

AVALIAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO DE CULTURAS LÁCTICAS ADJUNTAS E SEU EFEITO NA ACELERAÇÃO DA PROTEÓLISE DE QUEIJO PRATO

MELINA DE **TOLEDO**¹; ADRIANA T. **SILVA e ALVES**²; IZILDINHA **MORENO**³; FABIANA K. H. S. **TRENTO**³; ÍSIS P. S. **ALBUQUERQUE**⁴; LUÍS A. **CASTELLO Jr** ⁴

Nº 0701001

RESUMO

O queijo Prato é a variedade de queijo maturado mais consumida no Brasil. Na prática, entretanto, alguns fabricantes deste tipo de queijo têm diminuído o tempo de maturação sem o uso adicional de qualquer tipo de tecnologia. Diante desta problemática uma opção é a utilização de culturas lácticas com propriedades autolíticas que venham a aumentar ou acelerar a proteólise pela liberação precoce de enzimas citoplasmáticas na matriz do queijo. Além da tendência à autólise, essas culturas devem apresentar um sistema enzimático ativo nas condições de maturação. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil enzimático de 16 culturas adjuntas, previamente selecionadas quanto à sua capacidade autolítica. A atividade enzimática das culturas foi quantificada pela extensão de hidrólise de alguns substratos cromogênicos, que indicam a atividade das enzimas, Pep N, Pep X e Pep A, consideradas importantes na maturação de queijos. A atividade enzimática variou entre as diferentes espécies de bactérias lácticas e houve também variabilidade nos resultados dentro da mesma espécie, resultado este também observado na determinação da capacidade autolítica das culturas. Isto ressalta a importância da seleção de culturas lácticas adjuntas com base nessas características para serem empregadas na fabricação de queijo tipo Prato.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ENZYME PROFILE OF ADJUNCT LACTIC CULTURES AND THEIR EFFECT ON THE ACCELERATION OF PROTEOLYSIS OF PRATO CHEESE. Prato cheese is Brazil's most popular and most widely consumed ripened cheese variety. In practice, however, some manufacturers have reduced ripening time without the additional use of any kind of cheese ripening technology. One of the options to curb this problem is the use of starter cultures with autolytic properties capable of increasing or accelerating proteolysis by the precocious release of cytoplasmic enzymes into the cheese matrix. In addition to their tendency toward autolysis, such cultures should have the property to form an active enzyme system in the conditions of ripening. Therefore, the objective of this study was

1. Bolsista PIBIC-CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, UNIMEP, Santa Bárbara D'Oeste-SP

2 Orientadora: Pesquisador Científico, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP- **email: atorres@ital.sp.gov.br**

3. Colaborador: Pesquisador Científico, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

4. Bolsista FAPESP: Treinamento Técnico, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP.

to evaluate the enzyme profile of 16 adjunct cultures that were previously selected based on their autolytic capacity. The enzyme activity of the cultures was determined based on the extension of hydrolysis of some chromogenic substrates indicative of the activity level of the enzymes Pep N, Pep X and Pep A, which are considered to play an important role in cheese ripening. The level of enzyme activity not only varied among the different lactic acid bacteria species, but also within the same species. The latter finding was also observed in the determination of the autolytic capacity of the cultures. This reinforces the importance of selecting adjunct lactic cultures intended for use in the manufacture of Prato cheese based on these characteristics.

1. INTRODUÇÃO

O queijo tipo Prato é a variedade de queijo maturado mais consumida e apreciada no Brasil, o que levou ao aumento de 150% de sua produção nos últimos doze anos, passando de 45.000 ton. produzidas em 1993 para 101.491 ton em 2005 (ABIQ, 2006).

Nos últimos tempos este produto vem perdendo suas características e consequentemente seu valor comercial devido ao reduzido tempo de maturação ao qual está sendo submetido por alguns fabricantes sem uso adicional de qualquer tecnologia. Hoje a maioria do que está sendo comercializado se encontra com a maturação incompleta, com uma baixa qualidade em detrimento ao consumidor nacional e impossibilitando a exportação (SILVA et al., 2006).

Atualmente a maneira mais promissora de se acelerar a maturação tem sido a utilização de culturas lácticas com propriedades autolíticas que venham a aumentar ou acelerar a proteólise pela liberação precoce de enzimas citoplasmáticas na matriz do queijo. É necessário considerar, entretanto que além da tendência à forte autólise, as culturas devem apresentar um sistema enzimático ativo nas condições de maturação para o desenvolvimento do “flavour” (MORENO, 2003). Entre as enzimas que degradam a caseína do leite, as peptidases são as melhor caracterizadas; elas liberam peptídeos de cadeia curta e aminoácidos livres, precursores de aromas. A ação das peptidases contribui, ainda, para a diminuição do sabor amargo em queijos. Sendo assim, os tipos e especificidades das peptidases liberadas a partir das células lisadas, são determinantes, constituindo-se, portanto, em um fator importante a ser considerado na seleção de culturas que serão empregadas como adjuntas na fabricação do queijo tipo Prato. Considerando esta problemática, tem-se que, o aperfeiçoamento do conhecimento sobre o metabolismo, capacidade autolítica e atividade enzimática de bactérias lácticas contribuirá para o avanço científico na área de produção de queijos.

Assim este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil enzimático de 16 culturas lácticas adjuntas previamente selecionadas quanto à sua capacidade autolítica em condições de maturação do queijo tipo Prato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Culturas avaliadas

Foram utilizadas 12 culturas previamente isoladas de queijo Prato de quatro laticínios (MORENO, 2003) e outras 4 culturas de referência sendo 7 *Lactobacillus*, 3 *Lactococcus*, 3 *Pediococcus*, 1 *Leuconostoc*, 1 *Enterococcus* e 1 *Streptococcus* para serem avaliadas quanto ao perfil enzimático. Essas culturas foram selecionadas na primeira etapa do projeto, quanto à sua capacidade autolítica nas condições de maturação do queijo tipo Prato.

2.2. Obtenção do extrato celular

Após alguns testes a melhor forma de obtenção do extrato celular foi uma junção de duas técnicas onde primeiramente empregou-se alumina na maceração das células (DAKO, 1995) e em seguida foi feita uma seqüência de choque térmico e agitação com pérolas de vidro por um tempo determinado (BOUTROU et. al 1998). O extrato celular assim obtido foi empregado na análise de concentração de proteína e na determinação do perfil enzimático das culturas.

2.3. Determinação quantitativa da atividade enzimática

As aminopeptidases foram quantificadas pela extensão de hidrólise dos substratos cromogênicos, segundo RONCARI; ZUBER (1969). A mistura de reação foi composta de 0,1 mL do extrato celular (obtido no item 2.2), 0,1 mL do substrato 16,4mM em metanol e 2,8 mL de tampão fosfato de potássio 0,01M pH6,5. Após incubação a 37°C durante 4 horas, foi adicionado 0,5 mL de ácido acético glacial 30% (v/v) para bloquear a reação e a absorbância foi mensurada a 410 nm. A unidade da atividade enzimática foi arbitrariamente definida como a variação de 0,01 unidade de absorbância em 1 minuto (0,01 U.min⁻¹), nas condições realizadas. A unidade de atividade específica foi definida pela relação entre o número de unidade da atividade enzimática por miligrama de proteína no extrato enzimático (0,01 U.min⁻¹. mg de proteína). Para este teste foram utilizados os substratos cromogênicos leucina – p – nitroanilida (Leu-p-NA), arginina –p- nitroanilida (Arg-p-NA) e lisina-p-nitroanilida (Lys-p-NA) para Pep N, glutamina-p-nitroanilida (Glu-p-NA) para Pep A e prolina-p-nitroanilida (Pro-p-NA), alanina-p-nitroanilida (Ala-p-NA), glicina-p-nitroanilida (Gly-p-NA) para PeX.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os resultados apresentados na **Tabela 1** e na **Figura 1** observa-se que, excetuando-se a atividade sobre o substrato glutamina nas culturas ATCC 15009 e MR 502 e glicina na MR 502, foi detectada atividade específica sobre os demais substratos, porém, com intensidades diferentes dependendo da cultura.

A maior extensão de hidrólise dos substratos cromogênicos Leu- ρ -Na, Arg- ρ -Na e Lis- ρ -Na, que são os indicadores da atividade da Pep N (aminopeptidase geral), ocorreu em ordem decrescente com as culturas ATCC 19256, TR 285, TR 259, TR 260, CE 305, TR 570 e CE 80. Já para os substratos Pro- ρ -Na, Ala- ρ -Na e Gly- ρ -Na que indicam a atividade da Pep X (peptidase prolina-específica) a maior extensão de hidrólise ocorreu em ordem decrescente com as culturas, TR 285, PN 270, ATCC 10746, TR 260, ATCC 7962 e ATCC 19256.

Para o substrato Glu- ρ -Na indicativo da Pep A a cultura que apresentou a maior extensão de reação foi a PN 270.

TABELA 1: Resultados da atividade enzimática específica nas culturas.

Culturas	Substrato- ρ -na ²						
	Leu	Arg	Lis	Glu	Pro	Ala	Gli
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulg.</i> CE 17	12,01 ¹	19,62	21,54	0,16	0,83	6,67	0,457
<i>Lactobacillus paracasei</i> PN 16	4,62	6,35	10,38	1,62	0,73	2,41	0,41
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009	7,10	10,17	14,03	ND ³	0,09	3,70	0,03
<i>Lactobacillus plantarum</i> TR 259	16,53	36,71	42,99	5,44	3,09	14,81	2,06
<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC 10746	12,43	13,25	14,07	22,37	8,40	10,96	3,91
<i>Lactobacillus plantarum</i> TR 260	21,40	23,64	33,61	24,57	8,21	25,04	6,81
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PN 270	16,17	21,61	26,84	43,41	8,91	24,78	5,89
<i>Lactobacillus paracasei</i> MR 502	3,56	5,69	9,10	ND	0,03	2,19	ND
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CE 305	19,23	25,14	32,18	13,89	7,23	17,01	4,54
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 7962	16,81	19,20	8,59	44,66	7,46	69,97	7,36
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MR 10	3,51	2,25	3,60	0,23	0,89	1,97	0,62
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CE 80	28,83	20,92	28,85	0,80	2,07	8,05	1,45
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TR 285	22,53	28,02	38,66	35,03	9,57	23,55	3,91
<i>Enterococcus durans</i> CE 16	14,47	19,29	23,43	0,75	1,85	6,98	1,20
<i>Streptococcus uberis</i> TR 570	20,81	19,83	28,43	0,96	1,61	7,34	1,61
<i>Leuconostoc lactis</i> ATCC 19256	32,34	53,00	69,52	10,36	5,10	24,34	4,44

¹ A unidade de atividade específica foi definida pela relação entre o número de unidades da atividade enzimática por miligrama de proteína no extrato enzimático (0,01 U.min⁻¹.mg de proteína).

² - ρ -na = ρ -nitroanilida; ³ ND= Não detectado.

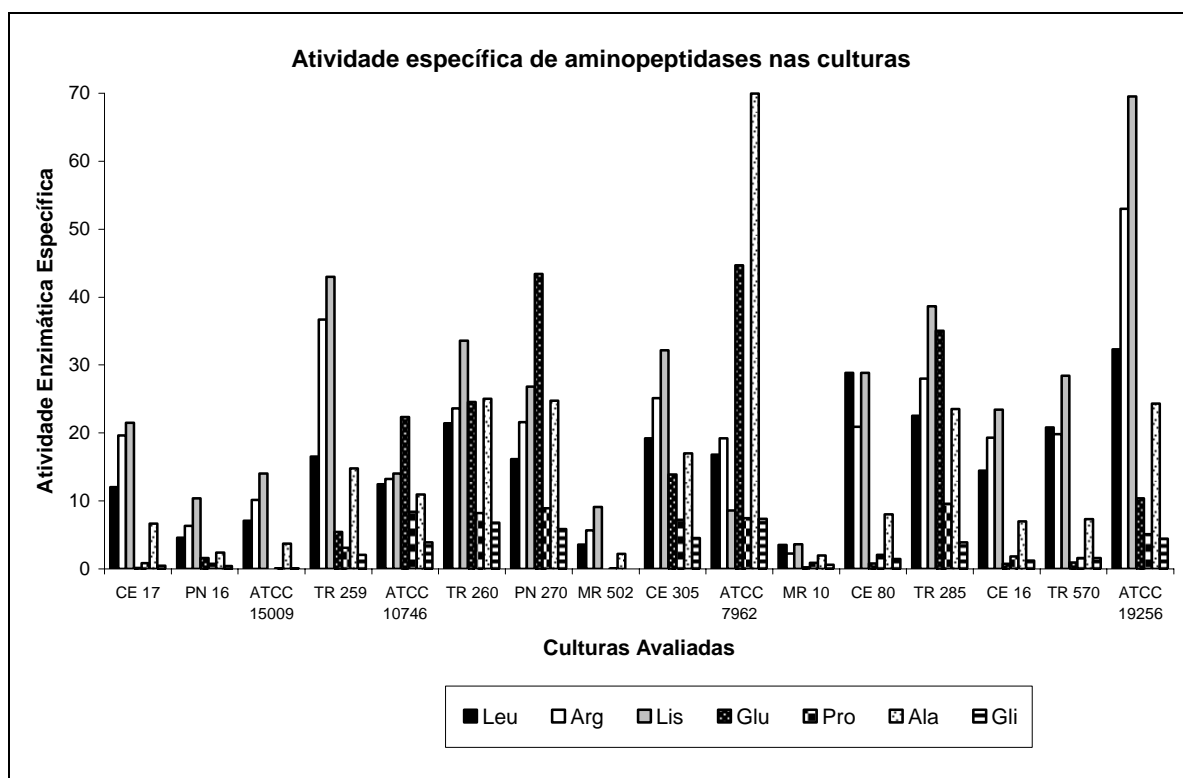


Figura 1: Representação gráfica da atividade enzimática específica nas culturas.

4. CONCLUSÃO

A atividade enzimática variou entre as diferentes espécies de bactérias lácticas e houve também variabilidade nos resultados dentro da mesma espécie, o que também foi observado na determinação da capacidade autolítica. Isto ressalta a importância da selecionar com base nessas características, culturas adjuntas que serão empregadas na fabricação de queijo tipo Prato.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Produção Brasil - Produtos lácteos em estabelecimento sob inspeção federal em toneladas**. São Paulo: ABIQ, 2006.

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

DAKO, E.; EL SODA, M. VUILLEMARD, J. C.; SIMARD, R.E. Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. **Food Research International**, Amsterdam, v. 28, n. 5, p. 503-509, 1995.

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

RONCARI, G.; ZUBER, H. Thermophilic aminopeptidases from *Bacillus stearothermophilus*.I. Isolation, specificity and general properties of thermo stable aminopeptidases. **International Journal of Protein Research**, Copenhagen, v.1, n.1, p 45-61, 1969.

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