

Seleção e avaliação de “non starter lactic acid bacteria – NSLAB” em queijo Prato obtido de leite microfiltrado

DENISE M.S. **FRANCO**¹; IZILDINHA **MORENO**²; LEILA M. **SPADOTI**³; ADRIANA, T.
SILVA E ALVES³; ARIENE G.F. **VAN DENDER**³; PATRICIA P.B. **ZARCACHENCO**³;
FABIANA F.K.H.S. **TRENTO**³; DARLILA **GALLINA**³.

Nº 11260

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar as características tecnológicas e probióticas de *non starter lactic acid bacteria* (NSLAB), visando sua posterior aplicação como cultura adjunta na fabricação do queijo Prato. *Lactobacillus plantarum* PN016, *Lactobacillus plantarum* TR260, *Lactobacillus rhamnosus* PN270, *Pediococcus pentosaceus* TR285 e *Pediococcus pentosaceus* TR 570 foram originadas de amostras comerciais de queijo Prato. Os resultados demonstraram que *Lactobacillus plantarum* PN016, *Pediococcus pentosaceus* TR285 e *Pediococcus pentosaceus* TR570 apresentam propriedades interessantes para melhorar as características de *flavour* do queijo Prato.

Palavras-chave: queijo Prato, *non starter lactic acid bacteria*, maturação, *flavour*

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the technological characteristics and probiotics of *non starter lactic acid bacteria* (NSLAB), aiming at their subsequent application as culture adjunct in the manufacture of Prato cheese. *Lactobacillus plantarum* PN016, *Lactobacillus plantarum* TR260, *Lactobacillus rhamnosus* PN270, *Pediococcus pentosaceus* TR285 e *Pediococcus pentosaceus* TR 570 were originated from commercial samples of Prato cheese. The results have shown that *Lactobacillus plantarum* PN016, *Pediococcus pentosaceus* TR 285 and *Pediococcus pentosaceus* TR 570 show interesting properties to improve the characteristics of flavor of the Prato cheese.

Key-words: Prato cheese, *non starter lactic acid bacteria*, ripening, *flavour*

1. BOLSISTA CNPq; Estagiário, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, * dmsf@fea.unicamp.br
2. ORIENTADOR: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP imoreno@ital.sp.gov.br
3. COLABORADOR: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

INTRODUÇÃO

A proteólise é o fenômeno mais importante da maturação em razão de sua influência nas características de *flavour* e de textura do queijo Prato. Os agentes proteolíticos envolvidos nesse processo são originários do leite (principalmente a plasmina), do coalho, ou outro agente coagulante e das bactérias lácticas adicionadas (*starter acid lactic bacteria*-SLAB), bem como das bactérias lácticas não adicionadas, denominadas de *non-starter acid lactic bacteria*-NSLAB. Portanto, a proteólise sucede-se em três etapas distintas da fabricação do queijo Prato: inicia-se no leite, é induzida na coagulação enzimática e continua durante a etapa de maturação.

A extensão e a natureza da proteólise durante a maturação, como também a quantidade de produtos de degradação, variam de acordo com a especificidade e atividade das enzimas disponíveis envolvidas, o tipo de queijo e as condições ambientais da maturação. Portanto, essas transformações são atribuídas, principalmente à microbiota do queijo e reguladas pela composição do queijo (sal, cálcio, fosfato, lactose), condições físico-químicas (pH, níveis de atividade de água) e ambientais da maturação (tempo, temperatura, umidade) (McSweeney, 1995).

Na fabricação do queijo Prato, a SLAB originalmente utilizada é constituída por misturas indefinidas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, envolvidas principalmente na produção de ácido láctico da fermentação de lactose. Essas linhagens são combinadas com *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, as quais metabolizam o citrato com a formação de diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol, componentes do *flavour*, e de CO₂ que origina os olhos do queijo Prato (COGAN, 1995). As linhagens acidificantes e aromatizantes também contribuem para a maturação do queijo Prato por meio do fornecimento de enzimas envolvidas na proteólise, bem como na conversão de aminoácidos em compostos de *flavour* (Beresford; Williams, 2004).

Diferente das SLABs que são especialmente selecionadas e comercializadas por empresas internacionais, as NSLABs são provenientes dos ambientes e equipamentos dos laticínios, e podem desempenhar um papel importante na maturação dos queijos. Vários trabalhos foram realizados com o intuito de isolar NSLABs de diferentes tipos de queijos e avaliar o seu potencial de utilização como culturas adjuntas. Os seguintes resultados foram destacados: aceleração da proteólise, intensificação do *flavour* e/ou

redução do flavour amargo dos queijos maturados (Cagno et al., 2011; Awad; Ahmed; Soda, 2010; Sudhir, Jha e Pratibha, 2010; Hashemi; Main; Mazlumi, 2009; Sheehan, Wilkinson e McSweeney, 2008). Evidências também demonstram o potencial de determinadas NSLABs de fornecer benefícios à saúde (Settanni e Moschetti, 2010; Tellez et al., 2010).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar cinco NSLABs quanto às características tecnológicas e probióticas, visando posterior avaliação dessas linhagens como culturas adjuntas na fabricação do queijo Prato obtido de leite microfiltrado.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das NSLABs: *Lactobacillus plantarum* PN016, *Lactobacillus plantarum* TR260, *Lactobacillus rhamnosus* PN 270, *Pediococcus pentosaceus* TR 285 e *Pediococcus pentosaceus* TR 570 foram isoladas de queijo Prato (MORENO, 2003).

Manutenção das NSLABs: Durante os experimentos, as linhagens foram estocadas a -80°C em caldo MRS (DIFCOTM Detroit, EUA) suplementado com 20% de glicerol (Synth., Brasil) (v/v). Antes dos experimentos, as linhagens foram ativadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16-18 horas em caldo MRS (DIFCO) ou leite desnatado reconstituído a 10% (p/v) (Molico, Nestlé) e esterilizado a 115°C por 12 minutos (leite DE10%).

Características de crescimento: *Litmus Milk* (DIFCO) foi inoculado com 2% das NSLABs ativas. Após incubação a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 14 dias, as características de fermentação do meio foram avaliadas (HARRIGAN; McCANCE, 1998).

Características sensoriais de fermentação: Leite DE10% foi inoculado com 2% das NSLABs ativas. Após incubação a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16-18 horas, os meios foram refrigerados a 10°C e avaliados quanto às suas características de formação de coágulo e de *flavour*.

Sensibilidade ao cloreto de sódio: Leite DE10% suplementado com 0,5%, 1,5% e 3,0% de NaCl foram inoculados com 2% das NSLABs ativas. Após incubação a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 14 dias, o pH foi determinado, em potenciômetro, logo após a inoculação e a intervalos regulares de 24 horas até completar 96 horas de fermentação. O controle consistiu do leite DE10% incubado nas mesmas condições.

Produção de diacetil: Foi determinada após fermentação do leite DE10% a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 18 horas. A concentração de diacetil foi obtida por meio de uma curva padrão de diacetil (grau reagente, ponto de ebulição $88-91^\circ\text{C}$) nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 150 mg/Kg de leite DE10%. O controle consistiu do leite DE10% incubado nas mesmas condições (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 149: 1991).

Atividade proteolítica: A concentração de aminoácidos livres totais foi determinada na fração do nitrogênio solúvel em água obtida após reação do leite DE10% fermentado a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 18 horas com TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico, Sigma-Aldrich). A concentração de aminoácidos foi obtida por meio de uma curva padrão de tirosina (100mg de tirosina recristalizada e seca diluída em 250mL de água). A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 650nm (ADLER-NISSEN 1979; CLEGG et al. 1982)

Potencial probiótico. A tolerância a baixos valores de pH foi determinada de acordo com a metodologia descrita por ERKKILÄ; PETÄJÄ (2000). A tolerância a sais biliares (OXOID) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por (PENNACCHIA et al., 2004).

Produção de bacteriocinas: Foi determinada de acordo com a metodologia descrita por MORENO (2003). *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e *Listeria innocua* ATCC 7644 foram utilizadas como linhagens indicadoras da produção de bacteriocinas. A formação de zonas claras de inibição ao redor dos poços inoculados com as linhagens indicadoras indica a presença de bacteriocinas nos sobrenadantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Potencial tecnológico das NSLABs

Características de crescimento: As cinco NSLABs apresentaram reações metabólicas similares em *Litmus Milk*. *L. plantarum* PN016, *L. plantarum* TR260, *L. rhamnosus* PN270 e *P. pentosaceus* TR285 produziram rapidamente ácido láctico, evidenciado pela alteração da cor do meio (tornassol para róseo) e formação de coágulo, após 24 horas de fermentação. Acidificação mais lenta foi observada para *Pediococcus pentosaceus* TR 570, desde que as alterações do meio foram visualizadas somente após 48 horas de fermentação. A ausência da produção de gás no meio indicou o metabolismo homofermentativo da lactose das cinco NSLABs. Com

relação à atividade proteolítica, as cinco NSLABs promoveram o clareamento e perda da opacidade do meio, resultante da hidrólise das caseínas. Acidificação lenta é desejável para culturas adjuntas, visto que essa característica não promoverá demasiada acidificação durante a fabricação do queijo. O meio controle permaneceu inalterado nas mesmas condições.

Características sensoriais de fermentação: Das cinco NSLABs, *L. plantarum* PN016, *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 desenvolveram características de *flavour* ácido e agradável, bem como coágulos firmes e uniformes. Ademais, as NSLABs PN016 e TR260 apresentaram um *flavour* levemente adocicado. Portanto, essas linhagens foram selecionadas como culturas adjuntas. As demais NSLABs não foram selecionadas, desde que apresentaram fermentações inadequadas, tais como *flavour* desagradável (*L. rhamnosus* PN270) e coágulo quebradiço (*L. plantarum* TR260). O leite DE10% tratado nas mesmas condições, e utilizado como controle da fermentação, permaneceu inalterado (pH 6,52) e com característica de *flavour* de leite reconstituído.

Efeito do cloreto de sódio (NaCl) na acidificação: A Figura 01 apresenta as características de acidificação das NSLABs *L. plantarum* PN016, *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 em leite DE10% sem (0,00%) e com a suplementação de NaCl (0,5%, 1,5%; 3,0%) a 12±1°C por 96 horas. No leite sem suplementação de NaCl, as três NSLABs apresentaram baixas características de acidificação. Dentre as NSLABs, *P. pentosaceus* TR570 apresentou a menor capacidade de acidificação. Entre o início e o final da fermentação, a variação do pH (Δ pH) foi de apenas 0,17 unidades. *L. plantarum* PN016 e *P. pentosaceus* TR285 demonstraram características similares, ambas apresentaram Δ pH de 0,55 unidades, no mesmo período. De modo geral, o NaCl apresentou pouco efeito nas características de acidificação das três NSLABs nas condições de maturação do queijo Prato.

A acidificação ou o desenvolvimento de acidez é um dos principais eventos no processamento do queijo. Envolve a fermentação da lactose a L-lactato pelos lactococos. Essa característica é importante durante a etapa de fabricação e também nos estágios iniciais de maturação do queijo Prato. É considerada uma fase primordial para a obtenção de queijo de boa qualidade (COGAN, 1995).

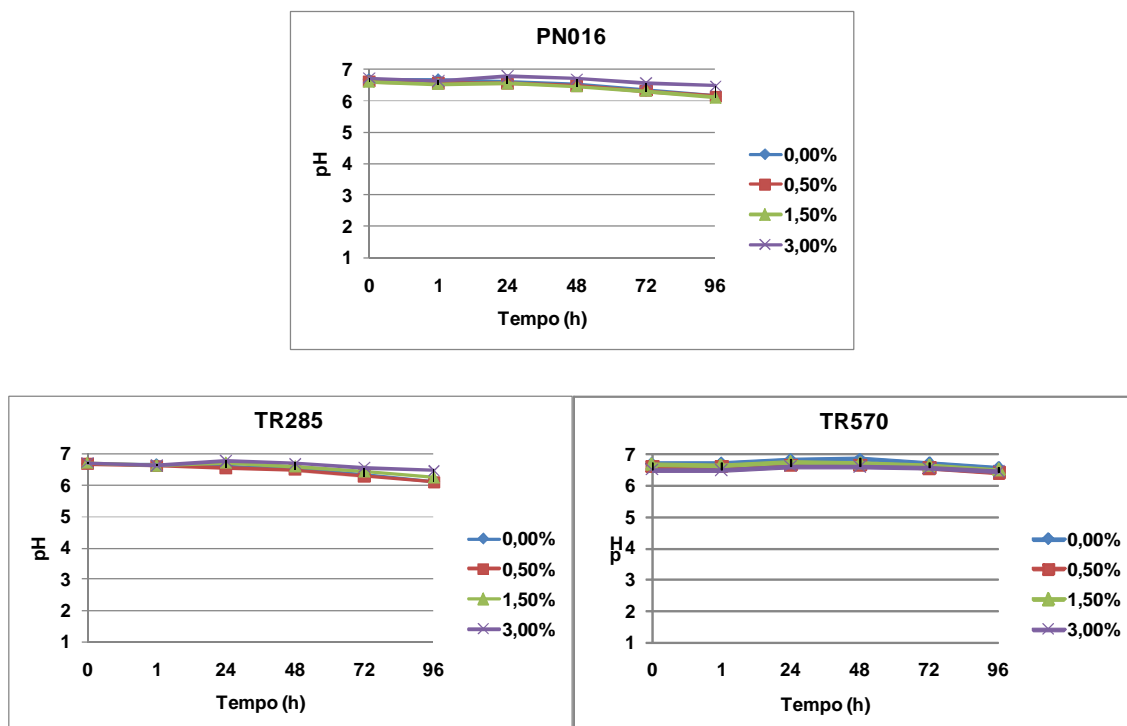


Figura 01. Alterações do pH durante a fermentação das NSLABs *L. plantarum* PN016, *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 a 12±1°C por 96 horas em leite DE10% sem (0,00%) e com a suplementação de NaCl (0,5%, 1,5%; 3,0%).

Produção de diacetil: Dentre os principais compostos de *flavour* formados a partir do metabolismo do citrato, quantitativamente, a acetoína é a mais importante; porém, o diacetil proporciona aroma de manteiga ao queijo Prato. Esta característica é interessante para uma cultura adjunta. Por sua vez, o CO₂ é responsável pela formação de olhaduras, sendo o número, localização e tamanho destas dependentes da consistência do queijo e atividade metabólica da cultura (COGAN, 1995).

A Figura 02 apresenta as concentrações de diacetil produzidas em leite DE10% pelas NSLABs *L. plantarum* PN016, *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 após fermentação a 37±1°C por 24 horas. Das três NSLABs, *L. plantarum* PN016 produziu a maior concentração de diacetil, enquanto *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 produziram concentrações similares desse componente de *flavour*.

Atividade proteolítica: A proteólise tem um papel importante no desenvolvimento do *flavour* do queijo Prato seja diretamente, pela formação de aminoácidos e peptídeos ou indiretamente, via catabolismo de aminoácidos (Fox, 1989). Devido à complexidade das reações ocorridas no queijo a relação de um determinado sabor com algum peptídeo, em particular, é muito difícil de ser estabelecida. Normalmente, nos queijos

maturados, os peptídeos pequenos são mais importantes que os médios e os grandes (Crow et al., 1993). Contudo, em alguns casos, os peptídeos pequenos formam junto com os grandes a base dos defeitos de sabor, dentre eles, o amargor (Fox et al., 1996; Engels, 1997).

A Figura 03 apresenta as concentrações de tirosina, utilizada como indicador da atividade proteolítica, produzidas em leite DE10% após a fermentação das NSLABs *L. plantarum* PN016, *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. TR 570 apresentou maior atividade proteolítica que as demais NSLABs avaliadas.

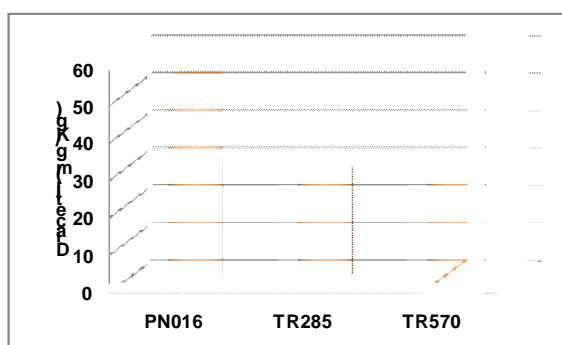


Figura 02. Produção de diacetil (mg/Kg) diacetil produzidas em leite DE10% pelas NSLABs *L. plantarum* PN016, *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 após fermentação a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

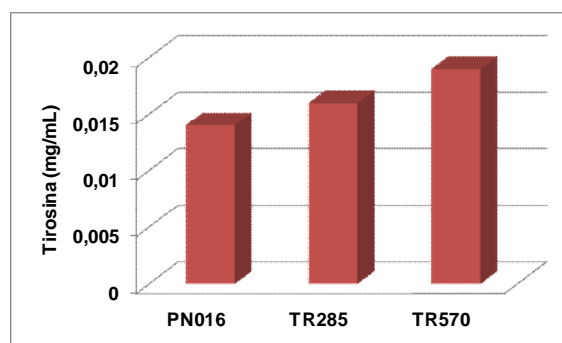


Figura 3. Produção de tirosina (mg/mL) após a fermentação das NSLABs *L. plantarum* PN016, *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 em leite DE10% a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Potencial probiótico das NSLABs

Sobrevivência a baixos valores de pH: O efeito dos probióticos está diretamente relacionado com a sua atividade no trato digestivo, e esta depende de sua sobrevivência nesse ambiente. Consequentemente, essas bactérias devem ser resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro, incluindo os processos fisiológicos e físico-químicos do trato gastrointestinal. Assim, além de presentes no produto, em concentração significativa, para ação benéfica efetiva no intestino os probióticos devem ser capazes de sobreviver à alta acidez do estômago e à presença de bile, para colonizá-lo e proliferar (Tuomola *et al.* 2001).

A Figura 04 apresenta as alterações na viabilidade das NSLABs *L. plantarum* PN016, *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 em meio MRS a pH 2,0, 3,0 e 5,0 durante 2 horas a 37°C. As três NSLABs apresentaram redução de aproximadamente 8;0 Log UFCmL⁻¹ após 1 hora em meio MRS pH 2,0. Por outro lado, as NSLABs apresentaram alta porcentagem de sobrevivência a pH 3,0 e pH 5,0, e mantiveram-se em concentrações de 8;0 e 9,0 Log UFCmL⁻¹ durante 2 horas a 37°C.

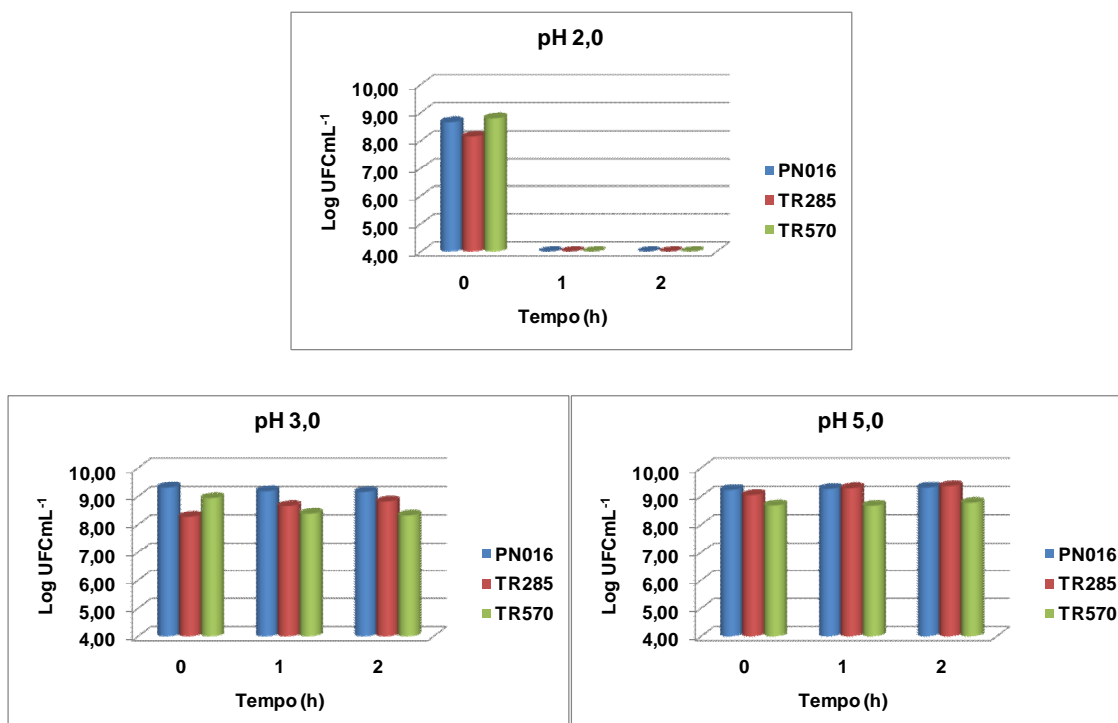


Figura 04. Alterações na viabilidade das NSLABs *L. plantarum* PN016, *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 em meio MRS a pH 2,0, pH 3,0 e pH 5,0 durante 2 horas a 37°C.

Tolerância a 0,3% de sais biliares: Durante a passagem pelo trato gastrointestinal superior, o probiótico deve apresentar a característica de tolerância a altas concentrações de sais biliares (FAO/WHO, 2002). A Figura 05 apresenta as alterações na viabilidade das NSLABs em meio MRS sem e com suplementação de 0,3% de sais biliares durante 24 horas a 37°C.

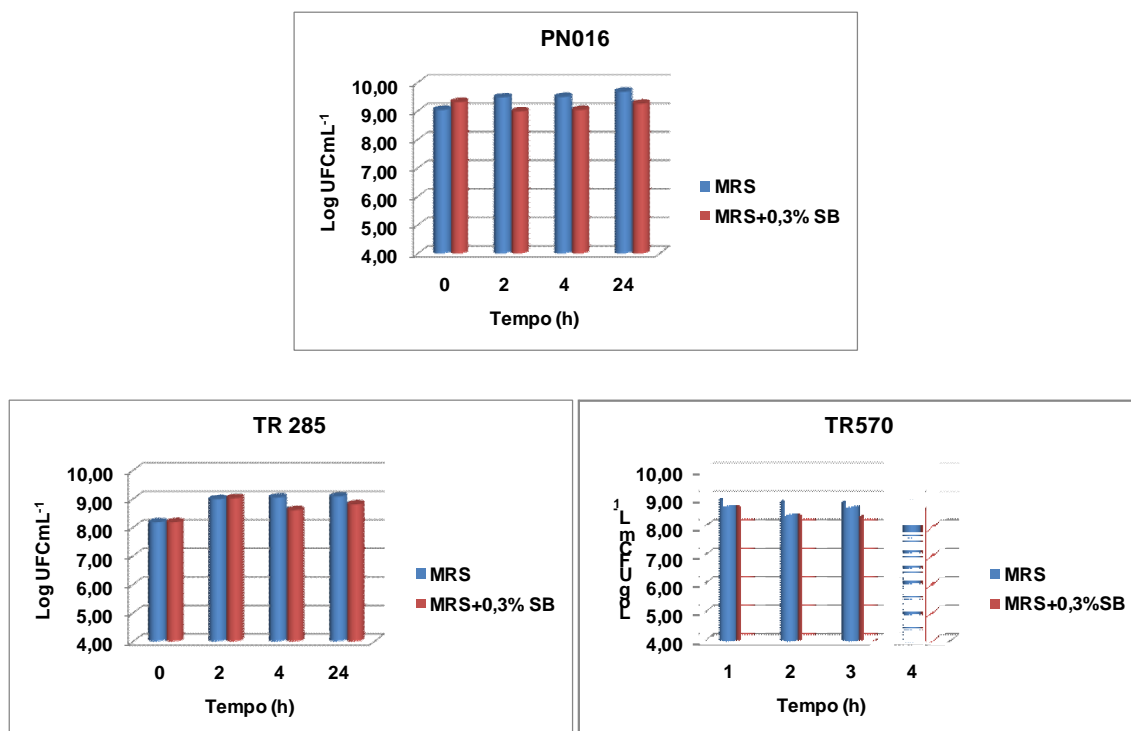


Figura 05. Alterações na viabilidade das NSLABs *L. plantarum* PN016, *P. pentosaceus* TR285 e *P. pentosaceus* TR570 meio MRS sem e com suplementação de 0,3% de sais biliares durante 24 horas a 37°C.

Produção bacteriocinas: As três NSLABs avaliadas não apresentaram a característica de produção de bacteriocinas.

CONCLUSÃO

Conclui-se que *Lactobacillus plantarum* PN016, *Pediococcus pentosaceus* TR285 e *Pediococcus pentosaceus* TR570 apresentam características tecnológicas (baixa acidificação, produção de diacetil, atividade proteolítica e resistência ao cloreto de sódio) e probióticas (sobrevivência a baixos valores de pH e tolerância a sais biliares) interessantes para aplicação como culturas adjuntas na fabricação do queijo Prato.

Agradecimentos:

Ao CNPq pela bolsa e apoio financeiro concedidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agricult. Food Chem.* v. 27, n. 6, p. 1256-1262, 1979.

AWAD; S.; AHMED, N.; SODA, M.E. Influence of microfiltration and adjunct culture on quality Domiati cheese. *J. Dairy Sc.* v. 93, p. 1807-1814, 2010.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Third Edition. V.1. General Aspects. (Eds) FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H.; COGAN, T.M., GUINEE, P. Amsterdam: Elsevier 2004. p. 298-307.

DI CAGNO, R.; DE PASQUALE, I. ; DE ANGELIS, M.; BUCHIN, S.; CALASSO, M.; FOX, P.F.; GOBBETTI, M. Manufacture of Italian Caciotta-type cheeses with adjuncts and attenuated adjuncts of selected non-starter lactobacilli. *Int. Dairy J.* v. 21, p. 254-260, 2011.

CLEGG, K. M.; LEE, Y. K.; MCGILLIGAN, J. F. Technical note: Trinitrobenzene sulphonic acid and ninhydrin reagents for the assessment of protein degradation in cheese samples. *J. Food Technol. Oxford*, v. 17, n. 4, p. 517-520, 1982.

COGAN, T.M. Flavour production by dairy starters cultures. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v. 79, (Suppl.), p. 49S-64S, 1995.

CROW, V.L., COOLBEAR, T., PRITCHARD, G.G., MARTLEY, F.G. Starters finishers properties relevant to cheese ripening. *Int. Dairy J., Barking*, v. 3, p. 423-460, 1993.

ENGELS, W.J.M. Volatile and non-volatile compounds in ripened cheese: their formation and their contribution to flavor. Wageningen, 1997. 129p. (Thesis Doctor - Agricultural University, Wageningen, the Netherlands).

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, v. 55, p. 297-300, 2000.

FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, April 30 and May 1, 2002.

FOX, P.F., O'COONOR, T.P, MCSWEENEY, P.L.H. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. Adv. Food Nutr. Res., San Diego, v. 39, p. 165-328, 1996.

HARRIGAN, W.F., MCCANCE, E. Laboratory methods in food and dairy microbiology. London: Academic Press, 1998.

HASHEMI, M.; MAIN, A.; MAZLUMI, M.T. Effect of commercial adjunct lactobacilli on biochemical and sensory characteristics of Iranian White-brined cheese. International Journal of Dairy Technology. V. 62, p. 48-55, 2009.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Lactic Acid Bacteria. Standard of identity. Belgium: FIL/IDF, 1991. 3p. (FIL-IDF, 149).

MC SWEENEY, P.L.H., LYNCH, C.M., WALSH, E.M., FOX, P.F., JORDAN, K.N., COGAN, T.M., DRINAN, F.D. Role of non starter lactic acid bacteria in cheddar cheese ripening. P. In: COGAN, T.M., FOX, P.F., ROSS, P.R. Cheese Symposium, 4., 1995. p.32-45.

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.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus strains* from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science, v. 67, p. 309-317, 2004.

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

SHEEHAN, J.J.; WILKINSON, M.G.; MCSWEENEY, P.L.H. Influence of processing and ripening parameters on starter, no-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. Intern. Dairy J.v. 18, p. 905-917, 2008.

SUDHIR, K.; J.H.A, Y.J.; PRATIBHA, S. 2010; Influence of adjuncts as a debittering AIDS in encountering the bitterness developed in cheese slurry during accelerated ripening. Food Sc. Technol. v. 45, p. 1403-1409, 2010.



TELLEZ ,A.; CORREDIG, M. BROVKO, Y.; GRIFFITHS, M.W. Characterization of immune-active peptidesmobtained from Milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Res.* v. 77, p. 129-136, 2010.

TUOMOLA, E., CRITTENDEN, R., PLAYNE, M., ISOLAURI, E., SALMINEN, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.73, p. 393S-398S, 2001.