definição de classe social segundo o critério de classificação econômica Brasil (ABEP, 2012).

3.9. Análise Estatística

Os dados de determinação de aminoácidos foram submetidos à análise de variância ao nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$) para comparação de médias através do uso do *software STATISTICA 5.0®*, statsoft.

Já para análise dos resultados obtidos na análise sensorial, foram comparados entre si por meio de análise de variância e teste de Tukey ao nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$) utilizando-se o programa Fizz Sensory Software 2.47B, módulo Fizz Calculation. Para comparar efeito do tempo de maturação na intensidade da cor, aroma, maciez, sabor característico de queijo Prato, gosto salgado, gosto ácido e gosto amargo, foi efetuado o teste estatístico, utilizando-se o programa Excel (MEILGAARD et al., 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição da matéria-prima (leite pasteurizado)

A Tabela 1 apresenta a composição média e o desvio padrão das amostras de leite destinado à fabricação do queijo Prato.

TABELA 1. Caracterização físico-química e microbiológica do leite pasteurizado

Composição	Leite Pasteurizado
Ph	6,91
Acidez (°D)	18,28±0,32
Densidade (g/mL)	1,034
Gordura (%)	3,37±0,06
Extrato Seco total (%)	11,98±0,29
Gordura no Extrato Seco (%)	27,55
Umidade (%)	88,02
Cinzas (%)	0,69±0,01
NT (%)	0,62±0,03
Proteína Total (%)	3,92±0,2
Contagem de mesófilos totais	2,5x10 ² UFC**/mL
Contagem de bactérias psicrótróficas	<1 UFC**/mL
Coliformes a 30-35°C e termotolerantes	<0,3 NMP***mL
Contagem de bolores e leveduras	<1 UFC**/mL
Contagem de NSLABs*	3,2x10 ¹ UFC**/mL
Contagem total de bactérias lácticas	5,3x10 ² UFC**/mL
<i>Salmonella</i> sp. (em 25g)	Ausente

*NSLABs – Bactérias lácticas não starter.

**UFC – Unidade formadora de colônia.

***NMP – Número mais provável.

Observa-se que o leite utilizado na fabricação dos queijos atendeu aos padrões exigidos pela IN 62 (BRASIL, 2011) quanto aos parâmetros físico-químicos: mínimo 3% de gordura, acidez entre 14 a 18°D, densidade relativa a 15°C entre 1,028 a 1,034 g/mL e mínimo 2,9% de proteína total. Pode-se observar também que a matéria-prima atende as exigências de qualidade microbiológica (ANVISA, 2001).

4.2. Caracterização físico-química e microbiológica dos queijos

A Tabela 2 apresenta a composição físico-química dos queijos Prato com e sem adição da cultura adjunta de *L. helveticus*. Observou-se que os queijos apresentam composição típica de queijo Prato, conforme estabelecido na Portaria 358 (BRASIL, 1997) e segundo Furtado e Lourenço Neto (1994). As diferenças observadas entre os tratamentos são pequenas e tais valores são próximos aos valores encontrados por Tenório (2012) e Spadoti et al. (2004) para composição físico-química de queijo Prato tradicional. Os resultados indicam que a adição da cultura adjunta de *L. helveticus* no queijo Prato (CHN-22 adicionado de LH) não afetou sua composição.

TABELA 2. Caracterização físico-química de queijo Prato com 3 dias de fabricação

Análises	Queijo Prato CHN-22	Queijo Prato CHN-22 Adicionado de LH
pH	5.36±0.06	5.40±0.05
Acidez (% acidez titulável)	0.6±0.08	0.61±0.09
Extrato Seco Total (%)	55.44±0.88	59.14±0.23
Umidade (%)	44.56±0.87	40.86±0.23
Gordura (%)	29.39±1.34	29.05±0.59
Cinzas(%)	5.14±0.09	4.78±0.39
Sal (%)	2.68±0.09	2.17±0.57
Proteína Total (%)	26.33±0.34	26.51±0.37

Na Tabela 3 estão apresentadas as contagens microbiológicas dos queijos. De acordo com os resultados observados podemos verificar que os queijos atendem aos padrões microbiológicos exigidos para o consumo do produto, o qual estabelece as seguintes tolerâncias para contagem de coliforme a 45°C até 10^3 UFC.g⁻¹, estafilococcus coagulase positiva até 10^3 UFC.g⁻¹, pesquisa de *Salmonella* sp. (ausente) e *Listeria monocytogenes* (ausente) (ANVISA, 2001).

TABELA 3. Caracterização microbiológica de queijo Prato com 3 dias de fabricação

Análises	Queijo Prato CHN-22	Queijo Prato CHN-22 adicionado de LH
<i>Salmonella</i> sp. (em 25g)	Ausente	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25g)	Ausente	Ausente
Estafilococos coagulase positiva (log UFC*.g ⁻¹)	<2	<2
Contagem de mesofilos totais (log UFC*.g ⁻¹)	8,63	8.83
Contagem de bactérias psicrótróficas (log UFC*.g ⁻¹)	9.86	9.53
Contagem de bolores e leveduras (log UFC*.g ⁻¹)	<1	<1
Coliformes a 30-35°C e termotolerantes (NMP**/g)	<3	<3
Contagem de bactérias ácido lácticas (log UFC*.g ⁻¹)	8.51	8.52
Contagem total de bactérias lácticas (log UFC*.g ⁻¹)	8.20	8.88
Contagem de <i>Lactococcus lactis</i> (log UFC*.g ⁻¹)	9.05	9.15
Contagem de <i>L. helveticus</i> (log UFC*.g ⁻¹)	<1	4,03

*UFC: Unidade formadora de colônia por grama de amostra

**NMP: Numero mais provável por grama de amostra

4.2.1. Evolução quantitativa de culturas lácticas durante a maturação

A contagem de células viáveis ao longo da maturação normalmente decresce em decorrência da viabilidade celular diminuir, em consequência da autólise. Analisando as curvas de evolução da microbiota nos queijos com e sem adição de cultura adjunta, evidenciam-se os decréscimos nas contagens dos microrganismos analisados ao longo do período de maturação. A Figura 2 apresenta a evolução da contagem microbiana no ágar M17 durante os 45 dias de maturação para os queijos fabricados com e sem adição de cultura adjunta.

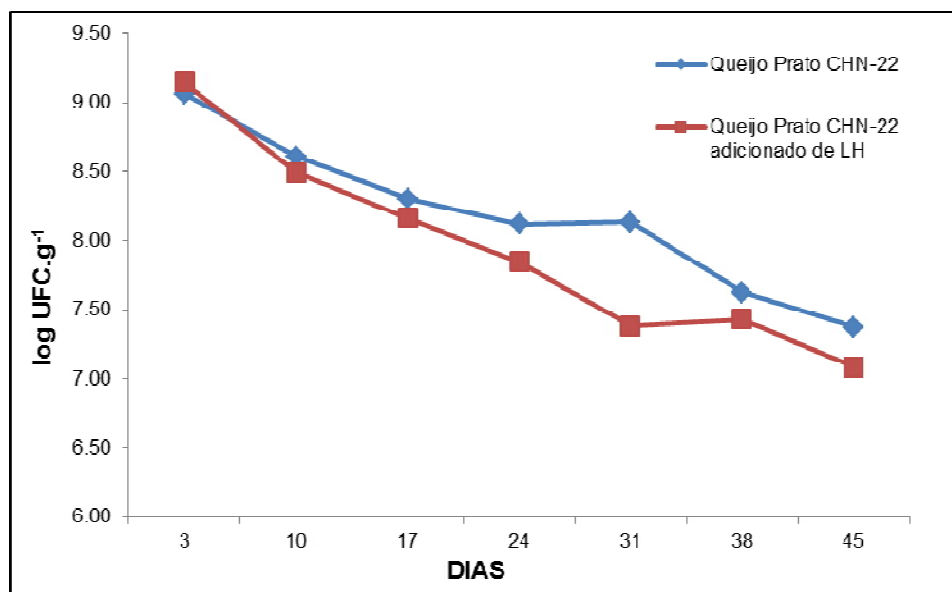


FIGURA 2: Evolução da microbiota no ágar M17 durante os 45 dias de maturação para os queijos fabricados com e sem adição de cultura adjunta.

A Figura 3 apresenta a evolução das contagens de bactérias ácido lácticas em meio de cultura LBS ágar durante os 45 dias de maturação.

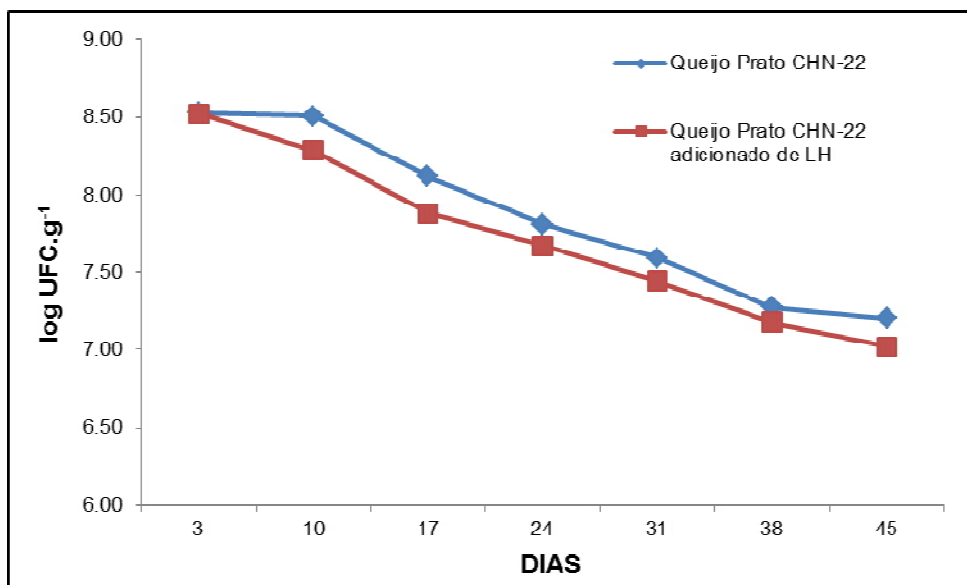


FIGURA 3. Evolução da contagem no ágar LBS durante os 45 dias de maturação para os queijos fabricados com e sem adição de cultura adjunta.

O LBS ágar é um meio para isolamento seletivo para lactobacilos. Este meio possivelmente permite o crescimento de *L. helveticus*, mas quando realizamos a análise seletiva para este microrganismo obtivemos uma contagem menor, o que indica que a elevada contagem em ágar LBS é possivelmente proveniente dos lactobacilos provenientes da microbiota natural do leite (SHAH & ONG, 2008).

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 2 e 3, podemos observar, durante o período de maturação, que houve um decréscimo na ordem de 1,5 a 2 log de UFC.g⁻¹ em ambos os queijos.

A Figura 4 apresenta a evolução da contagem no ágar MRS pH 5,4 durante o período de maturação para os queijos Prato. Observou-se contagem seletiva de *L. helveticus*, comprovada pela ausência de colônias cultiváveis quando analisado queijo Prato controle (CHN-22) no meio MRS ágar acidificado e incubação a 45°C. No queijo adicionado da cultura adjunta foi encontrada redução de aproximadamente 1,5 log UFC.g⁻¹ de *L. helveticus* entre início e final do período de maturação o que demonstra a possível lise celular. Destaca-se que com a lise celular pode ocorrer liberação de aminoácidos que aceleram o processo de maturação do queijo (MORENO, 2003), desta forma, através da liberação de aminoácidos pode ocorrer a possível produção de peptídeos bioativos.

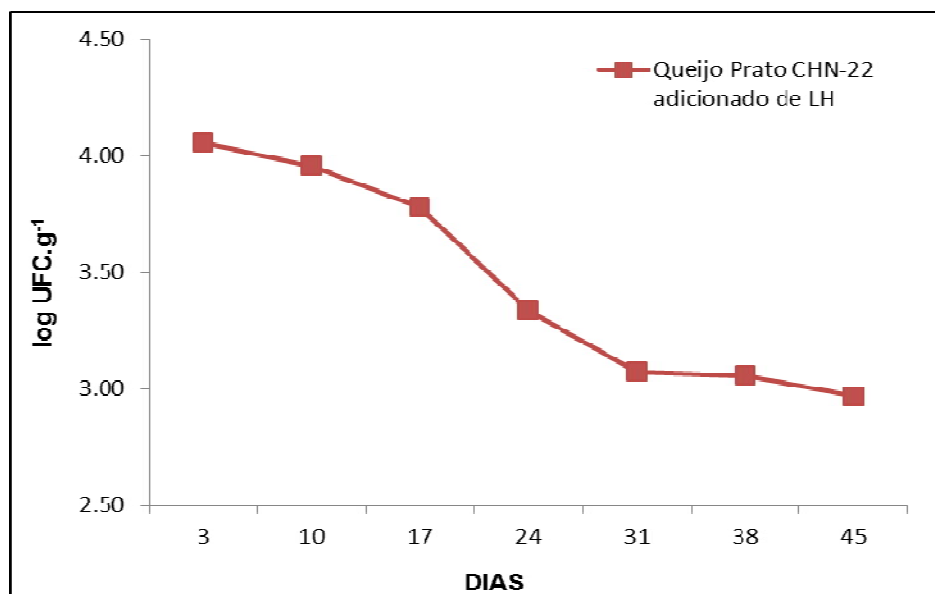


FIGURA 4. Evolução da contagem seletiva em ágar MRS pH 5,4 durante os 45 dias de maturação para os queijos fabricados com adição de cultura adjunta.

4.3. Avaliação dos queijos durante a maturação

4.3.1. Índices da maturação

A detecção e quantificação dos produtos de degradação das proteínas dos queijos são usadas como parâmetro 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 (LAWRENCE et al., 1987).

A Figura 5 apresenta a evolução do índice de extensão de proteólise (IEP) durante os 45 dias de maturação para os queijos fabricados com e sem adição de culturas adjuntas. Os índices de IEP dos queijos Prato praticamente não diferiram entre si, embora todos tenham apresentado aumento deste índice ao longo do tempo de maturação, com índice levemente superior para a amostra adicionada da cultura adjunta ao término do período de maturação. A proteólise depende da ação de agentes de diversas fontes, tais como enzimas residuais do coalho (quimosina), da cultura láctica e da microbiota composta por bactérias lácticas non-starter (NSLAB), entre outras (SOUZA & MCSWEENEY, 2001). Porém, na fase de quebra da caseína, medido

pele IEP, a quimosina é a principal responsável pela proteólise (FOX & MCSWEENEY, 1998) e não as enzimas do fermento.

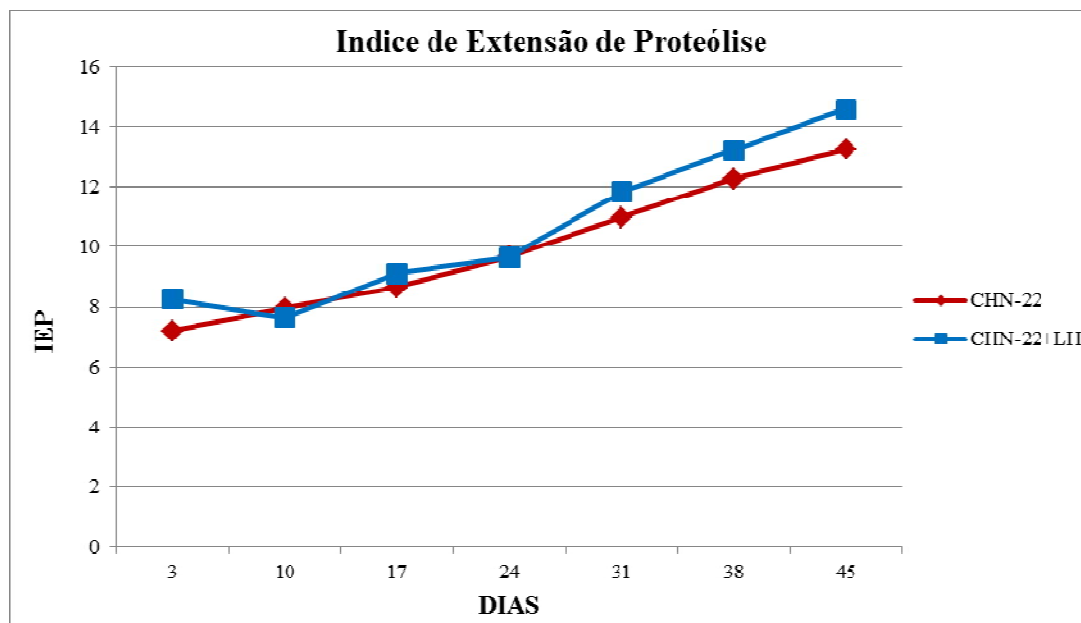


FIGURA 5. Índice de Extensão de Proteólise nos queijos com e sem adição de cultura adjunta durante o período de maturação (45 dias).

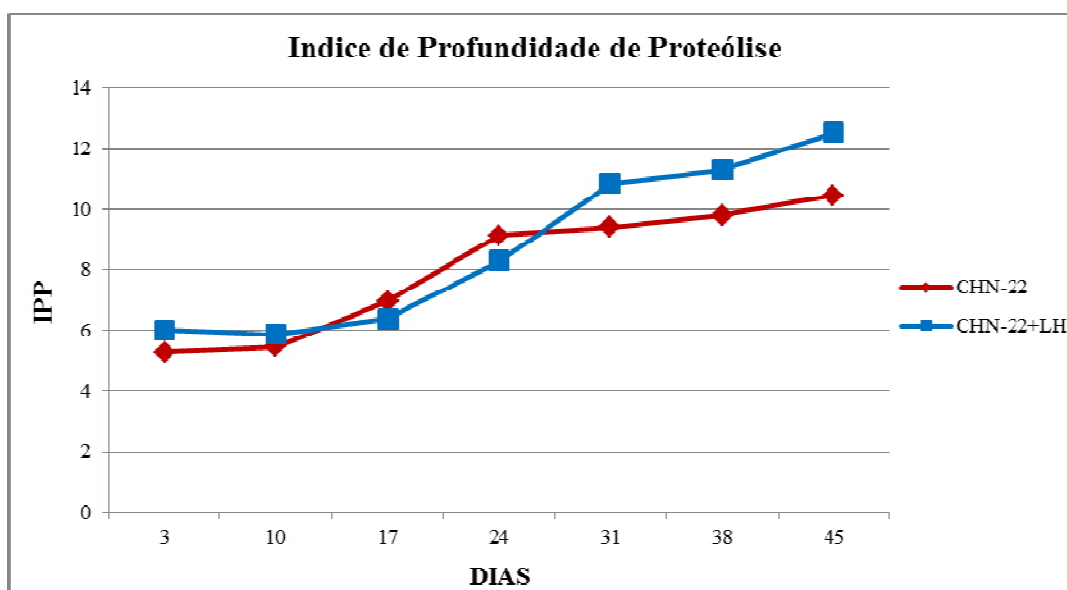


FIGURA 6. Índice de Profundidade de Proteólise nos queijos com e sem adição de cultura adjunta durante o período de maturação (45 dias).

Com relação ao índice de profundidade de proteólise (IPP), os queijos Prato também praticamente não diferiram entre si, durante os 45 dias de maturação. Nota-se uma tendência de estabilização da proteólise no queijo sem adição de cultura adjunta e o aumento no queijo com adição da cultura adjunta. Tal comportamento também foi observado em estudo anterior, realizado por Moreno (2003) com queijos Prato elaborados com fermento CHN-22 e com o mesmo fermento adicionado de *Lactobacillus helveticus*. Neste estudo anterior, ambos os queijos não apresentaram diferença significativa com relação aos seus IPPs durante 60 dias de estocagem, embora tenha sido observada uma tendência, a partir do 31º dia de estocagem, dos queijos elaborados com *L. helveticus* apresentarem valores superiores de profundidade de proteólise em relação aos queijos elaborados sem o uso desta cultura.

4.3.2. Perfil Eletroforético dos queijos (URÉIA-PAGE)

Uma vez que os índices de maturação não refletem a totalidade das transformações que as proteínas sofrem durante a maturação, a técnica utilizada para a detecção do perfil eletroforético é uma técnica onde a desnaturação é realizada com a utilização de uréia, pois oferece uma melhor resolução para peptídeos pequenos (BALDINI, 1998). O perfil de separação obtido na eletroforese pode ser dividido em varias regiões, componentes que se movam mais rapidamente, ou seja, a α_{s1} -caseína, a β -caseína e os componentes de baixa mobilidade γ_2 -, γ_1 - e γ_3 -caseínas.

Nas primeiras semanas de maturação, a proteólise primária da caseína deve-se à atividade residual do coalho, das proteinases nativas do leite, principalmente a plasmina e em maior extensão, de proteinases do fermento láctico e NSLAB (FOX & McSWEENEY, 1998). O coalho hidrolisa as ligações mais susceptíveis na α_{s1} -caseína e na β -caseína, sendo muito mais intensa na α_{s1} -caseína (VISSER et al., 1993).

Analisando o perfil eletroforético na Figura 7, podemos observar que houve um aumento no desdobramento da fração α_{s1} -caseína pela ação do coalho, que pode ser claramente observada pelo aparecimento de uma banda de maior intensidade, correspondente à α_{s1-1} -caseína, um polipeptídeo de alto peso molecular, de caráter ácido e mobilidade eletroforética ligeiramente maior que a α_{s1} -caseína. Por sua vez, essa degradação pode ser melhor observada no queijo com a adição da cultura adjunta

de *L. helveticus*. Já a degradação da β -caseína foi pequena, mas se deu pela presença da cultura adjunta, pois os *L. helveticus* tem potencial de hidrolisar a β -caseína, isso é evidenciado pelo aparecimento das bandas de γ_3 -, γ_1 - e γ_2 -, já visíveis com 10 dias de maturação, mais evidentemente no queijo com adição da cultura adjunta, resultados observado também por Farkye & Fox (1991) e El Soda (1982). Aos 17 dias de maturação no queijo adicionado da cultura adjunta, a banda correspondente a γ_3 -caseína apresentou intensidade equivalente a do queijo sem adição dessa cultura aos 45 dias de maturação.

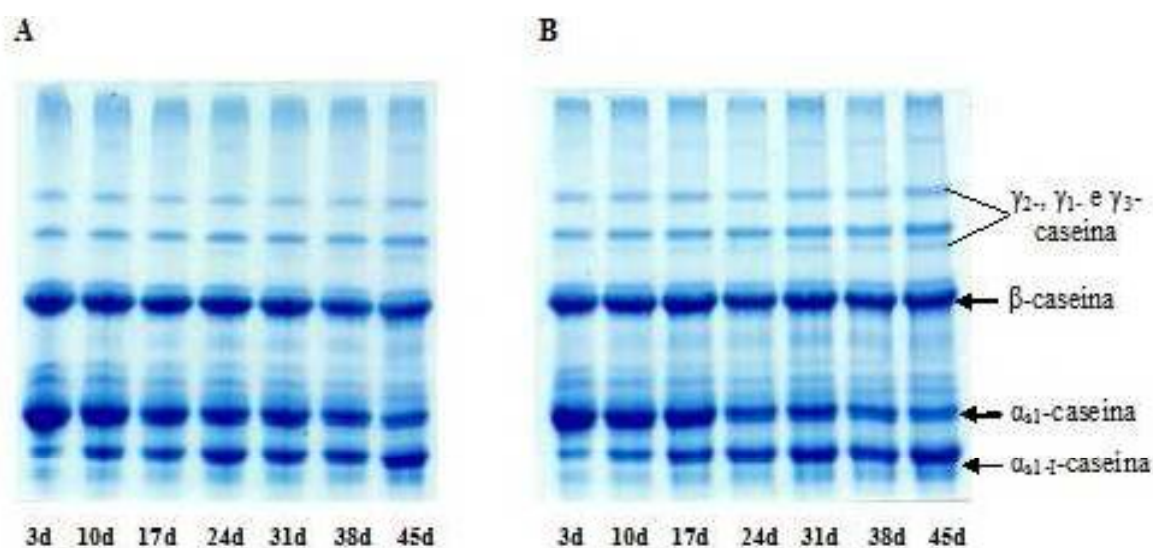


FIGURA 7. Perfil eletroforético dos queijos Prato com e sem adição de cultura adjunta de *L. helveticus* durante o período de maturação (45 dias). **A:** Queijo Prato CHN-22 e **B:** Queijo Prato CHN-22 adicionado de LH.

4.4. Determinação de aminoácidos livres

Na Tabela 4, são apresentadas as concentrações dos aminoácidos livres totais encontrados nos queijos sem e com adição da cultura adjunta com 45 dias de maturação.

Observou-se que as amostras de queijo adicionadas de *L. helveticus* apresentaram teores maiores de aminoácidos comparadas com as amostras sem adição desta cultura. Pelo teste estatístico apenas os aminoácidos histidina, cistina e triptofano não diferiram quantitativamente entre as amostras ($p \leq 0,05$). Ressalta-se que

fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina e valina foram encontrados em quantidade superiores ($p \leq 0,05$) nas amostras com adição da cultura adjunta.

A microbiota dos queijos pode ser dividida em dois grupos, do ponto de vista bioquímico: bactérias lácticas iniciadoras e microrganismos secundários (microrganismos adicionados). As bactérias lácticas, são responsáveis pela transformação de lactose em ácido láctico durante a preparação do queijo, suas enzimas também contribuem na maturação, estando envolvidas na proteólise e na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas propriedades organolépticas do produto (BERESFORD, et al. 2001).

Não existe uma correlação direta entre o aroma dos queijos e a concentração de aminoácidos livres. Sabe-se, no entanto, que estes podem ser metabolizados por enzimas bacterianas produzindo produtos menores, entre os quais flavorizantes. Jollivet et al. (1992), por exemplo, demonstrou em seu estudo que o microrganismo *Brevibacterium linens* produz amônia, aminas, álcoois, aldeídos e os ácidos caprótico e 3-metilbutírico a partir de aminoácidos, todos esses produtos influenciam, em maior ou menor grau, o sabor e o aroma dos queijos. Produtos da degradação de aminoácidos contendo enxofre desempenham papel particularmente importante. L-metionina, por exemplo, pode ser degradada a S-metiltioésteres e metanotiol ao qual se atribui o odor característico de queijos como Gruyère, Comté e outros. Já o sabor amargo que, às vezes, se observa em alguns queijos é atribuído à liberação excessiva de peptídeos de baixo peso molecular. A Figura 8 apresenta um esquema geral da degradação de aminoácidos em queijos (PERRY, 2004).

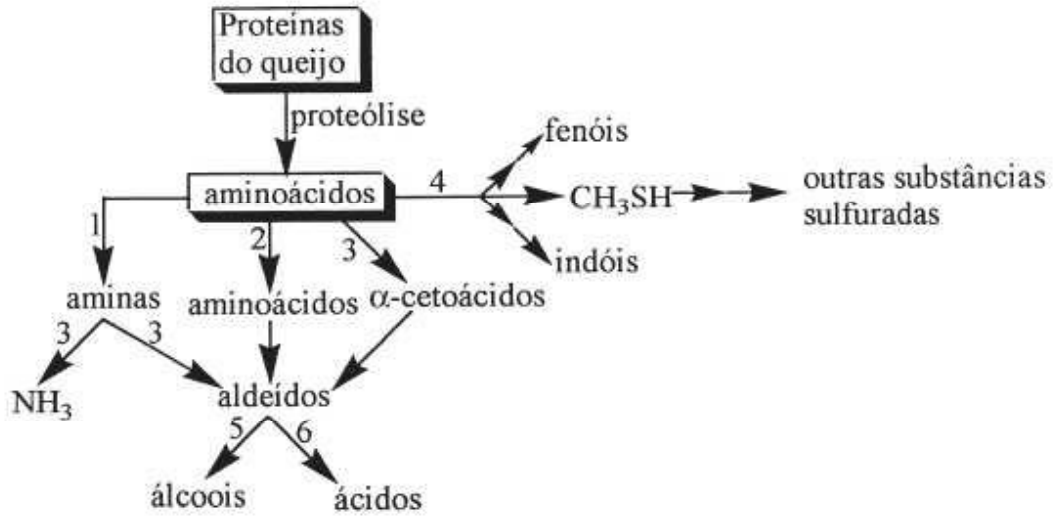


FIGURA 8. Esquema geral de proteólise decorrente da ação microbiana durante a maturação de queijos: 1 = descarboxilação; 2 = transaminações; 3 = desaminações oxidativas; 4 = degradações; 5 = reduções; 6 = oxidações (PERRY, 2004).

TABELA 4. Quantificação de aminoácidos nos queijos Prato sem e com adição da cultura adjunta de *L. helveticus*.

Aminoácidos Livres (mg/100g de amostra)	Queijo CHN-22	Queijo CHN-22 adicionado de LH	Valor p
Ác. Aspartico	25.01±0.00	29.24±0.00	0.000102
Ác. Glutâmico	269.98±0.00	325.91±0.00	0.000000
Serina	100.13±0.00	114.58±0.00	0.000000
Glicina	37.95±0.00	42.71±0.00	0.000103
Histidina*	59.86±0.00	63.05±0.00	0.101868
Arginina	25.05±0.00	28.65±0.00	0.001410
Treonina	36.94±0.00	46.99±0.00	0.000070
Alanina	30.13±0.00	33.13±0.00	0.003001
Prolina	44.95±0.00	55.60±0.00	0.000444
Tirosina	44.15±0.00	55.82±0.00	0.000067
Valina	81.99±0.00	97.05±0.00	0.000023
Metionina	27.28±0.00	35.45±0.00	0.000000
Cistina*	1.49±0.00	1.60±0.00	0.244167
Isoleucina	33.81±0.00	44.22±0.00	0.000005
Leucina	282.55±0.00	315.79±0.00	0.000000
Fenilalanina	129.77±0.00	150.25±0.00	0.000010
Lisina	145.38±0.00	187.09±0.00	0.000000
Triptofano*	121.58±0.01	128.99±0.01	0.515849

* amostras que não diferiram significativamente ($p>0,05$).

4.5. Detecção da possível presença de peptídeos bioativos por Eletroforese Capilar (CE)

Os métodos mais citados na literatura para a detecção dos tripeptídeos Valina-Prolina-Prolina (VPP) e Isoleucina-Prolina-Prolina (IPP), são por HPLC e eletroforese capilar (CE) ambos os métodos devendo ser associado a um espectro de massa. No presente trabalho foi possível apenas empregar a metodologia de detecção dos tripeptídeos por eletroforese capilar (CE).

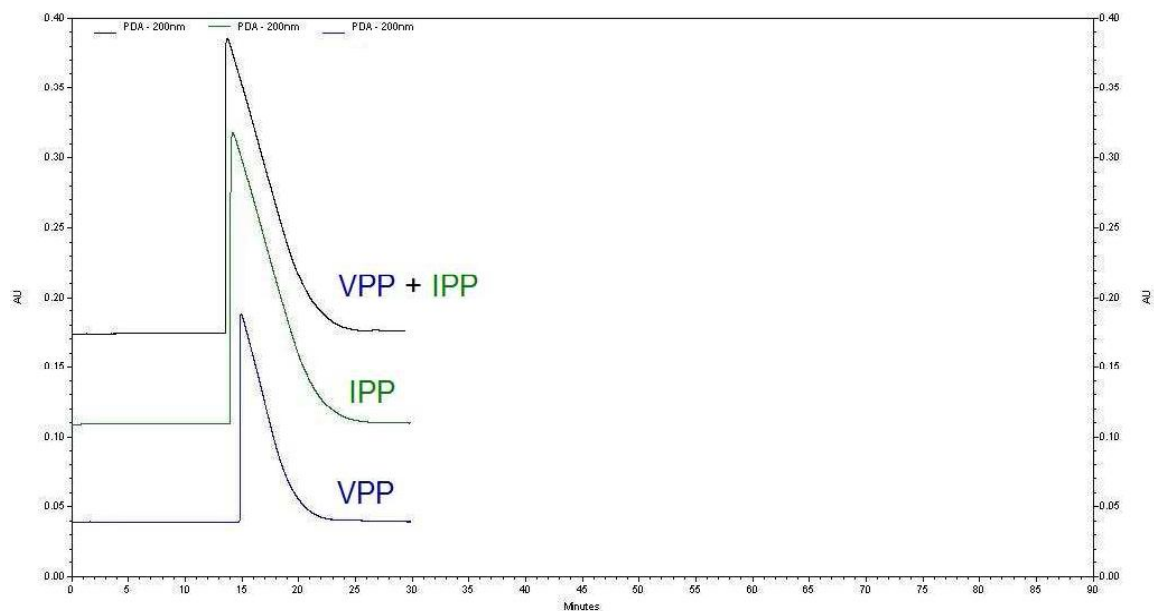


FIGURA 9. Eletroferograma dos padrões Valina-Prolina-Prolina e Isoleucina-Prolina-Prolina e mistura dos dois padrões.

Quando realizadas as corridas dos padrões observou-se tempo de retenção na faixa de 14 a 21 minutos, sendo que não houve diferenciação entre os tempos de retenção para cada um dos tripeptídeos ou quando os dois foram associados.

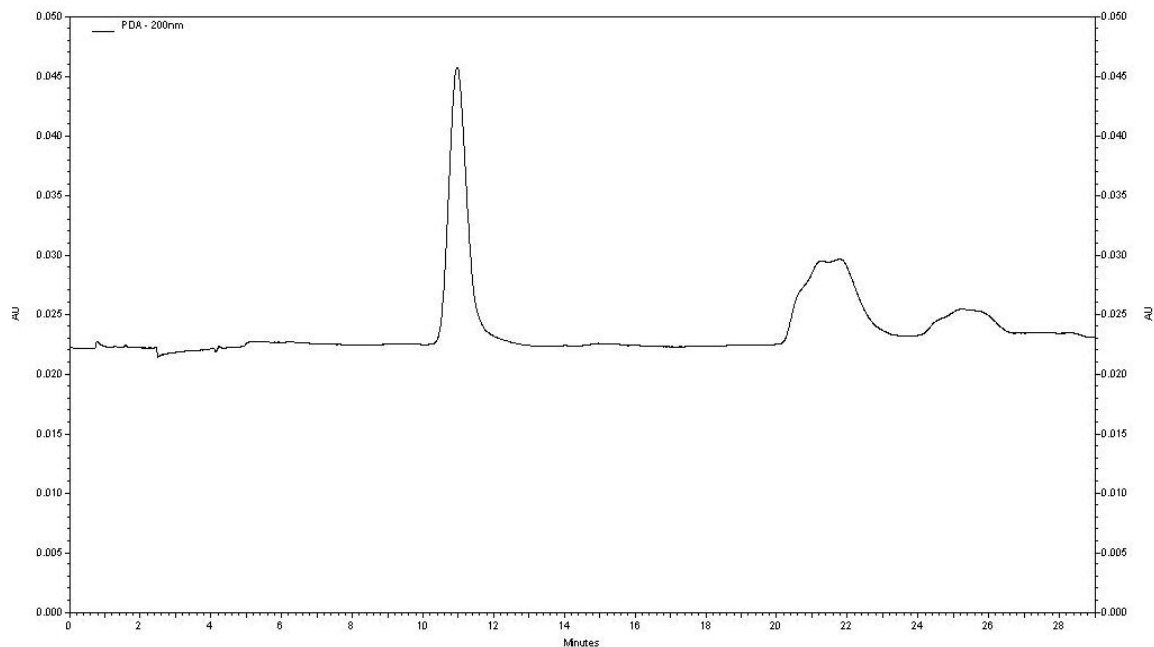


FIGURA 10. Eletrosferograma da amostras de queijo Prato adicionado de *L. helveticus* após 31 dias de maturação.

Foram analisadas as amostras de queijo adicionadas ou não de *L. helveticus* nos tempos de maturação 3, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias. Foi encontrado apenas para a amostra adicionada da cultura adjunta aos 31 dias de maturação um pico com tempo de retenção na faixa de 9 a 12 minutos, possivelmente indicativa da presença dos tripeptídeos de interesse.

4.6. Análise sensorial

Os resultados médios obtidos no teste de aceitabilidade da aparência, aroma, textura, sabor e do produto de modo global e quanto à intenção de compra das amostras de queijo Prato com 7 dias de fabricação são apresentados na Tabela 5.

Verifica-se que as três amostras, queijo Prato controle (CHN-22), queijo Prato adicionado de CHN-22 adicionado de LH e queijo Prato comercial, não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) quanto à aceitabilidade da textura, sendo que todas obtiveram médias situadas entre “gostei pouco” e “gostei”.

As amostras diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) em relação a alguns aspectos. A aceitabilidade da aparência da amostra de queijo adicionado da cultura adjunta obteve

média próxima a “gostei” na escala utilizada e foi melhor aceita do que a amostra comercial, enquanto a amostra controle, sem adição da cultura adjunta obteve valor médio intermediário e não diferiu do queijo controle (CHN-22): Para aceitabilidade do aroma, sabor e aceitabilidade do produto de modo global a amostra adicionada de *L. helveticus* obteve média próxima a “gostei” sendo a amostra com melhor aceitação em relação as demais amostras. Em relação a esses parâmetros, as amostras comercial e a não adicionada de *L. helveticus*, obtiveram médias próximas e não diferiram entre si.

Quanto a intenção de compra a amostra adicionada de LH obteve média correspondente a “provavelmente compraria” na escala utilizada e diferiu das demais amostras avaliadas. Por outro lado a amostra comercial e não adicionada de cultura adjunta, obtiveram médias situadas entre “talvez sim, talvez não compraria” e “provavelmente compraria” e não diferiram entre si.

TABELA 5. Resultados obtidos no teste para avaliação da aceitabilidade da aparência, aroma, textura, sabor e do produto de modo global e quanto à intenção de compra das amostras de queijo Prato com 7 dias de fabricação*.

Aceitabilidade e intenção de compra	Amostras			D.M.S
	Queijo CHN-22	Queijo CHN-22+LH	Comercial	
Aceitabilidade da aparência	6,9 (1,4) ^{ab}	7,2 (1,1) ^a	6,5 (1,7) ^b	0,45
Aceitabilidade do aroma	6,5 (1,5) ^b	7,1 (1,1) ^a	6,5 (1,5) ^b	0,42
Aceitabilidade da textura	6,4 (1,5) ^a	6,8 (1,4) ^a	6,8 (1,6) ^a	0,45
Aceitabilidade do sabor	6,3 (1,6) ^b	7,0 (1,4) ^a	6,0 (1,8) ^b	0,50
Aceitabilidade do produto de modo geral	6,4 (1,6) ^b	7,1 (1,3) ^a	6,1 (1,8) ^b	0,49
Intenção de compra	3,4 (1,2) ^b	3,9 (1,0) ^a	3,1 (1,2) ^b	0,37

* Resultado expresso como *média (desvio-padrão)* entre 100 avaliações.

D.M.S.: Diferença mínima significativa ao nível de significância de 5% (Teste de Tukey). Para cada atributo (linha), valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Já os resultados médios obtidos no teste de aceitabilidade da aparência, aroma, textura, sabor e do produto de modo global e quanto à intenção de compra das amostras de queijo Prato com 30 dias de fabricação são apresentados na Tabela 6.

Verifica-se que as três amostras não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) quanto à aceitabilidade da textura, sendo que todas obtiveram médias correspondentes a “gostei”.

As amostras diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) em relação a alguns aspectos, conforme descrito a seguir. A aceitabilidade da aparência, na qual amostra adicionada de *L. helveticus* obteve média situada entre a “gostei” e “gostei muito” na escala utilizada e foi melhor aceita do que a amostra controle (sem adição de *L. helveticus*) que obteve média correspondente a “gostei”, enquanto a amostra comercial obteve valor médio intermediário e não diferiu de nenhuma das amostras anteriormente citadas. Para aceitabilidade do aroma e avaliação do produto de modo global a amostra adicionada da cultura adjunta obteve média correspondente a “gostei” e foi melhor aceita do que as demais amostras, já as amostras comercial e amostra não adicionada de cultura adjunta obtiveram médias situadas entre “gostei pouco” e “gostei” e não diferiram entre si. Em relação a aceitabilidade do sabor a amostra adicionada da cultura LH obteve média correspondente a “gostei” na escala utilizada e foi melhor aceita do que a amostra comercial, que obteve média situada entre “gostei pouco” e “gostei”, enquanto a amostra controle (sem cultura LH) obteve valor médio intermediário e não diferiu de nenhuma das amostras anteriormente citadas. Quanto a intenção de compra a amostra adicionada de cultura adjunta obteve média correspondente a “provavelmente compraria” na escala utilizada e diferiu das amostras comercial e sem adição de cultura adjunta, as quais obtiveram médias situadas entre “talvez sim, talvez não compraria” e “provavelmente compraria” e não diferiram entre si.

Assim sendo, a cultura adjunta *L. helveticus* contribui para aprimorar as características sensoriais do queijo Prato, conferindo-lhe superioridade quando comprado ao queijo elaborado sem esta cultura e uma marca comercial.

TABELA 6. Resultados obtidos no teste para avaliação da aceitabilidade da aparência, aroma, textura, sabor e do produto de modo global e quanto à intenção de compra das amostras de queijo Prato com 30 dias de fabricação*.

Aceitabilidade e intenção de compra	Amostras			D.M.S.
	Queijo CHN-22	Queijo CHN-22+LH	Comercial	
Aceitabilidade da aparência	7,0 (1,2) ^b	7,4 (0,9) ^a	7,2 (1,2) ^{ab}	0,33
Aceitabilidade do aroma	6,7 (1,3) ^b	7,1 (1,1) ^a	6,6 (1,4) ^b	0,41
Aceitabilidade da textura	7,0 (1,1) ^a	6,9 (1,3) ^a	7,1 (1,2) ^a	0,36
Aceitabilidade do sabor	6,7 (1,4) ^{ab}	7,1 (1,2) ^a	6,4 (1,8) ^b	0,49
Aceitabilidade do produto de modo geral	6,7 (1,3) ^b	7,3 (1,2) ^a	6,5 (1,6) ^b	0,43
Intenção de compra	3,6 (1,0) ^b	4,1 (1,0) ^a	3,3 (1,2) ^b	0,36

* Resultado expresso como *média* (*desvio-padrão*) entre 100 avaliações.

D.M.S.: Diferença mínima significativa ao nível de significância de 5% (Teste de Tukey). Para cada atributo (linha), valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

5. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho, podemos concluir que os queijos elaborados apresentaram composição típica de queijo Prato e atenderam aos padrões microbiológicos exigidos para o consumo do produto. Em relação ao perfil eletroforético as amostras adicionadas de *L. helveticus* apresentaram banda mais evidentes correspondente à fração α_{s1-I} -caseína e γ_{3-} , γ_{1-} e γ_{2-} -caseína. Na avaliação sensorial o queijo adicionado da cultura adjunta foi mais bem aceita sensorialmente do que a amostra controle (apenas adicionado de CHN-22) e queijo comercial diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) destes em alguns parâmetros. Observou-se aumento dos índices de extensão de proteólise (IEP) e profundidade da proteólise (IPP) ao longo da maturação dos queijos, porém não houve variação expressiva entre os tratamentos. Através da análise do aminograma, as amostras de queijo adicionadas de *L. helveticus* apresentaram teores maiores de aminoácidos comparadas com as amostras sem adição desta cultura. Pelo teste estatístico apenas os aminoácidos Histidina, Cistina e Triptofano não diferiram quantitativamente entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). Na eletroforese capilar (CE) foi encontrado apenas para a amostra adicionada da cultura adjunta aos 31 dias de maturação um pico com tempo de retenção na faixa de 9 a 12 minutos, indicando a possível presença dos tripeptídeos de interesse na amostra.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABEP, 2011 - Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. Critério de Classificação Econômica Brasil. Dados com base no levantamento Sócio Econômico 2009 – IBOPE. Disponível em www.abep.org. Acesso em 10/09/2011. 4p.

ABIQ, 2012. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Evolução do Mercado de queijos.

ACTON GH (1977). The determination of lactose in cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, p.111.

ANDREWS AT (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.*, Cambridge, v.50, n.1, p.45-55.

ANVISA (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC N°12, de 02 de Janeiro de 2001, que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal*, em 10 de Janeiro de 2001.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists (2006). *Official methods of analysis of AOAC international*, Washington.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2004). *Standard methods for the examination of dairy products*. ed 16^a.

BERESFORD TP, FITZSIMONS NA, BRENNAN NL, COGAN TM (2001). Recent advances in cheese microbiology, *International Dairy Journal*, v.11, p.259–274.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Instrução Normativa N°62, de 29 de Setembro de 2011, que altera a IN 51 de 2002 e aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite Cru Refrigerado, do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite

Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União: Brasília, Distrito Federal, em 29 de Dezembro de 2011. Seção 1. 2011.

BRASIL. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 set. 1997. n. 172, p. 19690.

COSTA LCG, PINHEIRO AJR (1998). Influência da relação caseína/gordura nas características físico-químicas do queijo Prato. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 53, n. 305, p. 29-49.

FOX PF, McSWEENEY PLH (1997). Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In LAW BA (Ed.). Microbiology and Biochemistry of cheese and Fermented Milk. Blackie academic & professional. 2ªed, 365p.

FOX PF, McSWEENEY PLH (1998). Dairy chemistry biochemistry. London: Blackie Academic Professional, 476p.

FURTADO MM, LOURENÇO NETO JPM (1994). Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar.

GRIPON JC, DESMAZEAUD MJ, LE BARS D, BERGERE JL (1975). Étude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la pression commerciale. Lait, Paris, v.55, p.502-515.

HAGEN SR, FROST B, AUGUSTIN J (1989). Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of aminoacids in food. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. v.72, n.6, p. 912-916.

HORWITZ W (1975). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12.ed. Washington: AOAC p.284, (proc. 16223).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1991). Lactic Acid Bacteria. Guidance on methods of sampling and analysis. Belgium: FIL/IDF. 3p. (FIL-IDF, 149).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: IAL, v.1, 371p.

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

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

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

JOLLIVET N, BESSENGER MC, VAYSSIER Y, BELIN JM (1992). Production of volatile compounds in liquid cultures by six strains of coryneform bacteria. Applied Microbiology Biotechnology, v.36, p.790–794.

PERRY KSP (2004). Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos,

LANARA (Laboratório Nacional de Referência Animal) (1981). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília, 2.

LAWRENCE RC, CREAMER LK, GILLES J (1987). Texture development during cheese ripening. Journal of Dairy Science, Champaign, v.70, n.8, p.1748-1760.

MEILGAARD M, CIVILLE GV, CARR BT (2006). Sensory evaluation techniques. 4th ed., CRC Press: Boca Raton, Florida, 448p.

MEIRA SMM, DAROIT DJ, HELFER VE, CORRÊA JS, CARRO S, BRANDELLI A (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil. Food Research International, v.48, p.322-329.

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

NAKAMURA Y, YAMAMOTO N, SAKAI K, TAKANO T (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, v.78, n.6, p.1253-1257.

ONG L, SHAH NP (2008). Influence of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. helveticus* on Proteolysis, Organic Acid Profiles, and ACE-Inhibitory Activity of cheddar Cheeses Ripened at 4, 8, and 12°C. *Journal of Food Science*, v.73, n.3, p.111-120.

PACHECO MTB, ANTUNES AEC, SGARBIERI VC (2008). New Technologies and physiological functional properties of milk proteins. In: Alan B. Boscoe, Charles R. Listow. (Org.). *Protein Research Progress*. 1 ed. New York: NovaPublisher, p.117-168.

PACHECO MTB, AMAYA-FARFAN J, SGARBIERI VC (2002). Partial characterization of a whey protein concentrate and its enzyme hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, v.26, p.327-338.

SERRES L, AMARIGLIO S, PETRANSXIENE D (1973). Controle de la qualité des produits laitiers. Ministère de l'Agriculture. Direction des Services Vétérinaires, Tome I, Analyse Physique et Chimique (Chimie VII-6).

SILVA AT (1998). Maturação do queijo tipo Prato: Influência da Adição de enzimas proteolíticas no processo. Campinas. 119p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SOUZA MJ, MCSWEENEY PLH (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, v.11, p.327-345.

SPADOTI LM, MORENO I (2008). Peptídeos bioativos de produtos lácteos. Funcionais e Nutracêuticos. Ed. Insumo. No 1 (março), p.26-38.

TURCO C (2008). Mercado de queijo, uma visão do Brasil. Carta Leite, disponível em: <http://scotconsulturia.com.br/leite/mercado-leite/139/mercado-de-queijo-uma-visão-do-brasil.htm>, acessado em: 18 de set. 2013.

VAKARELIS DG, PRICE WC (1959). Rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.42, n.2, p.264-276.

WANG H, CUI L, CHEN W, ZHANG H (2011). An application in Gouda cheese manufacture for a strain of *Lactobacillus helveticus* NCD01. *International Journal of Dairy Technology*, v.64, n.3, p.386-393.

WHITE JA, HART RJ, FRY JC (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *The Journal of Automatic Chemistry*. v.8, n.4, p.170-177.

WOLFSCHOON-POMBO AL, LIMA A (1989). Extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal. *Revista Instituto de Laticínios Candido Tostes, Juiz de Fora*, v.44, p.50-54.

YAMAMOTO N, AKINO A, TAKANO T (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, v.77, n.4, p.917-922.

ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP (CAMPUS
CAMPINAS)



PROJETO DE PESQUISA

Título: DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO PRATO COM ADIÇÃO DE CULTURAS ADJUNTAS VISANDO MELHORIA DA QUALIDADE E OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 03602812.7.0000.5404

Pesquisador: Natália Chinellato de Azambuja Ferreira

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 112.204

Data da Relatoria: 25/09/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto faz parte da dissertação de mestrado da pesquisadora e está bem fundamentado e escrito com a apresentação de toda documentação necessária para solicitação da permissão das realizações das análises sensoriais junto ao comitê de ética.

Objetivo da Pesquisa:

O presente trabalho tem por objetivo a investigação da presença de aminopeptidases que auxiliam na aceleração da proteólise e aprimoramento das características sensoriais do queijo tipo Prato e na possibilidade da obtenção de peptídeos bioativos provenientes de micro-organismo adicionados como culturas adjuntas no processo de manufatura dos queijos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos previsíveis para quem for participar da pesquisa pois serão testadas as características sensoriais, a menos que o indivíduo possua algum tipo de alergia a produtos lácteos. A adição de culturas adjuntas pode agregar ao produto final características benéficas a saúde do consumidor, pois algumas cepas de *Lactobacillus helveticus*, têm um potencial de produção de peptídeos que inibem a enzima conversora de angiotensina (ECA) reduzindo a ocorrência dos sintomas da hipertensão e suas comorbidades.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa faz parte da dissertação de mestrado da pesquisadora e não apresenta riscos aos provadores (somente os que apresentam intolerância aos produtos lácteos). O queijo prato será produzido em uma Instituição (ITAL), onde se aplicam todas as regras de boas práticas de manipulação de alimentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou todos os termos de apresentação obrigatória.

Recomendações:

No cartaz do anexo I, a pesquisadora não deve restringir os indivíduos em apenas funcionários e estagiários. É recomendado retirar a frase "Venha fazer parte da nossa equipe", pois subentende-se que a pesquisadora está montando um equipe treinada para análise sensorial.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP (CAMPUS
CAMPINAS)



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

aprovado

CAMPINAS, 01 de Outubro de 2012

Assinado por:
Carlos Eduardo Steiner
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 2: Modelo da ficha utilizada para avaliação sensorial.

AVALIAÇÃO DE QUEIJO PRATO

Nome: _____ Produto: _____

Muito obrigado por participar de nosso teste. Sua colaboração é muito importante para nós!

Você receberá três amostras de QUEIJO PRATO, uma de cada vez, além água que deve ser usada entre as amostras para limpar a boca.

Avalie cada amostra e responda as questões a seguir.

1. Indique o quanto você gostou da **APARÊNCIA** do produto:

Gostei muitíssimo	Gostei muito	Gostei	Gostei pouco	Não gostei nem desgostei	Desgostei pouco	Desgostei	Desgostei muito	Desgostei muitíssimo
()	()	()	()	()	()	()	()	()

2. Indique sua opinião sobre a intensidade da **COR AMARELA** do produto:

Muito mais intenso do que eu gosto	Mais intensa do que eu gosto	Um pouco mais intenso do que eu gosto	Do jeito que eu gosto	Um pouco menos intensa do que eu gosto	Menos intensa do que eu gosto	Muito menos intenso do que eu gosto
()	()	()	()	()	()	()

3. Indique o quanto você gostou do **AROMA** do produto:

Gostei muito	Gostei muito	Gostei	Gostei pouco	Não gostei nem desgostei	Desgostei pouco	Desgostei	Desgostei muito	Desgostei muitíssimo
()	()	()	()	()	()	()	()	()

4. Indique sua opinião sobre a intensidade do **AROMA CARACTERÍSTICO DE QUEIJO PRATO** do produto:

Muito mais intenso do que eu gosto	Mais intenso do que eu gosto	Um pouco mais intenso do que eu gosto	Do jeito que eu gosto	Um pouco menos intenso do que eu gosto	Menos intenso do que eu gosto	Muito menos intenso do que eu gosto
()	()	()	()	()	()	()

5. Indique o quanto você gostou da **TEXTURA** do produto:

Gostei muitíssimo	Gostei muito	Gostei	Gostei pouco	Não gostei nem desgostei	Desgostei pouco	Desgostei	Desgostei muito	Desgostei muitíssimo
()	()	()	()	()	()	()	()	()

6. Indique sua opinião sobre a **MACIEZ** do produto:

Muito mais macio do que eu gosto	Mais macio do que eu gosto	Um pouco mais macio do que eu gosto	Do jeito que eu gosto	Um pouco menos macio do que eu gosto	Menos macio do que eu gosto	Muito menos macio do que eu gosto
()	()	()	()	()	()	()

7. Indique o quanto você gostou do **SABOR** do produto:

Gostei muitíssimo	Gostei muito	Gostei	Gostei pouco	Não gostei nem desgostei	Desgostei pouco	Desgostei	Desgostei muito	Desgostei muitíssimo
()	()	()	()	()	()	()	()	()

8. Indique sua opinião sobre a intensidade do **SABOR CARACTERÍSTICO DE QUEIJO PRATO** do produto:

Muito mais intenso do que eu gosto	Mais intenso do que eu gosto	Um pouco mais intenso do que eu gosto	Do jeito que eu gosto	Um pouco menos intenso do que eu gosto	Menos intenso do que eu gosto	Muito menos intenso do que eu gosto
()	()	()	()	()	()	()

9. Indique sua opinião sobre a intensidade do **GOSTO SALGADO** do produto:

Muito mais intenso do que eu gosto	Mais intenso do que eu gosto	Um pouco mais intenso do que eu gosto	Do jeito que eu gosto	Um pouco menos intenso do que eu gosto	Menos intenso do que eu gosto	Muito menos intenso do que eu gosto
()	()	()	()	()	()	()

10. Indique sua opinião sobre a intensidade do **GOSTO ÁCIDO** do produto:

Muito mais intenso do que eu gosto	Mais intenso do que eu gosto	Um pouco mais intenso do que eu gosto	Do jeito que eu gosto	Um pouco menos intenso do que eu gosto	Menos intenso do que eu gosto	Muito menos intenso do que eu gosto
()	()	()	()	()	()	()

11. Indique sua opinião sobre a intensidade do **GOSTO AMARGO** do produto:

Muito mais intenso do que eu gosto	Mais intenso do que eu gosto	Um pouco mais intenso do que eu gosto	Do jeito que eu gosto	Um pouco menos intenso do que eu gosto	Menos intenso do que eu gosto	Muito menos intenso do que eu gosto
()	()	()	()	()	()	()

12. Indique o quanto você gostou do produto de **MODO GLOBAL**:

Gostei muitíssimo	Gostei muito	Gostei	Gostei pouco	Não gostei nem desgostei	Desgostei pouco	Desgostei	Desgostei muito	Desgostei muitíssimo
()	()	()	()	()	()	()	()	()

13. Por favor, descreva o que em particular você gostou ou desgostou nesta amostra.

Mais gostei:

Menos gostei:

14. Pensando no produto que você consome normalmente, por favor indique qual seria sua atitude em relação à compra do produto que acabou de provar:

Certamente compraria	Provavelmente compraria	Talvez sim, talvez não compraria	Provavelmente não compraria	Certamente não compraria
()	()	()	()	()