

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
LICENCIATURA EM QUÍMICA

RENATA MARQUES BONFIM

ESTUDO DA PROTEÓLISE DE QUEIJO MATURADO POR
Enterococcus faecium

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO 2

LONDRINA
2019

RENATA MARQUES BONFIM

**ESTUDO DA PROTEÓLISE DE QUEIJO MATURADO POR
*Enterococcus faecium***

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso 2 de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 de Licenciatura em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Química.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a) Marly Sayuri Katsuda

Co-orientador(a): Prof(a). Dr(a). Vanessa Kienen

LONDRINA
2019



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina
Departamento Acadêmico de Química
Coordenação de Licenciatura em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

RENATA MARQUES BONFIM

ESTUDO DA PROTEÓLISE DE QUEIJO MATURADO POR *Enterococcus faecium*

Trabalho de conclusão de curso apresentado no dia 11 de Dezembro de 2019 como requisito para obtenção do título de Licenciada em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^ª. Dr^ª. Julliana Izabelle Simionato
(UTFPR – Departamento Acadêmico de Química)

Prof. Dr. Claudio Takeo Ueno
(UTFPR – Departamento Acadêmico de Alimentos)

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marly Sayuri Katsuda
(UTFPR – Departamento Acadêmico de Alimentos)

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Kienen
(UTFPR – Departamento Acadêmico de Química)

RESUMO

BONFIM, Renata M. **Estudo da proteólise de queijo maturado por *Enterococcus faecium***. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2019.

Produtos lácteos fermentados em geral apresentam em sua composição propriedades multifuncionais que trazem benefícios à saúde humana. Desta forma, este trabalho consistiu na avaliação do perfil proteolítico de queijos maturados, na qual foram elaborados e maturados por *Lactococcus lactis* (controle), *Enterococcus faecium* (T1) e *Lactococcus lactis* adicionado de *Enterococcus faecium* (T2), ambos provenientes de culturas autóctones da região de Londrina-PR. Assim sendo, o objetivo principal deste estudo, consistiu em avaliar a capacidade dessas bactérias ácido lácticas potencializarem a atividade proteolítica em queijos durante período de maturação a 14°C. Foram realizadas análises físico-químicas e composicional nos tempos 0 e 60 dias de maturação, sendo que, a caracterização físico-química e composicional consistiram nas determinações de pH, acidez titulável, umidade, lipídeos, cloretos, nitrogênio total e nas frações nitrogenadas solúveis em pH 4,6 e em TCA 12 %. O teor de proteína bruta foi satisfatório em todas as amostras, acima de 20 %. No índice de extensão de maturação (IEP), nota-se o T1 proeminente em relação aos demais, o que caracteriza a ação de enzimas proteases como quimosina e plasmina potencializadas pela presença da bactéria ácido-láctica *E. faecium*. Os resultados obtidos destacaram também, uma evolução progressiva nos percentuais de ácido láctico nas amostras controle e T1 durante a maturação, provavelmente pelo aumento progressivo no teor de ácido láctico. No índice de profundidade da proteólise (IPP), a amostra controle apresentou a maior porcentagem neste parâmetro, o que está relacionado com a influência do *L. lactis* na maturação. Portanto concluímos, que a atividade proteolítica durante processo de maturação dos queijos, associada ao uso de bactérias ácido-láticas propostas no trabalho, bem como a eficácia dessas bactérias autóctones, *E. faecium* e *L. lactis*, para o aumento da proteólise, se comportou de maneira eficaz.

Palavras-chave: *Lactococcus lactis*, culturas autóctones, ácido-láctica, análises físico-químicas.

ABSTRACT

BONFIM, Renata M. **Proteolysis study of cheese ripened by *Enterococcus faecium***. 33 sheets. Course Conclusion Paper (Chemistry graduation) – Federal Technological University of Paraná, Londrina, 2019.

Fermented dairy products often have multifunctional properties in their composition that bring benefits to human health. Thus, this work consisted in the evaluation of the proteolytic profile of ripened, elaborated and matured cheeses by *Lactococcus lactis* (control), *Enterococcus faecium* (T1) and *Lactococcus lactis* added by *Enterococcus faecium* (T2), both from native cultures of region Londrina-PR. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the ability of these lactic acid bacteria to increase proteolytic activity in cheese during the ripening period at 14°C. The physicochemical and compositional analyzes were performed at 0 and 60 days of maturation, and the physicochemical and compositional characterization consisted of pH, titratable acidity, humidity, lipids, chlorides, fractions soluble in total nitrogen and nitrogen. pH 4.6 and TCA 12%. The crude protein content was satisfactory in all samples, above 20%. In the maturation extension index (IEP), T1 is prominent in relation to the others, which characterizes the action of protease enzymes such as chymosin and plasmin enhanced by the presence of the lactic acid bacterium *E. faecium*. The results also highlighted a progressive evolution in the percentage of lactic acid in the control and T1 samples during maturation, probably due to the progressive increase in lactic acid content. In the proteolysis depth index (IPP), the control sample presented the highest percentage in this parameter, which is related to the influence of *L. lactis* on maturation. Therefore, we conclude that the proteolytic activity during cheese ripening process, associated with the use of lactic acid bacteria proposed in the work, as well as the efficacy of these native bacteria, *E. faecium* and *L. lactis*, for the increase of proteolysis, behaved effectively.

Keywords: *Lactococcus lactis*, native cultures, lactic acid, physicochemical analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1-Etapas da fabricação de queijos com uso de enzimas específicas.....	11
Figura 2- Demonstração das etapas correspondentes à hidrólise da caseína durante processo de maturação de queijos.....	14
Figura 3- Evolução do Índice de Extensão de Proteólise (A) e Índice de Profundidade de Proteólise (B) durante 60 dias de maturação do queijo.....	27

TABELA

Tabela 1: Resultados físico-químicos e composicional nos tempos inicial e final de maturação (0 e 60 dias).....	25
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3. REFERENCIAL TEÓRICO	10
3.1 Queijo Maturado	10
3.2 Culturas Láticas na Produção de Queijo	11
3.2.1 <i>Enterococcus faecium</i>	12
3.3 Proteólise e os Fenômenos da Maturação	13
4. PARTE EXPERIMENTAL	15
4.1 Produção de queijo maturado	15
4.2 Análises Físico-Químicas	16
4.2.1 Materiais e Métodos	16
4.2.2 pH	17
4.2.3 Acidez titulável	18
4.2.4 Umidade	18
4.2.5 Lipídeos pelo Método de Gerber	19
4.2.6 Cloretos	20
4.2.7 Nitrogênio Total (Método de Kjeldahl)	20
4.2.8 Nitrogênio Solúvel (Método de Kjeldahl)	22
4.2.8.1 Método de extração da amostra	22
4.2.8.2 Fracionamento para determinação de nitrogênio solúvel em pH 4,6 com HCl 1,41 mol/L	22
4.2.8.3 Fracionamento para determinação de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12 % (m/v)	22
4.2.8.4 Digestão das amostras em pH 4,6 e em TCA %)	23
4.2.8.5 Destilação e titulação das amostras digeridas	23
4.2.8.6 Índice de extensão e profundidade de maturação	24
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

Alimentos com características funcionais são cada vez mais procurados em virtude dos reais benefícios que trazem à saúde humana, desta forma, os produtos lácteos podem desempenhar importante papel em função da atividade biológica característica destes alimentos (BARRIENTOS et al., 2015).

O queijo é um alimento rico em proteínas provenientes da matéria prima básica o leite cru, sobretudo potencializado durante processo de fabricação por meio do uso de bactérias ácido-láticas que trazem benefício à saúde humana, as BALs (GASPARIN, 2015).

As bactérias ácido-láticas correspondem a um grupo de bactérias gram-positivas frequentemente utilizadas nas indústrias para produção de produtos lácteos fermentados, uma vez que, podem potencializar características funcionais aos alimentos, regulando funções específicas no organismo (MADERA et al., 2003; GIAZZI, 2017).

Além de promover benefícios funcionais, as BALs desempenham importante papel no fenômeno da proteólise que ocorre nos queijos durante maturação, fenômeno este que é caracterizado por processos bioquímicos, químicos e físicos, que influenciam sobre as características dos queijos como sabor, aroma, textura e outros fatores que afetam a composição do produto final (FIALHO, 2015).

Visando potencializar tais características, o presente trabalho elaborou queijos maturados, com uso de bactérias ácido-láticas específicas como *Enterococcus faecium* e *Lactococcus lactis* (BAL), visto que, *E. faecium* é um microorganismo que acelera o processo de maturação em função do efeito da atividade proteolítica promovida por essa bactéria. Alimentos produzidos por *E. faecium* tendem a produzir mais compostos aromáticos, consequentemente promovendo melhoria no sabor de queijos maturados (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

Desta forma, a proposta fundamental consistiu em avaliar o perfil proteolítico dos queijos durante o processo de maturação, bem como a investigação das características físico-químicas e composicionais durante 60 dias de maturação, provenientes das mudanças perceptíveis que as BALs conferem ao queijo, nos tempos inicial e final de maturação.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o efeito da proteólise promovida por bactérias ácido-láticas (BALs) em queijos maturados durante 60 dias de maturação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Elaborar queijo adicionado de *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecium*;
- ✓ Analisar as características físico-químicas e composicionais do queijo ao longo do processo de maturação;
- ✓ Avaliar o potencial das bactérias ácido-láticas (BALs) em estudo na produção de componentes proteicos, verificando o aumento da proteólise após 60 dias de maturação.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Queijo Maturado

Queijos maturados como o Queijo da Canastra, Minas Curado, entre outros, apresentam como característica peculiar o sabor e aroma suave, textura fina e com nenhuma ou poucas olhaduras lisas e regulares. Seu formato geralmente é cilíndrico, com peso variado entre 800 g e 1,200 kg (EMATER 2012).

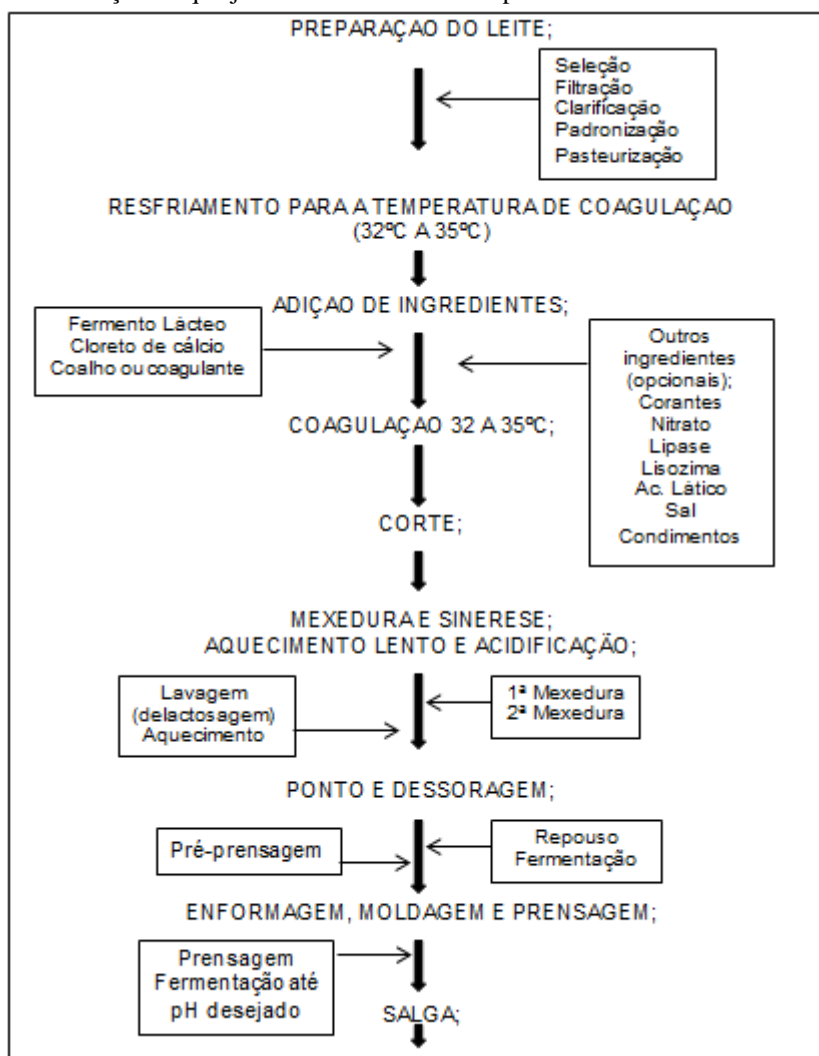
De acordo com a legislação vigente no Brasil, o Regulamento Técnico de Identificação e Qualidade de Queijos- Portaria nº 146/98, define-se queijo como sendo um produto fresco ou maturado que será obtido pela separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou desnatado), ou de soros lácteos coagulados pela ação do coalho, por meio de enzimas específicas, bactérias específicas e de ácidos orgânicos, sejam isolados ou combinados (FURTADO et al, 2009; BRASIL, 1996).

Na produção de queijos, ocorre um processo de concentração do leite, no qual parte dos componentes sólidos, como proteína e gordura, ficam concentrados na coalhada, enquanto as proteínas do soro, lactose e sólidos solúveis são removidos no soro. Queijos produzidos pelo processo de coagulação ácida e por coagulação de proteínas a quente são consumidos geralmente frescos, no entanto, a maioria dos queijos coagulados enzimaticamente com uso de coalhos ou coagulantes são curados ou maturados por um período de tempo que pode variar de 3 semanas a 2 anos (FURTADO et al., 2009).

No processo de fabricação, o uso de bactérias ácido-láticas (BALs), associado à variada microbiota endógena existente e das enzimas naturais do leite, promoverá aos queijos sabor diferenciado, o que elevará a qualidade do produto final.

Em queijos maturados, o objetivo principal é produzir um produto atrativo e durável, com características únicas, que se sobressaem no que se refere ao sabor, aroma e textura. Durante a maturação, os queijos passam por um período na qual são mantidos sob condições apropriadas de temperatura e umidade controladas, período este que ocorrerá as diversas modificações bioquímicas e microbiológicas que trará as particularidades e qualidade que compõe a natureza intrínseca de um queijo curado (FURTADO, et al., 2009). Na Figura 1 destacam-se as etapas de produção de um queijo com uso de enzimas específicas.

Figura 1: Etapas da fabricação de queijo com uso de enzimas específicas.



Fonte: FURTADO et al. (2009); adaptado de FOX et al. (2000).

3.2 Culturas Láticas na Produção de Queijos

Bactérias ácidos láticos correspondem a um grupo com morfologia heterogênea, que podem se apresentar em formato esférico (cocos) ou cilíndricas (bacilos), em arranjos isolados ou cadeias, são Gram positivas, não esporuladas e anaeróbias facultativas (JAY et al, 2005; GIAZZI, 2017).

Em virtude do leite ser uma fonte rica em proteínas e nutrientes, isso facilita o desenvolvimento de microorganismos neste meio, portanto, as bactérias conseguirão encontrar fonte de energia nesta matéria prima, que poderão utilizar o açúcar, a lactose do leite, como energia, produzindo assim, ácido lático na composição (FURTADO et al, 2009).

Outra característica das BALs está na produção de outros compostos além do ácido lático, como o peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e outras

substâncias antimicrobianas de natureza proteica, além de também possuírem a capacidade de produzir enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas o que transforma propriedades presentes no leite, conseqüentemente desencadeando em características sensoriais essenciais no queijo, como por exemplo, melhor sabor, textura, redução de pH e sobretudo, retenção de umidade nos queijos, tudo isso em decorrência da degradação da caseína pelas enzimas proteinases e peptidases (SILVA, 2010; GIAZZI, 2017).

Os microorganismos pertencentes aos grupos das BALs são: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacilus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*, alguns deles podem ser caracterizados como homofermentativos quando produzem somente ácido láctico, e também podem ser heterofermentativo que além de produziram ácido láctico, produzem também outros compostos, como é o caso do *Enterococcus* (SILVA et al, 2016; GIAZZI, 2017).

Já a espécie correspondente ao *Lactococcus lactis*, é frequentemente utilizada na indústria de alimentos para produção de lácteos fermentados, principalmente em queijos, seja maturados ou não-maturados, é considerada uma cultura starter, além de contribuir na inibição possíveis contaminações por microorganismos deteriorantes (DE DEA LINDNER, 2008; GIAZZI, 2017).

De maneira geral, as propriedades metabólicas das bactérias ácido-láticas são responsáveis por características sensoriais agradáveis ao paladar na produção de queijos, além de possibilitarem conservar ou aumentar o valor nutritivo do produto final (CÂMARA, 2012).

Sobretudo, é importante ressaltar, que há estudos que enfatizam as BALs utilizadas em alimentos com alto potencial bioativo, ou seja, alimentos que possuem maior capacidade funcional, que além de promoverem sabor desejável, também promovem benefícios à saúde, o que tem incentivado inúmeros estudos com essas bactérias (CÂMARA, 2012).

3.2.1 *Enterococcus faecium*

O gênero das bactérias ácido-láticas *Enterococcus*, possuem morfologia esférica (cocos), Gram positivas, homofermentativas, catalase negativas, anaeróbias facultativas, com temperatura ótima de crescimento a 37°C, e com possibilidade de crescer a 10°C e 45°C, sobretudo na presença de 6,5 % de NaCl (MARTH, STEELE, 2001; GASPARIN, 2015).

Inicialmente, os primeiros isolamentos da *Enterococcus faecium* foi proveniente de matéria fecal, mas hoje, frequentemente são isoladas a partir de leite cru e de produtos lácteos (GASPARIN, 2015).

A *E. faecium* é uma bactéria ácido láctica que é caracterizada como uma cultura *starter*, chamada de iniciadora, que é responsável pela produção de ácidos durante a elaboração de queijos, contribuindo para o processo de cura, e possuem a capacidade de inibir o crescimento de bactérias não desejáveis nos queijos (COELHO, 2013; GIAZZI, 2017).

Dentre suas particularidades, está a capacidade de acidificação e a produção de enzimas proteolíticas, que irão afetar positivamente fatores sensoriais como sabor, aroma e textura, o que justifica a utilização na fabricação de queijos deste perfil de bactéria (COELHO, 2013; GIAZZI, 2017; VON WRIGHT, 2012).

Os principais benefícios da *E. faecium*, foram demonstrados em ratos, como comprovação os pesquisadores obtiveram resultados relevantes, como diminuição do tempo de duração de diarreias, redução dos níveis do colesterol LDL e aumento do HDL (ROSSI et al., 2000; LIONG, 2011; GASPARIN, 2015).

3.3 Proteólise e os Fenômenos da Maturação

Durante o processo de maturação dos queijos, ocorrem processos bioquímicos, químicos e físicos, que vão incluir transformações correspondentes à proteólise, lipólise e glicólise, que deverão desempenhar grande influência sobre o sabor, aroma, textura e outros fatores que afetam diretamente a composição do produto final (FIALHO, 2015).

A proteólise é o fenômeno bioquímico mais importante durante a maturação, uma vez que corresponde à degradação de proteínas pela ação de enzimas proteolíticas, desencadeando na produção de peptídeos de alto, médio e baixa massa molecular, assim como aminoácidos, aminas e amônias (BALDINI, 1998).

Mais especificamente, de acordo com FOX et. al (1993), as enzimas responsáveis pelo processo de maturação destacam-se em cinco origens distintas, sendo elas:

- 1) Enzimas naturais do leite;
- 2) Enzimas do coalho;
- 3) Enzimas de bactérias “*starter*”;
- 4) Enzimas de bactérias “*starter*” secundárias;
- 5) Enzimas de bactérias não “*starter*” secundárias;

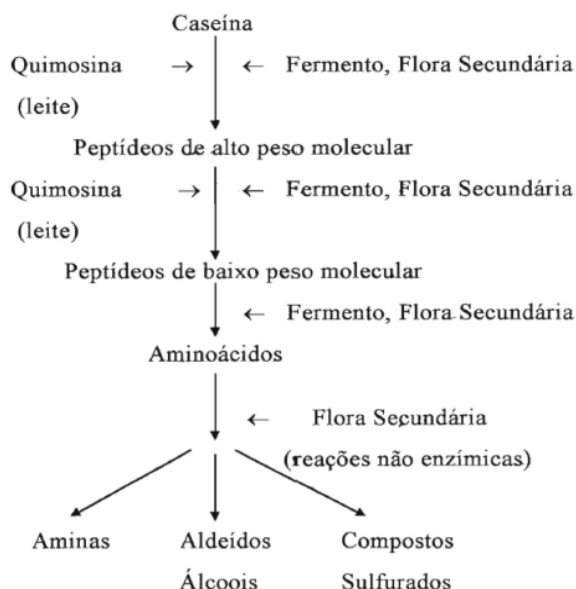
A enzima do coalho animal denominada quimosina, uma endopeptidase, é responsável por duas atividades fundamentais, a primeira é a hidrólise da k-caseína na ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ formando os segmentos 1-105 (para-k-caseína) e 106-169 (caseinomacropéptido); a segunda trata-se da proteólise, que atuará sobre as proteínas, sobretudo durante a cura dos queijos (ECK, 1987; SILVA et. al., 1995).

Já as culturas denominadas “*starters*”, estão presentes nos fermentos utilizados na fabricação dos queijos, em se tratando de culturas lácticas, estas produtoras do ácido láctico, tornam-se responsáveis então pela queda do pH (FIALHO 2015).

Tais bactérias produtoras do ácido láctico as BALs liberam as enzimas endopeptidases ou proteases, que são responsáveis pela hidrólise das proteínas na qual ocorrerá em virtude deste processo, a liberação de peptídeos, e as exopeptidases (aminopeptidases, carboxipeptidases e dipeptidases) são responsáveis pela quebra dos peptídeos em aminoácidos (SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001).

Essas culturas denominadas “*starters*” secundárias são relevantes na degradação das proteínas, geralmente adicionadas com cultura adjunta ou estando presente, muitas vezes, em função das características da região onde o queijo é fabricado (FIALHO, 2015).

Figura 2: Demonstração das etapas correspondentes à hidrólise da caseína durante processo de maturação de queijos.



Fonte: LAW (1987).

Desta forma, considera-se a proteólise o principal fenômeno na fabricação de queijos, uma vez que, a produção de aminoácidos e peptídeos irá promover aroma e saber ao alimento.

Durante o fenômeno da proteólise, também ocorrerá mudanças no pH em função da formação de amônia, mudança na textura em função da quebra de proteínas e maior ligação de água pelos grupos formados, amino e carboxílicos (FOX et al., 2000; SANTIS, 2016).

Para se medir a evolução deste fenômeno nos queijos, algumas análises físico-químicas são essenciais para caracterização, como por exemplo, o índice de extensão da proteólise (IEP), proteólise primária, calculado pela razão entre o nitrogênio não-caseico e o nitrogênio total, assim sendo é possível afirmar, que quanto maior a atividade proteolítica primária, mais peptídeos solúveis em pH 4,6 serão liberados da caseína. Já o índice de profundidade de proteólise (IPP), proteólise secundária, é obtido pelo cálculo entre a razão entre o nitrogênio não-proteico e o nitrogênio total, fenômeno este que ocorre principalmente pela ação de culturas iniciadores (WOLFSCHOON-POMBO, 1983; FOX, 1993a; FOX et al., 1993b; PERRY, 2004; SANTIS, 2016).

4 PARTE EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, nos Laboratórios de Laticínios e Multiusuário. Os queijos foram produzidos no laboratório de laticínios e mantidos sob refrigeração durante período de maturação a 14°C.

As análises dos queijos em geral, são definidas através da determinação de substâncias voláteis, protídios, acidez em ácido lático e pH, análises que contribuem para verificação da atividade proteolítica durante o processo de maturação, além de análises composicionais. Todas as análises baseiam-se na Instrução Normativa nº 11 (ADOLFO LUTZ, 2005), e Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006, ANEXO V).

As determinações foram realizadas nos períodos de maturação correspondentes aos tempos 0 e 60 dias. As análises físico-químicas e composicional realizadas durante processo de maturação foram: pH, acidez titulável, umidade, lipídeos pelo método de Gerber, cloretos (método de Mohr), nitrogênio total (Método de Kjeldahl), nitrogênio solúvel em pH 4,6 e em ácido tricloroacético 12% (Método de Kjeldahl), extensão ou índice de maturação (IEP), índice de profundidade de maturação (IPP).

4.1 Produção de Queijo Maturado

Os queijos foram elaborados conforme metodologia descrita por Furtado (2005) com algumas modificações tecnológicas no Laboratório de Laticínios da UTFPR câmpus Londrina. Para fabricação dos queijos, o leite foi pasteurizado e padronizado a 3,4 % de gordura.

Após pasteurização e padronização, o leite foi aquecido a 35° C em tanque de coagulação, na sequência adicionou-se 0,04% (v/v) de cloreto de cálcio a 50% (m/v), logo em seguida, adicionou-se os fermentos lácticos, sendo o controle (C) composto por *Lactococcus lactis*, o tratamento 1 (T1) *Enterococcus faecium*, e o tratamento 2 (T2) a mistura dos dois fermentos *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecium* na proporção de 10⁸ células/mL para cada 100 L de leite.

Subseqüencialmente, o leite foi pré-maturado por 10 minutos e em seguida adicionou-se o coagulante a base de renina (0,008 %). Misturou-se bem e foi deixado em repouso por um período de 50 minutos até que obtivesse uma consistência de coalhada ao corte.

Após período de repouso, verificou-se com o auxílio de uma faca, o ponto da coalhada, de modo a suspender a massa até que a mesma se quebre em duas partes, até observar que a massa estivesse lisa e brilhante nas laterais. Feito isto, com um par de liras, material específico para cortes de queijo em cubos, realizou-se o corte horizontalmente e depois verticalmente a fim de se obter cubos de 1,0 cm a 1,5 cm. Deixou-se em repouso por 2 minutos e submeteu-se a uma mexedura lenta por 30 minutos. Seguidamente, retirou-se 1/3 do soro, efetuou-se a salga com sal de cozinha e realizou-se um semi-cozimento da massa até 38°C.

Para finalizar o processo, distribuiu-se a massa em formas com dessorador, as formas foram encaminhadas para prensagem inicial durante 30 minutos, após este tempo inicial, realizou-se a viragem dos queijos e o mesmo processo foi repetido a cada 1 hora, contemplando um total de 3 horas (3 viragens). Os queijos foram desenformados e submetidos a secagem na geladeira a 10°C por 24 horas e depois foram maturados em uma estufa incubadora BOD a temperatura de 14° C. Por fim foram embalados à vácuo e transferidos para uma câmara de maturação a 14°C por 60 dias.

4.2 Análises Físico-Químicas e Composicionais

4.2.1 Materiais e Métodos

✓ Materiais

Espátula de metal, cápsulas de porcelana (cadinhos), pinça de madeira, béqueres, erlenmeyers, termômetro, bastão de vidro, balões volumétricos de 100 mL e 200 mL, provetas, bureta, butirômetros para queijo, rolhas para butirômetros, banho-maria, bico de papagaio de 10 mL e 1 mL, estante para tubos, luvas, mixer triturador, tubos de Kjeldahl, pipetas graduadas, pipeta automática (5 mL), ponteiras, funil de vidro, funil de Büchner, papel filtro, pinça metálica.

✓ **Reagentes:**

Água destilada, soluções tampão em pH 4,0 e 7,0, H₂SO₄ densidade 1,82, álcool isoamílico, cromato de potássio 5%, AgNO₃ 0,1 mol L⁻¹, fenolftaleína 1%, NaOH 0,1 mol L⁻¹, H₂SO₄ PA, NaOH 50 %, HCl 0,05 mol L⁻¹, H₃BO₃ 4%, Indicador Misto (vermelho de metila PA + azul de metileno PA + etanol 97%), citrado de sódio 0,5 mol L⁻¹, Ácido tricloroacético 24 %, mistura catalítica (sulfato de cobre + sulfato de potássio), HCl 1,41 mol L⁻¹.

✓ **Equipamentos**

Balança analítica, pHmêtro, bloco digestor, bomba de sistema à vácuo, destilador, mufla, dessecador em sílica gel.

4.2.2 pH

Os processos disponíveis para determinação de pH podem ser denominados como colorimétricos ou eletrométricos, nos colorimétricos observa-se a tonalidade na alteração de coloração em concentrações de íons de hidrogênio, no entanto é considerado limitado, por apresentar medidas aproximadas. Já nos métodos eletrométricos empregam-se aparelhos denominados potenciômetros, especificamente adaptados, na qual permitem uma determinação direta e precisa do pH, são calibrados com as soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 respectivamente.

Após a calibração, pesou-se 10,0000 g da amostra em um béquer de 100 mL e adicionar 50 mL de água morna destilada a 40°C, homogeneizou-se o queijo com auxílio de uma espátula até que formasse uma pasta, em seguida esfriou-se até atingir 25°C e submergiu

o bulbo do eletrodo na solução, determinou-se o pH anotando a medição disponível no leitor do equipamento.

4.2.3 Acidez Titulável

A acidez pode determinar uma apreciação no estado de conservação de um produto alimentício. O processo de decomposição por hidrólise, por exemplo, altera a concentração de íons de hidrogênio.

De maneira geral, obtém-se nesta análise, a porcentagem de ácido láctico nos queijos, avaliando sua variação durante processo de maturação.

Em um béquer de 150 mL pesou-se 10,0000 g da amostra, acrescentou-se 50 mL de água morna isenta de gás carbônico a 40°C, agitou-se com bastão de vidro até dissolução. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, esfriou-se em água corrente e o volume foi completado até o menisco. Retirou-se uma alíquota de 50 mL para um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 10 gotas de indicador fenolftaleína a 1% e titulou-se com solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol L⁻¹, até coloração rósea persistente, por fim anotou-se o volume gasto.

Cálculo:

$$\% \text{ em ácido láctico} = \frac{V \times f \times 0,9}{m} \quad (1)$$

Sendo:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹;

0,9 = fator de conversão do ácido láctico;

m = massa da amostra na alíquota, em gramas.

4.2.4 Umidade

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico, através da dessecação em estufa a 105°C. Nesta metodologia, ocorre a perda de massa em condições em que água e substâncias voláteis são removidas por evaporação durante secagem em estufa.

Inicialmente os cadinhos foram tarados em estufa por cerca de 3 horas a 105°C. Após, foram resfriados em dessecador e pesados, anotando a respectiva massa dos cadinhos vazios.

Na sequência pesou-se 5,0000 g de amostra nos cadinhos, em seguida foram levados a estufa por cerca de 4 horas. Após este período de tempo, esfriou-se em dessecador e realizou-se a primeira pesagem. Em seguida, os cadinhos foram encaminhados novamente para estufa, repetindo esta operação a cada 1 hora, até que o valor entre as pesagens fosse inferior a 1,0000 mg.

Cálculo:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{\text{MA-MB}}{\text{MC}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

MA = massa do cadinho + amostra (g) antes da secagem;

MB = massa do cadinho + amostra (g) após secagem;

MC = massa da amostra (5,0000 g).

4.2.5 Lipídeos pelo método de Gerber

Neste método, realiza-se a separação e quantificação da gordura, por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico PA e álcool isoamilíco. Assim, o ácido terá a função de dissolver as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo então a viscosidade do meio, aumentando, portanto a densidade da fase aquosa fundindo a gordura, o que favorecerá a separação da gordura pelo extrator, o álcool isoamílico. A leitura do percentual de gordura é feita em escala de butirômetro, após processo de banho-maria e centrifugação das amostras (EMATER, 2012).

Em um butirômetro específico para queijo, após vedação adequada da parte inferior da vidraria, pesou-se 3,0000 g da amostra.

Posteriormente, adicionou-se 5 mL de água destilada, 10 mL da solução de ácido sulfúrico (densidade 1,82) e 1 mL de álcool isoamílico. Os butirômetros foram tapados e agitados cuidadosamente, envolvendo ao butirômetro uma toalha de mão, até dissolução.

Para garantir a dissolução completa, as vidrarias foram encaminhadas a banho-maria a 65°C. Após completa dissolução das amostras, removeu-se a tampa dos butirômetros e

adicionou-se água destilada até a última marcação do mesmo. Enxugou-se a borda e recolocou-se a tampa de modo que ficasse bem vedada.

Por fim, os butirômetros foram levados a centrífuga por 10 minutos a 1200 rpm, leu-se e anotou-se a porcentagem de gordura na escala do butirômetro.

4.2.6 Cloretos

O teor de cloreto de sódio pode ser determinado no queijo pela titulação com nitrato de prata (AgNO_3) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Mais especificamente, nesta metodologia utiliza-se o Método de Mohr, na qual baseia-se na formação de um precipitado colorido, vermelho tijolo, sendo o titulante uma solução de AgNO_3 e como indicador a solução de cromato de potássio.

Após incinerar as amostras em mufla por um período de 12 horas (5,0000 g), as cinzas obtidas foram transferidas para um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 50 mL de água morna a 40°C , lavou-se o cadinho até que a amostra fosse totalmente removida. A solução foi homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro.

Na sequência, acrescentou-se 1 mL da solução de cromato de potássio a 5% e titulou-se com solução de nitrato de prata $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até obtenção da coloração vermelho tijolo. Anotou-se o volume gasto.

Cálculo:

$$\% \text{ NaCl} = \frac{\text{vol} \times \text{fc} \times \text{C} \times 5,845}{\text{g}} \quad (3)$$

Sendo:

vol = volume gasto da solução de nitrato de prata na titulação em mL;

fc = fator de correção da solução de nitrato de prata;

C = quantidade de matéria da solução de nitrato de prata ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$);

g = gramas de cinzas na amostra;

5,845 = é o fator de conversão para ver a quantidade de proteína que tem na amostra.

4.2.7 Nitrogênio Total (Método de Kjeldahl)

A proteína total pode ser determinada pelo método de Kjeldahl, por meio da multiplicação da porcentagem de nitrogênio total (NT) pelo fator de correção 6,38 indicado

pela proteína do leite, de acordo com a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (FIALHO, 2015).

Em papel seda pesou-se 0,2500 g da amostra, transferiu-se para tubo Kjeldahl, adicionou-se 2,5000 g da mistura catalítica e em capela, pipetou-se 7 mL de H₂SO₄ PA. A prova em branco foi realizada apenas com mistura catalítica e H₂SO₄ PA.

Os tubos foram encaminhados para aquecimento em bloco digestor, de forma lenta, iniciando a temperatura em 100°C e aumentando a cada 1 h (100 °C), até atingirem a temperatura de 400°C, ao atingir manteve-se em digestão por mais 30 minutos, observou-se a coloração do líquido, límpido e transparente, de tonalidade azul-esverdeada. Desligou-se o digestor e, em estante apropriada com o auxílio de pinça metálica inseriu-se os tubos até adequado resfriamento.

Em seguida, prepararam-se erlenmeyers (250 mL) com 20 mL da solução de H₃BO₃ a 4 % e 4 gotas de indicador misto (vermelho de metila+azul de metileno), sendo este o receptor do destilado.

Com o tubo de Kjeldahl já resfriado, adicionou-se ao mesmo 10 mL de água destilada, de forma cuidadosa, pois a solução é exotérmica, em seguida o tubo foi adaptado ao destilador e despejado lentamente a solução de NaOH 50 % (20-25 mL) até que formasse uma coloração negra.

Ao atingir 100 mL de material destilado, titulou-se a solução com HCl 0,05 mol L⁻¹, até obtenção de uma coloração rósea persistente, anotou-se volume gasto.

Cálculos:

$$a) \% \text{ nitrogênio total} = \frac{(A - B) \times C_i \times f_c \times 1,4}{m} \quad (4)$$

$$b) \% \text{ nitrogênio total} \times F (6,38) = \text{nitrogênio protéico} \quad (5)$$

Sendo:

A = volume de HCl gasto na titulação da amostra, em mL;

B = volume de HCl gasto na titulação da prova em branco, em mL;

C_i = concentração da solução de HCl (0,05 mol L⁻¹);

f_c = fator de correção da solução de HCl;

m = massa da amostra, em gramas (0,2500 g);

F = 6,38 é o fator de conversão para ver a quantidade de proteína que tem na amostra.

4.2.8 Nitrogênio Solúvel (Método de Kjeldahl)

Para verificação de nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 é determinado a dosagem do nitrogênio no sobrenadante obtido após precipitação isoelétrica das caseínas. Já para determinação de NS em TCA 12 %, é obtido pela dosagem de nitrogênio após precipitação das proteínas com ácido tricloroacético (BALDINI, 1998).

4.2.8.1 Método de extração da amostra

Com o auxílio de um mixer triturador, transferiu-se pequenos pedaços das amostras de queijo, triturando-as separadamente com cuidado. Sequencialmente, em balança analítica pesou-se 10,0000 g de queijo triturado e transferiu para um copo processador. Adicionou-se 80 mL de água destilada a 45°C e 40 mL da solução de citrato de sódio a 0,5 mol L⁻¹, então, a solução foi homogeneizada no processador.

Transferiu-se quantitativamente a suspensão obtida com auxílio de um funil para um balão volumétrico de 200 mL, realizando algumas lavagens com pequenos volumes de água de modo que toda solução fosse devidamente transferida.

Completo-se com água destilada o balão até o menisco, o balão foi invertido algumas vezes para uniformizar a suspensão. Este método de extração foi realizado em triplicata para cada amostra. Esta solução foi reservada para utilização nas frações para determinação de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA 12 %) e em pH 4,6 com HCl 1,41 mol L⁻¹.

4.2.8.2 Fracionamento para determinação de nitrogênio solúvel em pH 4,6 com HCl 1,41 mol L⁻¹

Em proveta mediu-se 100 mL da solução obtida na extração e transferiu-se para um béquer de 150 mL. Adicionou-se em seguida, com pipeta graduada, 10 mL da solução de HCl 1,41 mol L⁻¹. Após 5 minutos e acrescentou-se 15 mL de água destilada. Em sistema de bomba à vácuo filtrou-se a solução e reservou-se o filtrado obtido para posterior digestão da amostra.

4.2.8.3 Fracionamento para determinação de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12 % (m/v)

Mediu-se novamente em proveta 50 mL da solução obtida na extração e transferiu-a para um béquer de 150 mL. Adicionou-se sequencialmente, também com uso de proveta, 50 mL da solução de TCA a 24 % (m/v), aguardou-se cerca de 15 minutos. Filtrou-se com papel filtro em sistema de bomba à vácuo, reservou-se o filtrado obtido para digestão da amostra.

4.2.8.4 Digestão das amostras em pH 4,6 e em TCA 12 %

Em tubo Kjeldahl, adicionou-se 1,6000 g de mistura catalítica, na sequência com auxílio de pipeta automática, 5 mL do filtrado obtido, e em capela 3 mL de H₂SO₄ PA. Para a prova em branco, adicionou-se a mistura catalítica, 5 mL de água destilada e 3 mL de H₂SO₄ PA. Agitou-se cuidadosamente, os tubos foram levados para digestão em capela contendo o bloco digestor.

As amostras foram digeridas com temperatura inicial de 100°C, e elevadas gradativamente a cada 1 hora (100°C), até que atingiram 400°C, quando as amostras apresentaram-se coloração clara e esverdeada, manteve-se o aquecimento por mais 30 minutos. Em seguida, desligou-se o digestor, os tubos foram retirados e transferidos cuidadosamente com o auxílio de pinça metálica em estante apropriada para resfriamento. O material foi reservado para posterior destilação.

4.2.8.5 Destilação e titulação das amostras digeridas

Preparou-se erlenmeyers de 250 mL contendo 10 mL da solução de H₃BO₃ a 4 % e 2 gotas de indicador misto, esta solução correspondeu ao receptor do material destilado.

Adicionou-se ao tubo de Kjeldahl obtido na digestão, 30 mL de água destilada, de modo a dissolver o material contido no tubo após digestão. Em seguida, acoplou-se ao tubo destilador e despejou-se lentamente a solução de NaOH 50 %, até que a coloração obtivesse a coloração negra, procedeu-se a destilação até obtenção de 100 mL de material destilado.

Após atingir 100 mL de destilado, titulou-se a solução com HCl 0,05 mol L⁻¹ até obtenção de viragem da coloração verde a rósea persistente. Anotou-se o volume gasto.

Cálculos:

a) teor percentual de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (nitrogênio não caseico)

$$\%_{\text{NSpH4,6}} = \frac{(A-B) \times C_i \times f_c \times 1,4}{g} \quad (6)$$

Sendo:

A = volume de solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra;

B = volume de solução de ácido clorídrico gasto na titulação da prova em branco;

C_i = concentração (mol L⁻¹) da solução de ácido clorídrico (no caso foi usado 0,05 mol L⁻¹);

F_c = fator de correção para a solução de ácido clorídrico;

g = porção alíquota da amostra (10/200 x 100/125 x 5 = 0,2 mL).

b) teor percentual de nitrogênio solúvel em TCA (nitrogênio não proteico)

$$\%_{\text{NSTCA12\%}} = \frac{(A-B) \times C_i \times f_c \times 1,4}{g} \quad (7)$$

Sendo:

A = volume de solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra;

B = volume de solução de ácido clorídrico gasto na titulação da prova em branco;

C_i = concentração (mol L⁻¹) da solução de ácido clorídrico (no caso foi usado 0,05 mol L⁻¹);

F_c = fator de correção para a solução de ácido clorídrico;

g = porção alíquota da amostra (10/200 x 100/125 x 5 = 0,125mL).

4.2.8.6 Índice de extensão e profundidade de proteólise

A extensão da maturação (IEP) será definida pela razão entre a porcentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e a porcentagem de nitrogênio total (NT), multiplicando o valor por 100. A profundidade de maturação será determinada pela razão entre a porcentagem de nitrogênio solúvel em TCA 12 % e a porcentagem de nitrogênio total (NT), multiplicando o valor obtido por 100, como descrito abaixo (FIALHO, 2015).

Para o índice de extensão da proteólise, utilizou-se o valor obtido em porcentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio total, como mostra a equação a seguir (WOLFSCHOON-POMBO, 1983):

$$\text{Extensão da proteólise} = \% \frac{\text{nitrogênio solúvel em pH 4,6} \times 100}{\% \text{ nitrogênio total}} \quad (8)$$

Para o índice de profundidade (IPP) da proteólise utilizou-se o valor obtido em porcentagem de nitrogênio solúvel em TCA 12 % e nitrogênio total, como mostra a equação a seguir (WOLFSCHOON-POMBO, 1983):

$$\text{Profundidade da proteólise} = \% \frac{\text{nitrogênio solúvel em TCA 12 \%} \times 100}{\% \text{ nitrogênio total}} \quad (9)$$

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos quanto à composição proximal e análises físico-química, foram tratados por Análise de Variância (ANOVA) e a comparação de médias foram realizadas pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada através do software livre Bioestat (5.0).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Furtado (2005), queijos tipo Minas padrão geralmente apresenta pH em torno de 5,0 quando maturado em 20 dias (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados físico-químicos e composicional nos tempos inicial e final de maturação (0 e 60 dias).

Parâmetros	0 dias			60 dias		
	C*	T1	T2	C	T1	T2
pH	4,97±0,02 ^{bA**}	5,26±0,03 ^{aA}	4,90±0,02 ^{cB}	4,99±0,05 ^{bA}	5,27±0,01 ^{aA}	5,13±0,01 ^{bA}
Acidez (g de ác. láctico.100g ⁻¹)	0,54±0,03 ^{aB}	0,34±0,04 ^{bB}	0,55±0,02 ^{aA}	0,67±0,01 ^{aA}	0,42±0,02 ^{cA}	0,58±0,01 ^{bA}
Umidade (% p.p ⁻¹)	52,53±1,06 ^{bA}	54,12±0,27 ^{abA}	54,51±0,39 ^{aA}	36,51±2,40 ^{abB}	38,04±0,59 ^{abB}	31,08±0,69 ^{bbB}
Lipídeos (%)	23,00±0,00 ^{bbB}	24,67±0,58 ^{abB}	24,33±1,15 ^{bbB}	29,00±1,41 ^{baA}	27,00±1,73 ^{baA}	34,00±1,41 ^{aA}
Cloretos (% p.p ⁻¹)	0,86±0,02 ^{baA}	0,96±0,02 ^{aaA}	0,86±0,02 ^{bbB}	0,88±0,02 ^{baA}	1,29±0,41 ^{aaA}	1,18±0,00 ^{aaA}
Proteínas (%)	16,02±1,27 ^{abB}	15,25±0,07 ^{bbB}	17,40±0,19 ^{abBt}	21,85±0,32 ^{baA}	21,29±0,38 ^{baA}	23,71±0,73 ^{aaA}

*C - *Lactococcus lactis*, T1 - *Enterococcus faecium* e T2 - *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecium*, IEP= Índice de extensão de maturação, IPP= Índice de profundidade de maturação.

**a, b letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância entre os tratamentos no mesmo tempo. ^{A, B} letras maiúsculas diferentes indicam que um tratamento apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância entre os tempos de maturação

Fonte: Do próprio autor (2019).

O queijo adicionado de *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecium* (T2) apresentou menor pH comparado aos demais tratamentos no tempo inicial da maturação. Enquanto todos os tratamentos apresentaram pH ao redor de 5,0 conforme relatado por Furtado (2005). Com o

tempo de maturação, o queijo sofre atividade bioquímicas que pode colaborar com o aumento do pH.

O queijo elaborado por *Enterococcus faecium* (T1) apresentou menor acidez titulável comparado aos demais tratamentos no tempo inicial e depois de 60 dias, isso pode ser devido a menor capacidade acidificante do isolado utilizado neste estudo. Neste estudo permite observar que na produção de queijos maturados é essencial a participação do *Lactococcus lactis*. A acidez titulável está relacionado a concentração de proteínas nos queijos além de outros componentes como ácidos graxos, fosfatos, citratos, carbonatos, sulfatos de cálcio e magnésio (AMIOT, 1991).

Os teores de umidade nos queijos no tempo inicial de maturação variaram de 52,53 a 54,51 %, o que permite classificá-lo inicialmente como queijo de alta umidade de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 1996). O uso diferenciado das culturas lácticas não influenciou o teor de umidade inicial. Após 60 dias de maturação ocorreu redução significativa no teor de umidade, onde este foi classificado como de média umidade conforme a legislação e o tratamento T2 apresentou menor teor de umidade classificando-o como de baixa umidade. Possivelmente a associação das culturas lácticas neste tratamento parece ter contribuído com maior perda de umidade.

Quanto ao teor de lipídeos, os resultados obtidos no tempo inicial variaram de 23,00 a 24,67 %, enquanto que no tempo final, os resultados variaram de 27,00 % a 34,00 %. Nota-se em todos os tratamentos um aumento no teor de lipídeos após 60 dias de maturação, sendo a amostra T2 a com maior variação, passando de 24,33 % para 34,00 %. Esses valores ultrapassam ao ideal em queijos Minas Padrão, segundo Furtado (2005) devem apresentar cerca de 23,00 a 25,00 % de gordura. Nota-se portanto, após período de maturação um aumento significativo no teor de gordura, este parâmetro está relacionado a perda do teor de umidade após os 60 dias de maturação, sendo a amostra T2 a que demonstrou maior redução da umidade, como descrito anteriormente, o que comprova a influência da umidade na determinação de lipídeos, assim como nos demais tratamentos.

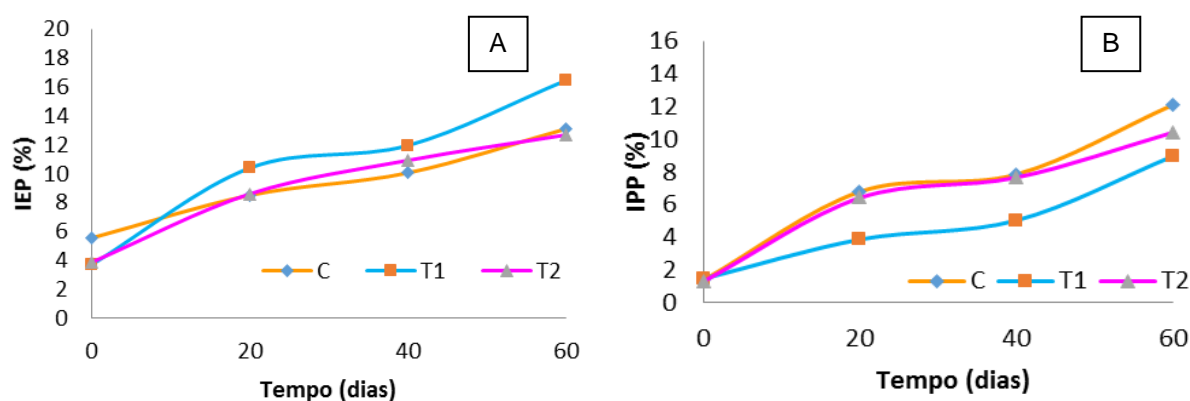
Os teores de cloretos nesse estudo, no tempo inicial variaram de 0,86 a 0,96 %, já no tempo final, variaram de 0,88 a 1,29 %. Segundo Furtado (2005), o teor de cloretos para queijos tipo Minas Padrão deve variar entre 1,4 e 1,6 %, ou seja, todos os tratamentos estão abaixo do indicado, esta perda de sal, ocorre muito provavelmente em função da lixiviação na moldagem e prensagem dos queijos durante a produção.

Com relação aos teores de proteínas, especificamente à proteína bruta, as amostras controle e T2 obtiveram um aumento em torno de 36 % após 60 dias de maturação em relação

ao teor inicial, passando o controle de 16,02 % para 21,85 % e o tratamento 2 de 17,40 % para 23,71 %, enquanto o tratamento 1 expressou um aumento de 40 % sob o valor inicial, de 15,25 % para 21,29 %. No entanto dentre as três formulações, de maneira geral, o tratamento 2 é o que apresenta maior teor de proteína bruta de 23,71 %. De acordo com o preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria nº146/1996 (BRASIL, 1996), o percentual ideal mínimo de proteína em queijos deve ser de 20%, apresentando os três tratamentos deste estudo, após 60 dias de maturação, teor satisfatório.

O IEP do tratamento C apresentou superior aos demais tempos no início do período de maturação (3A).

Figura 3 – Evolução do Índice de Extensão de Proteólise (A) e Índice de Profundidade de Proteólise (B) durante 60 dias de maturação do queijo.



C - *Lactococcus lactis*, T1 - *Enterococcus faecium* e T2 - *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecium*

IEP= Índice de extensão de maturação, IPP= Índice de profundidade de maturação.

Fonte: Do próprio autor (2019).

O índice extensão de maturação (IEP), caracterizado pela ação de enzimas proteases no queijo, foi determinado em função da razão entre a porcentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e a porcentagem de nitrogênio total (NT), multiplicando o valor por 100 (FOX, 2000, HACHIYA, 2015). Este índice inclui peptídeos de alta e média massa molecular, além de aminoácidos livres, identificados em função da proteólise primária, que é potencializada pela ação da quimosina e plasmina (GASPARIN, 2015). A bactéria ácido láctica *Enterococcus faecium*, poderá promover a extensão da proteólise, que durante o processo de maturação dos queijos em virtude da ação de enzimas proteases como quimosina e plasmina, potencializará o aumento deste índice, o que desencadeia em características sensoriais desejáveis aos queijos (GASPARIN, 2015; GIAZZI, 2017) .

Nos resultados obtidos quanto ao IEP (Figura 3A), evidenciamos aumento em todas as amostras, sendo que, o controle (C) passou de 5,55 % inicial para 13,07 %, o tratamento 1

(T1) de 3,67 % para 16,49 % e o tratamento 2 (T2) de 3,84 % para 12,65 %, após os 60 dias de maturação. Este estudo permitiu observar que o tratamento 1 (T1) apresentou maior atividade proteolítica comparado aos demais tratamentos promovendo um aumento na hidrólise primária das proteínas. Em pesquisa realizada no Laboratório de Laticínios da UTFPR câmpus Londrina em 2018, observou que este isolado de *Enterococcus faecium* utilizado na produção dos queijos apresentou maior atividade proteolítica dos queijos.

O índice de profundidade de maturação (IPP), ou seja, o grau de proteólise (Figura 3B), é identificado na proteólise secundária, foi definido em razão da porcentagem de nitrogênio solúvel (NS) em TCA 12 % e pela porcentagem de nitrogênio total (NT). Neste parâmetro, também evidenciamos aumento nos respectivos tratamentos após maturação, visto que o controle (C) passou de 1,39 % para 12,07 %, o tratamento 1(T1) aumento de 1,45 % para 8,93 % e o tratamento 2 (T2) de 1,28 % para 10,45 %, podendo ser observado essa evolução na Figura 3B. O IPP é complementar aos resultados provenientes da porcentagem de ácido láctico nos queijos, este índice vai indicar o grau de proteólise das enzimas das bactérias ácido lácticas, mais especificamente, conseguimos afirmar a presença de peptídeos de menor massa molecular em função da quebra de proteínas com ruptura de ligações peptídicas, sendo aumentado com o passar da maturação, visto que nas amostra C e T2 obtivemos valores superiores de ácido láctico, 0,67 e 0,58 % respectivamente, enquanto o T1 apresentou menor porcentagem de ácido láctico (0,42 %), corroborando a influência direta do maior teor na porcentagem de ácido láctico com o aumento da proteólise após a maturação (KATSUDA, et al., 2018).

7 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, concluímos que o tratamento T1 apresentou maior pH entre os tratamentos ao longo do tempo de maturação. Por outro lado, a acidez titulável do mesmo tratamento foi inferior em relação aos demais tratamentos, o que permite constatar que o *Enterococcus faecium* não possui boa atividade fermentativa.

O teor de umidade de todos os tratamentos apresentou homogêneo no tempo inicial, por outro lado o queijo T2 apresentou uma redução significativa no teor de umidade, o qual apresentou baixa umidade. Com a redução do teor de umidade ao longo do tempo de maturação, os queijos apresentaram aumento significativo no teor de gordura e proteínas. Os teores de cloretos em todos os tratamentos foram inferiores a 1,4 %, proporção ideal em

queijos Minas Padrão, esta redução, está relacionado ao processo de lixiviação durante moldagem e prensagem dos queijos, ocasionando a perda de sal.

O índice de extensão de maturação (IEP) foi mais proeminente no tratamento 1 (T1), permitindo concluir que o isolado *Enterococcus faecium* contribuiu com a proteólise primária.

O índice de profundidade de maturação (IPP) foi superior ao tratamento controle, o que permite observar que o *Lactococcus lactis* parece ter contribuído com esse parâmetro.

Portanto, podemos concluir que a atividade proteolítica durante processo de maturação dos queijos, associada ao uso de bactérias ácido-láticas propostas no trabalho, bem como a eficácia dessas bactérias autóctones, *Enterococcus faecium* e *Lactococcus lactis*, no aumento da proteólise, foi eficaz, o que justifica os inúmeros trabalhos que verificam a contribuição dessas bactérias em alimentos com propriedades bioativas e multifuncionais

REFERÊNCIAS

AMIOT, J. **Ciencia y Tecnologia de la leche – Principios e aplicaciones**. Zaragoza: Acribia, 1991.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos Funcionais**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>, acesso em: 05 mai. de 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999**. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília, 1999.

BALDINI, V. L. S. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação**. 1998. 208f. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BAPTISTA, D. P. **Proteólise de queijo prato com diferentes teores de sal**. 149f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

BARRIENTOS, B. M. L; CÓRDOBA, V.B; CÓRDOVA, G. F. A; LIANEZ, T. J. M. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 4099-4110, jul, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos: Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

CÂMARA, Sandra P. de A. **Estudo do potencial bioactivo e tecnológico de bactérias do ácido-lático isoladas de queijo do Pico Artesanal**. 83f. Dissertação de Mestrado – Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2012.

COELHO, M.C. **Isolamento e caracterização de bactérias do ácido láctico produtoras de bacteriocina e sua aplicação no fabrico de queijo fresco**. 129f. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade de Açores, Angra do Heroísmo, 2013.

DE DEA LINDNER, J. **Traditional and innovative approaches to evaluate microbial contribution in long ripened fermented foods: the case of Parmigiano Reggiano cheese**. Dissertation (Ph. D. in Food Science and Technology) - Università degli Studi di Parma, p.128. 2008.

ECK, A. **O queijo**. Coleção Euroagro, [S.1]: Europa-América, v. 1, 336 p, 1987.

EMATER. Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Fabricação de produtos lácteos: princípios básicos**. Belo Horizonte, Emater-MG, dez. 2012.

FIALHO, T. L. **Identificação e ação antimicrobiana de peptídeos de queijo minas artesanal da Canastra**. 2015. 97f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physic and microbiology: general aspects**. London: Chapman e Hall, v. 1, 1993.

FOX, P. F. et al. Biochemistry of cheese ripening. In__. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2 nd ed. London: Chapman e Hall, v. 2, p. 388-438, 1993.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg Maryland: Aspen Publishers: [s.n], 2000.

FOULQUIÉ MORENO, M. R. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

FURTADO, M. M. **Quesos típicos de Latinoamérica**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda.: [s.n.], 2005.

FURTADO, M. M; PAULA, Junio C. J. de; CARVALHO, Antonio F. de. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. Juiz de Fora: **Revista Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**. n. 367/368, p. 19-25, 2009.

GASPARIN, K. **Desenvolvimento de queijo minas curado com adição de *Enterococcus Faecium EF1*, *Lactobacillus Helveticus LH 13* e Extrato de Cúrcuma (*Curcuma Longa L.*)** 81f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

GIAZZI, Amanda. **Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo Minas artesanais e leite cru**. 77f. Dissertação de Mestrado – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

HACHIYA, Jefferson S. de A. **Redução de sódio em queijo Minas padrão: Efeito nas características físico-químicas e no perfil de textura**. 71f. Dissertação de Mestrado – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAY, J. M. et al. Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts. **Int. J. Dairy Tech.**, v. 58, n.1, p. 30-38. 7 ed. New York: Springer, 2005.

JENNES, R; WALSTRA, P. **Química y Física lactológica**. Zaragoza: Acribia S.A, 1987.

KATSUDA, M. S. et al. **Tópicos em Ciências e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas**. v. 4. p. 75-97, São Paulo: Blucher, 2018.

KUCHROO, C. N; FOX, P. F. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. **Milchwissenschaft**, v. 26, p. 489-495, 1982.

LAW, B. A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P. F., ed. **Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects.** London: Elsevier Applied Science, v. 1, p. 365-400, 1987.

LIMA, M. DE S; PENNA, L. P. DE C. **Fabricação de produtos lácteos: princípios básicos.** Belo Horizonte-Emater-MG, 2012.

LIONG, M. T. **Probiotics: biology, genetics and health aspects.** v. 21. [s.l.: s.n.], 2011.

LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos: vaca, oveja, cabra.** Zaragoza: Acribia S.A, v.1, 1991.

MADERA, C. et al. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n.3, p.213-222, 2003.

MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology.** 2 ed. Marcel Dekker: [s.n], 2001.

OLIVEIRA, F. D. et al. **Caracterização Físico-Química de Queijos Minas Artesanal Produzidos em Diferentes Microrregiões de Minas Gerais.** Viçosa: Revista Brasileira de Economia Doméstica, v. 24, n. 2, p. 185-196, 2013. Disponível em: <https://periodicos.ufv.br/oikos/article/viewFile/3679/1951>, acesso em 05 nov. 2019.

ROSSI, E. A. et al. Effects of a novel fermented soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 74, p. 209-16, 2000.

SANTIS, Valéria B. G. de. **Queijo Minas padrão com baixo teor de sódio e gordura: caracterização físico-química e sensorial.** 67f. Dissertação de Mestrado – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

SILVA, P. H. F. et al. Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos. **Revista Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 50, p. 15-29, 1995.

SILVA, L. F. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de búfala.** Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2010

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; MAGALHÃES, F. A. R. et al . Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.**, v. 380, n. 66, p. 16-22, 2011.

SOUSA, M. J; ARDO, Y; MCSWEENEY, P. L. H. Advance in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barkin, v. 11, p. 327-345, ago, 2001.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção de qualidade do leite**. 3. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2008.

VON WRIGHT, A., Genus *Lactococcus*. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A. (Eds.). **Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects**. Fourth Edition, Revised and Expanded. CRC Press, USA, p. 63-76. 2012

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Boletim do Leite**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 661, p. 1-8, 1983.