



(21) PI 1101014-2 A2



(22) Data do Depósito: 24/03/2011

(43) Data da Publicação: 03/01/2017

(54) Título: APLICAÇÃO DE PROTEASE MICROBIANA NO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO

(51) Int. Cl.: C12N 9/58; A23C 19/032

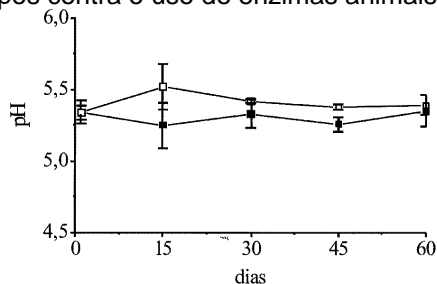
(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO", FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP

(72) Inventor(es): ROBERTO DA SILVA; CAROLINA MERHEB DINI; ELENI GOMES

(74) Procurador(es): LEOPOLDO CAMPOS ZUANETI

(57) Resumo: AP|\_|cAçãO DE PRo'rEAsE M|cRoB|ANA No PRocEsso DE FABR|cAçãO DE Queuo. A presente invenção descreve o processo de obtenção e o uso de uma protease 5 fúngica obtida por fermentação na produção de queijo, especificamente a Thermomucor sp., particularmente Thermomucor indicae-seudaticae, em substituição ao coalho. A enzima pode ser ti\* T usada para a elaboração de qualquer tipo de queijo que seja obtido através de coagulação enzimática como, por exemplo, o minas 1o i frescal|imussarela, meia cura, prato, provolone, parmesão etc. Por se tratar de uma enzima microbiana, algumas vantagens devem ser teni s r n Wsalientadas:

wconstantewdtisponibilidadeí \*baixo custo 'devido \* à \* " I A î ~ e e=\* JHpfossilidreardreídioeus~ozd~eç=suibstr atos~=bairatos=\*para=fe~rmeenta~ção;"\* maior" ' t aceitação entre pessoas contrárias à ingestão de produtos contendo 15 derivados de animais sacrificados e maior apoio por princípios s \_\_\_\_ í \_\_\_\_ =i \_\_\_\_ ..;.. \_\_\_\_ ..-.. \_\_\_\_ . \_\_\_\_ - \_\_\_\_ . \_\_\_\_ v religiosos e éticos de grupos contra o uso de enzimas animais.



Tempo (dias)	pH (Grupo 1)	pH (Grupo 2)
0	5,4	5,4
15	5,5	5,3
30	5,4	5,3
45	5,4	5,3
60	5,4	5,4

## “APLICAÇÃO DE PROTEASE MICROBIANA NO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO”

Trata o presente relatório descritivo da patente de invenção de uma inédita tecnologia envolvendo a aplicação de protease no processo de fabricação de queijo, e mais especificamente o uso da protease de *Thermomucor sp.*, particularmente *Thermomucor indicae-seudaticae* em substituição ao coalho.

O coalho é a principal enzima utilizada na produção de queijos. Ele é tradicionalmente obtido do 4º estômago de bezerros em lactação. Entretanto, devido a escassez de matéria prima, alto preço e crescimento da produção mundial de queijo, houve um aumento na busca por substitutos desse agente, sem acarretar prejuízo da qualidade do produto. Um substituto adequado deve possuir intensa atividade coagulante e baixa atividade proteolítica para não comprometer o rendimento do queijo, seu aroma e sabor. A presente tecnologia descreve o uso de uma protease fúngica obtida por fermentação na produção de queijo prato, substituindo o coalho. A enzima pode ser usada para a elaboração de qualquer tipo de queijo que seja obtido através de coagulação enzimática como, por exemplo, o minas frescal, mussarela, meia cura. Por se tratar de uma enzima microbiana, algumas vantagens devem ser salientadas: constante disponibilidade, baixo custo devido à possibilidade do uso de substratos baratos para fermentação, maior aceitação entre pessoas contrárias à ingestão de produtos contendo derivados de animais sacrificados e maior apoio por princípios religiosos e éticos de grupos contra o uso de enzimas animais.

Os coalhos produzidos no Brasil são processados a partir de estômagos de bovinos adultos, que apresentam elevadíssimos teores de pepsina bovina. Esta enzima

apresenta baixa especificidade e é bastante proteolítica o que, em condições favoráveis, pode acarretar em hidrólise excessiva das caseínas do leite, diminuindo o rendimento do queijo e causando amargor no produto. Atualmente existem relatos na literatura de vários possíveis substitutos do coalho, de origem animal, vegetal e microbiana, porém, nem sempre o padrão de ação destas proteases sobre a caseína é esclarecido e com isso restam dúvidas sobre o perfil hidrolítico e o real potencial para aplicação industrial dessas enzimas como coagulantes. A presente tecnologia obteve sucesso no uso de um substituto microbiano no processo de produção de queijo prato, na etapa de coagulação enzimática das caseínas do leite. Existem alguns substitutos de origem microbiana já disponíveis no mercado como as enzimas obtidas de *Rhizomucor miehi* (Hannilase, Chr-Hansen; Fromase, DSM Food Specialties), *Cryphonectria (Endothia) parasitica* (Suparen, DMS Food Specialties), *Aspergillus niger* (Chymogen – quimosina recombinante, desenvolvida por Genencor International e comercializada pela Chr-Hansen), *Escherichia coli* (Chy-Max – quimosina recombinante, desenvolvida pela Pfizer e comercializada pela Chr-Hansen) e *Kluyveromyces lactis* (Maxiren – quimosina recombinante, DSM Food Specialties). Embora esses coagulantes microbianos já sejam comercializados por multinacionais, o uso de novas enzimas capazes de exibir alta atividade coagulante e baixa atividade proteolítica ainda é uma importante área de investigação científica, principalmente tendo em vista o desenvolvimento de biotecnologia nacional, daí a importância da presente tecnologia.

Um grande problema envolvendo o coalho é o fato de que o abate de bezerras diminuiu há muito tempo. Houve uma queda no abate de 8 milhões de cabeças em 1960 para 2 milhões em

1973 nos Estados Unidos, o que além de provocar escassez do coalho de bezerro também acabou encarecendo esse agente. Além disso, preocupações éticas associadas com a produção de coalhos de tais animais também têm levado à busca por substitutos.

5 Aliado à escassez do coalho, de acordo com dados divulgados pela Embrapa Gado de Leite, houve um aumento de 17% na produção mundial de queijos de 2000 a 2008, sendo que no Brasil houve um aumento de 43%. Os dados também mostram que entre os anos de 1991 a 2004 notou-se um aumento no total da  
10 produção de queijos no Brasil de 180%, sendo os queijos Mussarela e Prato os mais importantes, cujas produções aumentaram 141% e 131%, respectivamente. Dentre os queijos obtidos por coagulação enzimática, além da Mussarela e do Prato, tem-se o Minas Frescal, cuja produção também aumentou em cerca de 93%. Assim, percebe-  
15 se que os queijos têm um papel econômico muito importante no mundo e no Brasil e ainda que a produção de queijos obtidos por coagulação enzimática tende a continuar crescendo, ou seja, a demanda por coagulantes é crescente.

Em testes preliminares realizados em  
20 laboratório, encontrou-se um fungo isolado pelo nosso grupo, o *Thermomucor indicae-seudaticae*, que produziu uma protease com capacidade de hidrolisar especificamente a caseína do leite. Isso nos levou a desenvolver estudos com essa enzima visando sua aplicação na produção de queijos e obtivemos resultados muito satisfatórios.

25 Como é do conhecimento dos técnicos no assunto, existem vários produtos utilizados na fabricação de queijos. Todavia, não é conhecido método algum de produção de queijos que utilize protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* em substituição ao coalho.

## ESTADO DA TÉCNICA

O documento de patente PI 0417391-0 depositado em 17/12/2004 intitulado *produto de laticínio, método para produzir produto de laticínio, e, uso de ácido hialurônico e um*  
5 *segundo agente texturizador* descreve um método para melhorar as propriedades de textura de produtos de laticínio com o uso de uma combinação de ácido hialurônico e um segundo agente texturizador para produzir os produtos de laticínio, e produtos de laticínio compreendendo ácido hialurônico e um segundo agente texturizador.

10 O documento de patente PI 0606433-7 depositado em 06/01/2006 intitulado *bactérias do ácido láctico resistentes a bacteriófagos* descreve uma bactéria do ácido láctico (LAB) em que uma proteína YjaE é essencialmente inativa e a LAB dessa maneira possui maior resistência a bacteriófagos, uma  
15 composição de cultura de partida que compreende a bactéria do ácido láctico e o uso desta cultura de partida para a produção de um alimento ou de um produto.

O documento de patente PI 9711341-7 depositado em 20/08/1997 intitulado *método de isolamento de uma*  
20 *bactéria do ácido láctico mutante, bactéria, métodos de produção de um produto alimentício e de um metabólito bacteriano e composição de cultura de partida bacteriana* ensina mutantes de bactérias do ácido láctico, incluindo a *Lactococcus lactis*, os quais são defectivos na produção de formiato-liase de piruvato e/ou em sua produção de  
25 desidrogenase de piruvato (Ldh) e métodos de isolamento de tais mutantes ou variantes são proporcionados. Os mutantes são úteis na produção de produtos alimentícios ou na fabricação de compostos tais como diacetila, acetoína e acetaldeído e como componentes de alimentos de culturas de partida.

O documento de patente PI 0213474-8 depositado em 03/10/2002 intitulado *processo para a produção de coalho de queijo, e, queijo* ensina um processo para a produção de um coalho de queijo em um rendimento elevado por meio do qual  
5 pode ser evitada a reação da enzima coaguladora de leite devido à reação da proteína do leite com transglutaminase. A saber, um método de obtenção de um coalho de queijo que compreende as etapas de manter um leite inicial em uma tal temperatura baixa que a proteína de leite não sofreria coagulação devido à enzima  
10 coaguladora do leite; adicionar a proteína coaguladora de leite no mesmo no estado acima para desta maneira tratar o leite com a enzima coaguladora de leite; depois adicionar transglutaminase; e elevar a temperatura para deste modo tratar o leite com a transglutaminase; ou simultaneamente adicionar a enzima  
15 coaguladora de leite e transglutaminase no leite na temperatura baixa; manter a mistura na temperatura por um período de tempo definido para deste modo tratar o leite principalmente com a enzima coaguladora de leite; depois elevar a temperatura para tratar o leite com a transglutaminase, coagulando desta maneira o leite; cortar o  
20 leite assim coagulado; e separar o soro de leite.

O documento de patente PI 8307081-8 depositado em 22/12/1983 intitulado *processo para tratamento de coalho microbial, processo para produzir queijo, coalho microbial e queijo* ensina a produção de coalho microbial por técnicas de ADN  
25 recombinante e seu uso na fabricação de queijo. O coalho microbial produzido em forma refrátil é reativado por sua sujeição a condições fortemente desnaturantes e sulfitólise, para quebrar as ligações de dissulfeto e introduzir grupos sulfonato; a proteína sulfonada é então submetida a condições fracamente desnaturantes para redobrá-la, e

as ligações de dissulfeto são recriadas.

O documento de patente PI 0603980-4 depositado em 28/09/2006 intitulado *processo para a produção de uma composição flavorizante, e, produto de fermentação tipo queijo cremoso com baixo teor de gordura* ensina a fabricação de produtos de queijo melhorados com um sistema flavorizante natural, biogerado. O sistema flavorizante natural descrito aqui poderá ser utilizado com vários tipos de queijo e de produtos de laticínios. Em uma realização, o sistema poderá ser usado na produção de queijo fresco ou de queijo cremoso com flavorizante melhorado. Em outra realização, o sistema poderá ser usado na produção de produtos de queijo com baixo teor de gordura, tais como queijo cremoso com baixo teor de gordura.

#### BREVE DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA

Esta invenção refere-se inicialmente ao processo de obtenção, produto e uso de uma protease microbiana, *Thermomucor sp.*, particularmente *Thermomucor indiciae-seudaticae*, na fabricação de queijos. O processo de obtenção compreende no mínimo as seguintes etapas:

- esterilização de farelo de trigo;
- adição de inóculo (suspensão micelial) ao farelo de trigo, mantendo-se a umidade inicial, sendo o inóculo *Thermomucor sp.*, particularmente *Thermomucor indiciae-seudaticae*;
- incubação da mistura;
- extração enzimática da mistura.

Ainda, o processo de extração enzimática a ser realizado compreendendo no mínimo as seguintes etapas:

- adição de água destilada ou de solução tampão à mistura, com ou sem agitação;
- filtração e centrifugação do produto obtido na

etapa anterior, com separação do sobrenadante;

- submissão ou não do sobrenadante obtido na etapa anterior, agora extrato enzimático bruto, a processo de ultrafiltração.

## 5 DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é o modelo de sub-micelas, sendo dita micela composta por sub-micelas (1), cadeia peptídica saliente (2) e fosfato de cálcio (3).

10 Figura 2. Evolução do teor de acidez dos queijos fabricados com coagulante comercial (■) e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* (□) durante a maturação.

Figura 3. Evolução do pH dos queijos fabricados com coagulante comercial (■) e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* (□) durante a maturação.

15 Figura 4. Evolução do índice de extensão da maturação (IEM) dos queijos fabricados com coagulante comercial (■) e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* (□) durante a maturação.

20 Figura 5. Evolução do índice de profundidade da maturação (IPM) dos queijos fabricados com coagulante comercial (■) e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* (□) durante a maturação.

25 Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (URÉIA-PAGE) da caseína. (A): perfil eletroforético do leite (L), do caseinato de sódio bovino (NaCN) e dos primeiros dias de maturação do queijos Prato (H1 e T1). (B): perfil de degradação da caseína dos queijos Prato durante 60 dias de maturação. H representa os queijos produzidos com coagulante comercial e T os queijos produzidos com o coagulante do *T. indicae-seudaticae*.



## DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

Microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas devido a sua ampla diversidade bioquímica, a sua susceptibilidade genética, por apresentarem rápido crescimento e pelo fato de, em geral, seus substratos para crescimento serem relativamente baratos (TUBESHA; AL-DELAIFY, 2003; YU; CHOU, 2005). Fungos têm sido amplamente empregados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico como as enzimas. Geralmente as enzimas produzidas por fungos são extracelulares, o que facilita o processo de recuperação do meio de fermentação. (GERMANO *et al.*, 2003).

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, pois são utilizadas nas indústrias de detergente, cerveja, carne, couro e de laticínios, representando aproximadamente 60% do mercado total de enzimas (KUMAR *et al.*, 2005).

Uma importante aplicação das proteases é no setor de laticínios. O primeiro passo da fabricação de queijos envolve a desestabilização das caseínas do leite por enzimas proteolíticas coagulantes. A fração  $\kappa$ -caseína desempenha um importante papel na estabilização da micela de caseína. A renina, também denominada de quimosina, presente nos coalhos de bezerros e ruminantes, é capaz de partir a cadeia de amino ácidos da  $\kappa$ -caseína especificamente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). As duas partes resultantes desta divisão são a para- $\kappa$ -caseína insolúvel (resíduos de amino ácidos 1 a 105) que permanece associada à micela de caseína e um peptídeo solúvel (glicomacropéptido; resíduos 106 a 148). No segundo passo, agora não enzimático, sem a ação estabilizadora da  $\kappa$ -caseína, a estrutura micelar residual (frações alfa, beta e para- $\kappa$ -

caseína) precipita na presença de cálcio, formando o coágulo (CHITPINITYOL; CRABBE, 1997).

Assim renina é a principal enzima utilizada na produção de queijos (D'AMBROSIO et al., 2003; KUMAR *et al.*, 2005).

5 Ela é tradicionalmente obtida do 4º estômago de bezerros em lactação. Entretanto, devido à escassez de matéria prima, alto preço e crescimento da produção mundial de queijo, houve um aumento na busca por substitutos sem prejudicar a qualidade do produto final (NELSON, 1975; SARDINAS, 1968; CAVALCANTI *et al.*, 2005; 10 KUMAR et al., 2005). Um substituto adequado deve possuir intensa atividade coagulante e baixa atividade proteolítica para minimizar a dissolução do coágulo (HASHEM, 1999). Substitutos de coalho de bezerro têm sido buscados entre outros animais, plantas e microrganismos desde o começo do século (SARDINAS, 1968).

15 A literatura traz vários estudos relacionados à procura de proteases de origem microbiana (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010; NOUANI et al. 2009; DUTT et al., 2009; SHIEH; THI; SHIH, 2009; TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003; SHATA, 2005; KUMAR et al., 2005; HASHEM, 1999; CAVALCANTI et al., 2004; YU; CHOU, 20 2005; SRINIVASAN et al., 1964; ARIMA; YU; IWASAKI, 1970; FERNANDEZ-LAHOURE et al., 1999; ABDEL-FATTAH; MABROUK; EL-HAWWARY, 1972; POZA et al., 2003; EL-BENDARY; MOHARAM, ALI, 2007; PREETHA; BOOPATHY, 1997), animal (D'AMBROSIO et al., 2003; MOSCHOPOULOU et al., 2006; KUMAR et al., 2006) e de 25 plantas (BRUNO, et al., 2010; NOUANI et al., 2009; SENTHILKUMAR; RAMASAMY; SUBRAMANIAN, 2006; RAPOSO; DOMINGOS, 2008; VAIRO-CAVALLI et al., 2005; LLORENTE; BRUTTI; CAFFINI, 2004; SILVA; MALCATA, 2005) que possam ser aplicadas na indústria de laticínios para coagulação do leite. Entretanto, um substituto de

origem microbiana seria mais interessante tendo em vista sua constante disponibilidade, baixo custo devido à possibilidade do uso de substratos baratos para fermentação (YU; CHOU, 2005), ter maior aceitação entre pessoas contrárias à ingestão de produtos contendo derivados de animais sacrificados (SARDINAS, 1968) e maior apoio por princípios religiosos e éticos de grupos contra o uso de enzimas animais (TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003). De acordo com Sardinas (1968), os microrganismos têm sido pesquisados desde 1960 como potenciais fontes de substitutos de coalho de bezerro; porém, as reninas obtidas destes microrganismos têm se mostrado inadequadas para produção de queijos por uma série de razões como geração de off-flavors e problemas de textura, produção demasiada de ácidos, e por exibirem proteólise excessiva. Assim, esses substitutos continuam sendo motivo de pesquisas ao redor do mundo.

15

### **Coagulação do leite**

Uma importante aplicação de proteases é na produção de queijos. O leite é uma emulsão de gorduras em água estabilizada por uma dispersão coloidal de proteína. Durante a fabricação de queijos, é necessário provocar a desestabilização dessas proteínas para que ocorra a formação do coágulo.

20

As caseínas são fosfoproteínas insolúveis em pH 4,6 e existem no leite na forma micelar. A micela é uma complexa formação de várias unidades de caseínas que podem ser subdivididas nas seguintes classes:  $\alpha$ - ( $\alpha_{s1}$  e  $\alpha_{s2}$ ),  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\kappa$ -caseínas, sendo que a  $\gamma$ -caseína resulta da proteólise da  $\beta$ -caseína (ROBINSON; WILBEY, 1998). As frações  $\alpha_{s1}$  contêm de 7 a 9 resíduos fosfato-serina por mol, a  $\alpha_{s2}$  de 10 a 13 e a  $\beta$  5. Estes resíduos são concentrados em “clusters” e são responsáveis pela existência de áreas hidrofílicas com forte carga negativa. Devido à presença de fósforo nas frações  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$

25

e  $\beta$ , elas se ligam fortemente ao cálcio e precipitam. Entretanto, a  $\kappa$ -caseína, que possui apenas um resíduo fosfato por mol, é solúvel em altas  $[\text{Ca}^{2+}]$  e, por interagir hidrofobicamente com as frações  $\alpha$  e  $\beta$ , consegue estabilizá-las contra a precipitação (LAW, 1997). A fração  $\kappa$  também difere da  $\alpha$  e  $\beta$  por conter uma região glicosilada, composta por três monossacarídeos (galactose, N-acetil-galactosamina ou ácido N-acetil neuramínico), formando tri ou tetrassacarídeos, ligados aos resíduos treonil 131, 133, 135 ou 136 (SGARBIERI, 2005). O fosfato de cálcio e as  $\alpha$ - e  $\beta$ -caseínas são unidos pelo envolvimento dos resíduos fosfato-serina na estrutura do fosfato de cálcio. Uma explicação muito utilizada para descrever a estrutura da micela é a de que a  $\kappa$ -caseína estaria localizada próximo à superfície da micela com a ligação  $\text{Phe}_{105} - \text{Met}_{106}$ , sensível à quimosina, projetando-se a partir dela. A parte hidrofóbica da molécula da  $\kappa$ -caseína estaria atada ao núcleo da micela, composto por sub-micelas, enquanto que o glicomacropéptido hidrofílico formaria uma camada de filamentos altamente hidratados, que estariam projetados para a fase aquosa. Esses filamentos seriam responsáveis pela estabilização estérica das micelas de caseína (VARNAM; SUTHERLAND, 2001). Vários modelos têm sido propostos para descrevê-la e uma figura bastante didática seria a apresentada por Walstra (1999) (Figura 1) para o modelo de sub-micelas, que representa a micela da maneira como descrito acima, sendo dita micela composta por sub-micelas (1), cadeia peptídica saliente (2) e fosfato de cálcio (3).

25 A desestabilização da estrutura micelar das caseínas do leite, por enzimas proteolíticas coagulantes, é o primeiro passo para a fabricação de queijos obtidos por coagulação enzimática. Uma importante característica da fração caseína no

processo de fabricação de queijos é que a enzima quimosina é capaz de clivar sua cadeia de aminoácidos especificamente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). As duas partes resultantes são a para-k-caseína insolúvel (resíduos de aminoácidos de 1 a 105) que permanece associada à micela de caseína e um peptídeo solúvel (glicomacropéptido; resíduos 106 a 169) (ROBINSON; WILBEY, 1998). Com isso, a para-k-caseína não mais estabiliza a estrutura micelar e as frações alfa e beta podem precipitar, na presença de cálcio, formando o coágulo, que expulsa o soro por sinérese (NAGODAWITHANA; REED, 1993). O cálcio ajuda na coagulação por criar condições isoelétricas e por agir como uma ponte entre as micelas.

### **Maturação de queijos**

As primeiras 24 horas que seguem após a coagulação do leite são as mais importantes para a bioquímica da maturação do queijo. Durante este período, a temperatura do queijo diminui, em relação à temperatura relativamente alta da etapa de coagulação (aproximadamente 35 °C), para a baixa temperatura da etapa de maturação (aproximadamente 12 °C); temperaturas ótimas para desenvolvimento de atividade proteolítica pelas enzimas coagulantes se situam nesse intervalo. Alterações na micela de caseínas continuam ocorrendo durante as fases iniciais de maturação. A micela é compactada, perde-se água ao mesmo tempo em que glóbulos de gordura são englobados e comprimidos. Esses fatores são determinantes para a estrutura e composição do produto final (SILVA; MALCATA, 2004). Se a degradação das caseínas resultar na formação de peptídeos com aminoácidos hidrofóbicos na extremidade N-terminal, haverá produção de sabor amargo, principalmente se a formação desses peptídeos for mais rápida do que sua hidrólise,

realizada pelas peptidases de culturas lácticas (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

Algumas variedades de queijos, principalmente os obtidos por coagulação ácida (cottage, ricota) são consumidos frescos, entretanto que a maioria dos queijos obtidos por coagulação enzimática são maturados por períodos de tempo variando de 2 semanas (mussarela), 4 semanas (gorgonzola), 6 meses (parmesão) e a um ou mais anos (Parmigiano-Reggiano, Cheddar extra-maturado). Durante a maturação, várias mudanças químicas e bioquímicas ocorrem envolvendo os principais constituintes do queijo como as proteínas, os lipídeos e a lactose residual, que são degradados a produtos primários e posteriormente a produtos secundários. Alguns desses produtos inclui peptídeos, aminoácidos, ácidos, aminas, tióis, tioésteres – originados de proteínas; ácidos graxos, metilcetonas, lactonas e ésteres – originados de lipídeos; ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico), dióxido de carbono, ésteres e alcoóis – originados da lactose. Na combinação correta, esses compostos são responsáveis pelo flavor dos queijos (FOX, 1989; McSWEENEY, 2004).

Os principais agentes proteolíticos envolvidos na maturação de queijos são o coalho residual; enzimas naturais do leite, como a plasmina; as bactérias do fermento láctico (cultivo iniciador) e suas enzimas, que são liberadas após lise celular; as bactérias contaminantes, que não são do fermento láctico, representadas pelos organismos que sobreviveram à pasteurização do leite ou que tiveram acesso ao leite pasteurizado ou ao coágulo durante a fabricação do queijo e que, com a morte celular, liberam enzimas (FOX, 1989).

Os produtos liberados após ação dos agentes

proteolíticos podem ser usados como índices de proteólise, ou seja, a presença deles no queijo indica ação enzimática. Dessa forma têm-se os índices de proteólise:

- Índice de Extensão da Maturação, representado pela presença de peptídeos de peso molecular alto/intermediário que foram produzidos devido à ação do coalho residual, proteases do fermento e da plasmina sobre a caseína. Esses peptídeos são solúveis em pH 4,6 e portanto se diferenciam da caseína, que é insolúvel. Assim o IEM é medido pela dosagem de nitrogênio dos compostos solúveis após precipitação isoeletrica da caseína (pH 4,6), denominado nitrogênio não caseico (NNC), e é relacionado com o conteúdo de nitrogênio total (NT).

- Índice de Profundidade da Maturação, representado pela presença de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres que foram produzidos devido à ação de peptidases do fermento láctico e da flora contaminante sobre os peptídeos de peso molecular alto/intermediário. Esses peptídeos menores e os aminoácidos livres são solúveis em TCA 12%, ácido que precipita proteínas, e portanto se diferenciam dos peptídeos maiores, que são insolúveis. Assim o IPM é medido pela dosagem de nitrogênio dos compostos solúveis após precipitação com TCA 12%, denominado nitrogênio não protéico (NNP), e é relacionado com o conteúdo de nitrogênio total (NT).

Portanto a proteólise em queijos pode ser monitorada quantitativamente explorando-se diversas técnicas como solubilização de proteínas em diferentes solventes; determinação de grupos funcionais liberados; técnicas de cromatografia e eletroforese (FOX, 1989) no intuito de detectar e quantificar os produtos de degradação e expressar o nível de maturação do queijo.

## Coalhos

De acordo com Folegatti (1994), coalho é definido como o extrato de abomaso de animais ruminantes, que contém proteases aspárticas, com atividade coagulante sobre o leite.

5 As demais proteases de outras origens, que também apresentam capacidade de coagular o leite sob condições adequadas, são denominadas coagulantes.

O coalho proveniente do abomaso de bezerros contém aproximadamente 80% de quimosina e 20% de pepsina  
10 bovina. Quando o coalho é extraído de animais adultos, esta proporção se inverte, ou seja, há predominância de pepsina em detrimento da quimosina (FOLEGATTI, 1994). Devido à sua especificidade pela ligação Phe105-Met106 da  $\kappa$ -caseína, a quimosina se mostra mais adequada para utilização na coagulação do leite e  
15 produção de queijos do que a pepsina, que apresenta ação proteolítica generalizada (VISSER, 1993), colocando em risco o rendimento e flavor do queijo.

A Tabela 1 mostra a quantidade de queijos produzidos no mundo onde observamos um aumento de 17% na  
20 produção de 2000 a 2008 sendo que no Brasil houve um aumento de 43%. A Tabela 2 mostra a quantidade de queijos produzidos no Brasil de 1991 a 2004. É possível notar que houve um aumento no total da produção de 180%, sendo os queijos Mussarela e Prato os mais importantes, cujas produções aumentaram 141% e 131%,  
25 respectivamente. Dentre os queijos obtidos por coagulação enzimática, além da Mussarela e do Prato, tem-se o Minas Frescal, cuja produção também aumentou em cerca de 93%. Assim, percebe-se que os queijos têm um papel econômico muito importante no mundo e no Brasil e ainda que a produção de queijos obtidos por



coagulação enzimática tende a continuar crescendo, ou seja, a demanda por coagulantes é crescente.

**Tabela 1.** Produção mundial de queijos (milhares de toneladas).

Países	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008*
AMÉRICA									
NORTE									
Canadá	328	329	350	342	345	352	291	297	300
Estados Unidos	3.746	3.747	3.877	3.882	4.025	4.150	4.325	4.389	4.461
México	134	140	145	126	134	143	145	147	150
AMÉRICA DO SUL									
Argentina	445	440	370	325	370	400	480	475	515
Brasil	445	460	470	460	470	495	528	580	640
UNIÃO EUROPEIA									
EX – URSS									
Rússia	220	260	340	335	350	375	405	420	430
Ucrânia	67	105	129	169	224	274	217	243	260
ÁFRICA									
Argélia	n.d.	n.d.	4	13	13	13	13	n.d.	n.d.
Egito	380	395	410	450	455	460	462	n.d.	n.d.
ÁSIA									
Coréia do Sul	15	20	20	23	24	24	28	30	32
Filipinas	n.d.	n.d.	1	6	6	5	6	7	7
Taiwan	n.d.	n.d.	n.d.	14	17	16	18	20	20
Japão	34	34	36	35	35	39	40	41	47
OCEANIA									
Austrália	373	374	413	368	389	375	362	360	335
Nova Zelândia	297	281	312	301	305	297	292	308	329
TOTAL	12.345	12.450	12.870	13.054	13.643	14.043	14.413	14.187	14.501

\* Previsão

\*\* União Européia é composta por 27 países

Fonte: USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Atualizado em abril/ 2008.

**Tabela 2.** Produção brasileira de queijo (toneladas).

<b>Tipo de queijo</b>	<b>1991</b>	<b>1995</b>	<b>2000</b>	<b>2004</b>
<b>COMMODITIES</b>				
Mussarela	60.000	84.180	125.000	144.690
Prato	44.200	59.400	88.500	102.480
Requeijão culinário	6.970	41.000	70.200	90.720
Sub Total	111.170	184.580	283.700	337.890
<b>FUNDIDOS</b>				
Fatias	1.500	1.900	3.500	4.400
Porções	1.480	1.700	2.400	3.045
Tablete	63	78	102	114
Cremosos	485 <sup>***</sup>	570	800	820
Sub Total	3.528	4.248	6.802	8.379
<b>PROCESSADOS</b>				
Cream cheese	485	570	1.417	1.815
Requeijão cremoso	9.350	19.000	26.700	30.907
Petit suisse	14.314	14.427	20.800	22.932
Sub Total	24.149	33.997	48.917	55.654
<b>FRESCOS (massa crua)</b>				
Minas frescal	14.900	19.086	25.900	28.875
Cottage	80	175	350	578
Ricota	4.125	5.582	7.523	8.610
Sub Total	19.455	26.193	36.673	42.578
<b>TOTAL</b>	<b>158.302</b>	<b>249.018</b>	<b>376.092</b>	<b>444.501</b>

Fonte: SIPA/ABIQ/DATAMARK/DESK RESEARCH

Aliado a isso, temos que o abate de bezerros diminuiu há muito tempo, como já mostrava Nelson (1975) em seu estudo sobre o impacto de novos coagulantes na tecnologia de queijos. O autor apontou uma queda no abate de 8 milhões de cabeças em 1960 para 2 milhões em 1973 nos Estados Unidos, o que além de provocar escassez do coalho de bezerro também acaba

encarecendo esse agente. Além disso, preocupações éticas associadas com a produção de coalhos de tais animais também têm levado à busca por substitutos (SOUZA; ARDÖ; MCSWEENEY, 2001). Como previsto por Nelson (1975), apesar de algumas  
5 preparações alternativas de coagulantes apresentarem desempenho satisfatório, seu uso tem gerado questões intrigantes, as quais vêm estimulando a pesquisa nesta área há muito tempo.

Dentre as proteases coagulantes microbianas, as obtidas de *Rhizomucor miehi* (Hannilase, CHR Hansen; Fromase,  
10 DSM Food Specialties), *Cryphonectria (Endothia) parasitica* (Suparen, DMS Food Specialties), *Aspergillus niger* (Chymogen – quimosina recombinante, desenvolvida por Genencor International e comercializada pela CHR Hansen), *Escherichia coli* (Chy-Max – quimosina recombinante, desenvolvida pela Pfizer e comercializada  
15 pela CHR Hansen) e *Kluyveromyces lactis* (Maxiren – quimosina recombinante, DSM Food Specialties) têm substituído a quimosina em processos comerciais. Embora esses coagulantes microbianos já sejam comercializados por multinacionais, o isolamento de novas culturas que produzam enzimas capazes de exibir altos valores para a  
20 razão entre as atividades coagulante e proteolítica ainda é uma importante área de investigação científica, principalmente tendo em vista o desenvolvimento de biotecnologia nacional.

A literatura traz alguns relatos de sucesso na tentativa de encontrar substitutos de renina produzidos por fungos  
25 como *Endothia parasitica* (SARDINAS, 1968), *Mucor pusillus* var. Lindt (ARIMA; YU; IWASAKI, 1970), *Penicillium citrinum* (ABDEL-FATTAH; MABROUK; EL-HAWWARY, 1972), *Mucor pusillus* (KHAN; BLAIN; PATTERSON, 1979; NOUANI et al., 2009), *Rhizomucor miehi* NRRL 3500 (PREETHA; BOOPATHY, 1997), *Aspergillus niger* MC4

(CHANNE; SHEWALE, 1998), *Mucor* sp. M-105 (FERNANDEZ-LAHOE et al., 1999), *Penicillium oxalicum* (HASHIM, 1999), *Mucor* (TUBESHA; AL-DELAIFY, 2003), *Amylomyces rouxii* (Yu; Chou, 2005), *Rhizopus oryzae* (KUMAR et al., 2005), *Aspergillus oryzae* (SHATA, 2005), *Mucor miehei* (SILVEIRA et al., 2005), *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010).

Porém, nem sempre o padrão de ação destas proteases sobre a caseína é esclarecido já que na maioria dos casos não são feitos estudos de aplicação tecnológica e com isso ficam dúvidas sobre o perfil hidrolítico e o real potencial para aplicação industrial dessas enzimas como coagulantes. Assim, este trabalho visou a aplicação da protease obtida de *Thermomucor indicae-seudaticae* no processo de produção de queijo Prato e, como este é um queijo maturado, e como o coagulante residual continua agindo sobre as proteínas durante a maturação estudaram-se as características físico-químicas do queijo durante os 60 dias que compreenderam esse período.

### Queijo Prato

Dos produtos lácteos fabricados no Brasil, o queijo é o mais tradicional (GOROSTIZA et al., 2004), absorvendo a maior fatia do leite produzido no país, e dentre os queijos, o tipo Prato é o segundo mais produzido (Tabela b). Este queijo faz parte do grupo de queijos comuns no Brasil, os quais possuem maior demanda pelos consumidores basicamente por poderem ser utilizados como ingredientes em pizzas, sanduíches e em pratos de massa (GOROSTIZA et al., 2004) além de poderem ser comidos diretamente como petisco ou num lanche da tarde.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Prato, defini-se o Queijo Prato como

o “queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulante apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas”. Ele é classificado como um queijo gordo (45 a 59,9% de gordura no extrato seco) e de  
5 média umidade (36 a 45,9%), de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Pode ser encontrado nas variedades Lanche, Cobocó e Bola, diferindo quanto ao formato e peso. Possui consistência semidura e elástica, textura compacta, lisa, fechada, com alguns olhos pequenos  
10 arredondados e/ou algumas olhadura mecânicas, cor amarelada, sabor e odor característicos, podendo ter crosta fina, lisa e sem trincas e algumas olhaduras pequenas, bem distribuídas (BRASIL, 1997).

As principais etapas de elaboração do queijo  
15 Prato envolvem a obtenção de uma massa semicozida, remoção parcial do soro, lavagem por adição de água quente, pré-prensagem, moldagem sob soro, prensagem, salga e maturação pelo tempo necessário para conseguir suas características específicas (SPADOTI et al., 2003a). O procedimento de lavagem da massa promove a  
20 delactosagem do grão, regulagem do pH e controle da acidificação. Conseqüentemente, os queijos apresentam sabor e textura suave (AUGUSTO, 2003). É na etapa de maturação que ocorrem os eventos lipolíticos, glicolíticos e proteolíticos responsáveis por contribuir para o desenvolvimento de propriedades peculiares do queijo Prato.

25 Exemplo de realização da invenção

O extrato enzimático de *Thermomucor indicae-seudaticae* para aplicação na produção dos queijos foi obtido realizando-se a fermentação em sacos de polipropileno. Utilizaram-se sacos com dimensões 15 x 26 cm com 10 g de farelo de trigo. Os

meios foram preparados, esterilizados (120<sup>0</sup>C/40min) e inoculados com 13,5 mL da suspensão micelial, obtendo-se 60% de umidade inicial, e foram incubados a 45<sup>0</sup> C por 24 horas. Para a extração enzimática, 80 mL de água destilada foram adicionados aos meios.

5 Os sacos foram agitados a 100 rpm / 30 minutos, o conteúdo foi filtrado e centrifugado a 30996 x g / 20 minutos. A solução obtida, denominada extrato enzimático bruto, foi concentrada por ultrafiltração em equipamento utilizando membrana de 10 kDa, congelada e posteriormente utilizada para os ensaios de aplicação.

10 Os queijos foram fabricados a partir de 15 L de leite pasteurizado tipo B (Laticínio Saboroso, São José do Rio Preto-SP), de acordo com o método de Silva (1998), em recipientes de aço inox, com a utilização dos seguintes coadjuvantes técnicos: coagulante: para a coagulação do leite utilizou-se coagulante  
15 comercial Ha-la, fornecido pela Chr Hansen (Processo H) e o extrato enzimático do *T. indicae-seudaticae* (Processo T); a quantidade das enzimas adicionadas foi padronizada pelo tempo de coagulação de aproximadamente 45 minutos; corante: foram utilizados 1,05 mL de corante vegetal comercial extraído do urucum; cultura lática: foram  
20 utilizados 12 mL de cultura lática: *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (LL50 A); cloreto de cálcio: foram utilizados 7,5 ml de cloreto de cálcio em solução a 50%; ácido sórbico: foi utilizada solução de ácido sórbico (1,8 g em 90 ml de água destilada), fornecido pela Clariant S.A., como conservante, conforme  
25 permitido pela legislação; cloreto de sódio: a salmoura foi preparada com cloreto de sódio comercial em concentração de 18%, seguida de pasteurização por 72<sup>0</sup>C por 4 minutos. Em seguida foi resfriada e filtrada em dessorador e o pH ajustado para 5,2.

Foram realizados dois processos, um utilizando

coagulante comercial que foi usado como controle e outro substituindo o coagulante comercial pela protease coagulante de *Thermomucor indicae-seudaticae*. Duas réplicas foram realizadas, A e B, com lotes diferentes de leite integral tipo B e um queijo produzido com cada tipo de coagulante foi tomado ao acaso para as análises com 1, 15, 30, 45 e 60 dias de fabricação, totalizando 20 queijos. Os queijos foram triturados e homogeneizados para realização das análises de caracterização físico-química.

O rendimento de cada queijo (controle e com protease coagulante) foi estimado em litros de leite necessários para a elaboração de um quilo de queijo (L/kg) (NEVES-SOUZA; SILVA, 2005).

Para caracterização das amostras de queijos foram realizadas as seguintes análises físico-químicas, em triplicata: gordura pelo método de Gerber-Van Gulik (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985); acidez por titulação com NaOH 0,1 N (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985); umidade por secagem em estufa a vácuo a 70°C/24 h (CASE et al., 1985); cinzas por incineração em mufla a 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985); sal (SERRES; AMARIGLIO; PETRANSXIENE, 1973); o pH foi medido através de leitura em pHmetro (SILVA et al., 1997). Para avaliação da proteólise, o teor de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de micro – Kjeldahl. O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o valor de NT por 6,38 (AOAC, 1997). O teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS) foi determinado pela dosagem do nitrogênio total no filtrado obtido após a precipitação isoelétrica das caseínas (SILVA et al., 1997). O teor de nitrogênio não protéico (NNP) foi determinado pela dosagem de nitrogênio total no filtrado obtido após precipitação das proteínas em presença de ácido tricloroacético (TCA) 12% (SILVA et al., 1997).

Os índices de extensão da maturação (IEM) e de profundidade da maturação (IPM) foram expressos como porcentagem do nitrogênio total da seguinte maneira: %IEM =  $NNC/NT \times 100$  e %IPM =  $NNP/NT \times 100$ , respectivamente (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

5 Para estabelecer diferenças estatísticas entre os valores dos parâmetros estudados de acordo com o tipo de coagulante utilizado, o tempo de maturação e a interação entre esses dois fatores, os dados foram avaliados através do programa ESTAT (Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0, Departamento de  
10 Ciências Exatas, UNESP, Jaboticabal), abrangendo a análise descritiva dos dados pela análise de variância do teste F e comparação de médias pelo teste de Tuckey ( $p < 0,05$ ).

A proteólise dos queijos maturados também foi monitorada como descrito por Shalabi; Fox (1987) da seguinte  
15 maneira: 20 mg de cada amostra de queijo foi incubada em 0,4 mL de tampão Tris-HCl 0,062 M pH 6,7 contendo 42% de uréia (p/v) a 37°C por 1 hora. Ao final desse período foram adicionados 10  $\mu$ L de  $\beta$ -  
mercaptoetanol e incubou-se novamente por mais 45 minutos e finalmente adicionou-se uma gota de azul de bromofenol e glicerina.  
20 Essas amostras tratadas foram então submetidas à eletroforese utilizando um sistema vertical Mini Protean 3 Cell (Bio Rad). A UREA-PAGE foi realizada a voltagem constante de 80V utilizando Tris-glicina 0,046 M pH 6,7 como tampão de corrida. Os géis foram corados overnight com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorados com  
25 solução de metanol/ácido acético/água 3:1:6.

Foram feitos dois processamentos, um utilizando um coagulante comercial e outro utilizando a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae*. Conforme exposto anteriormente utilizou-se sacos de polipropileno com 10 g de farelo de trigo para



produzir o extrato a ser usado na produção dos queijos. Após a fermentação, 1.116 mL de extrato enzimático, com 76 U/mL de atividade coagulante, foi concentrado por ultrafiltração em equipamento utilizando membrana de 10 kDa, para 112 mL com 668  
5 U/mL de atividade coagulante.

A quantidade das enzimas adicionadas para coagular o leite foi padronizada pelo tempo de coagulação de aproximadamente 45 minutos.

O rendimento das produções foi de 9,89 L de  
10 leite necessários para elaborar 1 kg de queijo com o coagulante comercial e de 10,46 L de leite necessários para elaborar 1 kg de queijo com o coagulante do *Thermomucor*, ou seja, para produzir queijo Prato com o coagulante do *Thermomucor* é necessário um pouco mais de leite.

15 Na Tabela 3 é apresentada a composição dos queijos fabricados com coagulante comercial (H) e com a protease de *T. indiciae-seudaticae* (T) durante a maturação.

Os dados apresentados na Tabela 3 mostram uma composição típica de queijo Prato maturado que, em média, é  
20 composto por umidade (42 a 46%), gordura (25 a 29%), sal (1,6 a 1,9%) e proteína (23 a 25%) (GUTIERREZ et al., 2004; SPADOTI et al., 2003a; BALDINI, 1998; BRASIL, 1997), indicando que a produção de queijo Prato com o coagulante do *Thermomucor* pode ser bem executada sob as condições convencionais de fabricação.

25 A Tabela 3 apresenta ainda os resultados da caracterização físico-química dos queijos durante o período de maturação: queijos fabricados com coagulante comercial (H) e com a protease de *T. indiciae-seudaticae* (T) durante a maturação.

Tabela 3

Análises	Processos	Dias de Maturação				
		1	15	30	45	60
Acidez (%)	H	0,60 ± 0,05 <sup>Ac</sup>	1,05 ± 0,15 <sup>Ab</sup>	1,12 ± 0,13 <sup>Ab</sup>	1,38 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	1,55 ± 0,17 <sup>Aa</sup>
	T	0,70 ± 0,05 <sup>Be</sup>	1,13 ± 0,04 <sup>Ad</sup>	1,26 ± 0,04 <sup>Bc</sup>	1,56 ± 0,08 <sup>Bb</sup>	1,78 ± 0,08 <sup>Ba</sup>
pH	H	5,34 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	5,25 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	5,33 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	5,26 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	5,35 ± 0,11 <sup>Aa</sup>
	T	5,34 ± 0,08 <sup>Ab</sup>	5,52 ± 0,16 <sup>Ba</sup>	5,42 ± 0,01 <sup>Aab</sup>	5,38 ± 0,02 <sup>Bab</sup>	5,39 ± 0,07 <sup>Aab</sup>
Proteína Total (%)	H	23,92 ± 1,56 <sup>Aa</sup>	24,29 ± 0,70 <sup>Aa</sup>	25,49 ± 1,15 <sup>Aa</sup>	24,69 ± 0,97 <sup>Aa</sup>	24,95 ± 1,52 <sup>Aa</sup>
	T	25,16 ± 1,80 <sup>Aa</sup>	25,33 ± 0,49 <sup>Aa</sup>	26,64 ± 1,52 <sup>Aa</sup>	26,57 ± 1,36 <sup>Ba</sup>	25,83 ± 0,98 <sup>Aa</sup>
IEM (%)	H	7,28 ± 2,51 <sup>Ac</sup>	14,11 ± 4,45 <sup>Abc</sup>	18,45 ± 1,91 <sup>Aab</sup>	20,25 ± 5,02 <sup>Aab</sup>	23,75 ± 6,88 <sup>Aa</sup>
	T	8,45 ± 1,87 <sup>Ab</sup>	17,25 ± 4,73 <sup>Aa</sup>	18,16 ± 5,33 <sup>Aa</sup>	20,80 ± 3,90 <sup>Aa</sup>	24,24 ± 4,85 <sup>Aa</sup>
IPM (%)	H	2,88 ± 0,82 <sup>Ad</sup>	6,34 ± 1,40 <sup>AcD</sup>	8,86 ± 1,36 <sup>Abc</sup>	11,35 ± 2,63 <sup>Aab</sup>	13,05 ± 3,14 <sup>Aa</sup>
	T	3,78 ± 0,77 <sup>Ac</sup>	8,01 ± 2,22 <sup>Abc</sup>	10,79 ± 2,61 <sup>Aab</sup>	11,90 ± 3,01 <sup>Aab</sup>	14,23 ± 3,42 <sup>Aab</sup>
Gordura (%)	H	25,92 ± 1,20 <sup>A</sup>				
	T	25,83 ± 1,69 <sup>A</sup>				
Umidade (%)	H	43,98 ± 1,04 <sup>A</sup>				
	T	42,47 ± 0,82 <sup>B</sup>				
Cinzas (%)	H	4,34 ± 0,13 <sup>B</sup>				
	T	4,60 ± 0,14 <sup>A</sup>				
Sal (%)	H	1,9 ± 0,00 <sup>A</sup>				
	T	2,1 ± 0,00 <sup>B</sup>				

<sup>A, B</sup> Letras iguais na mesma coluna, para as mesmas análises, não diferem significativamente entre si

( $p > 0,05$ ); <sup>a, b, c, letras d, e</sup> letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

5

O teor de umidade dos queijos de ambos os

processos, 43,98% para o queijo fabricado com coagulante comercial e 42,47% para o queijo fabricado com coagulante do *Thermomucor*, estão de acordo com a legislação que classifica o queijo Prato como de média umidade (36 a 46%) (BRASIL, 1997). Apesar de muito  
5 similares, a umidade do queijo fabricado com coagulante comercial foi significativamente maior que a do queijo fabricado com coagulante do Thermomucor. A variação do teor de umidade em um mesmo lote pode estar relacionada à variações decorrentes da prensagem coletiva dos queijos, ou seja, quando os queijos são prensados uns  
10 sobre os outros, como foi o nosso caso, os que ficam em baixo recebem maior pressão e por isso são mais desidratados (GARCIA et al., 2009). No intuito de contornar esse erro, os queijos são invertidos após 30 minutos da primeira prensagem. Além disso, apesar da padronização da etapa da drenagem do soro, pode ter sido removido  
15 quantidades diferentes de soro afetando o conteúdo de umidade dos queijos do dois processos e também pode ter ocorrido falta de uniformidade na distribuição da massa nas formas, prejudicando a saída do soro (GARCIA et al., 2009). Valores similares de umidade em queijo Prato também foram encontrados por Spadoti; Dornellas;  
20 Roig (2005) (45,11% com 10 dias de estocagem), por Cichoscki et al. (2002) (41,91% com 7 dias de estocagem), por Moretti; Nabuco; Penna (2004) (42,27% com 3 dias de estocagem).

O queijo Prato integral é classificado como gordo por apresentar de 26 a 29% de gordura (GARCIA et al., 2009).  
25 Os teores de gordura dos queijos foram de aproximadamente 26% e não diferiram significativamente. Valores similares de gordura em queijo Prato também foram encontrados por Spadoti et al. (2003b) (25,2% com 10 dias de estocagem), por Narimatsu et al. (2003) (24,89% com 10 dias de estocagem), por Spadoti; Dornellas; Roig

(2005) (25,30% com 10 dias de estocagem) ao utilizarem coalho de vitelo (90% quimosina). Já Baldini (1998) e Folegatti (1994) encontraram valores superiores de gordura, 31,87% com 1 dia de maturação e 30,46% com 6 dias de maturação, respectivamente, ao utilizarem coalho bovino (80% pepsina e 20% quimosina). Esses resultados mostram que provavelmente o tipo de coalho utilizado influencia o teor de gordura do queijo.

De acordo com Checchi (1999) o conteúdo de cinzas em produtos lácteos varia de 0,7 a 6,0%. Os teores de cinzas dos queijos foram de 4,34%  $\pm$  0,13 para o processo com coagulante do Thermomucor e 4,60%  $\pm$  0,14 para o processo com coagulante comercial (Tabela 4), sendo que este teor foi significativamente maior. Estes valores são um pouco superiores aos reportados por Baldini (1998) de 3,72% com 1 dia de maturação, por Narimatsu et al. (2003) de 3,73% com 10 dias de estocagem.

A Figura 2 mostra que houve um aumento da acidez para os queijos de ambos os processamentos durante os 60 dias de maturação, provavelmente devido ao acúmulo de produtos de degradação da lactose como o ácido lático e outros ácidos voláteis (NAGARAJA et al., 1979). O perfil da evolução da acidez foi similar para ambos os queijos, apesar de os teores serem significativamente maiores para aquele fabricado com o coagulante de *T. indiciae-seudaticae*, com exceção do 15º dia, onde não há diferença entre os dois processamentos (Tabela 4). Aumento contínuo da acidez durante a maturação também foi observado no trabalho de El-Tanboly; El-Hofi; Ismail (2000) para queijos Gouda fabricados tanto com coagulante comercial (Ha-la) quanto microbiano (*Mucor miehei* NRRL 3169) e no trabalho de Cichoscki et al. (2002) ao estudar 60 dias de maturação do queijo Prato produzido com coalho animal. No trabalho de

Narimatsu et al. (2003) também foi observado aumento da acidez durante os 45 dias analisados de maturação no queijo Prato fabricado com coalho de vitelo.

De acordo com as Figuras 2 e 3, observa-se  
5 que a diminuição nos valores de pH para os processamentos está relacionado à fermentação da lactose do queijo conforme mencionado acima, o que é importante para prevenir crescimento de bactérias patogênicas. Além disso, a variação do pH ao longo da maturação também depende da capacidade tamponante do queijo, devido à  
10 quantidade de proteínas e sais minerais presentes (Narimatsu et al., 2003), à formação de  $\text{NH}_3$  e/ou ao catabolismo do ácido láctico (FOX, 1989).

A Figura 4 mostra a evolução do Índice de Extensão da Maturação (IEM) dos queijos, representada pela  
15 presença de peptídeos de peso molecular alto/intermediário que foram produzidos devido à ação das enzimas residuais do coalho, proteases do fermento e da plasmina sobre a caseína. Portanto, este é um índice importante para a avaliação do comportamento do coalho na maturação dos queijos (FOLEGATTI, 1994).

20 Observa-se na Figura 4 que houve um aumento do índice para ambos os processos sendo que não houve diferença significativa entre eles durante toda a maturação (Tabela 3) mostrando que a ação de ambos coagulantes foi similar nos sistemas de queijos analisados. Aumento deste índice durante a maturação de  
25 queijo Prato também foi observado por Garcia et al. (2009), Folegatti (1994), Moretti; Nabuco; Penna (2004), Narimatsu et al. (2003), Gorostiza et al. (2004), Baldini (1998).

A Figura 5 mostra a evolução do Índice de Profundidade da Maturação (IPM) dos queijos, representado pela

presença de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres que foram produzidos devido à ação de peptidases do fermento láctico e da flora contaminante sobre os peptídeos de peso molecular alto/intermediário.

5 Observa-se na Figura 5 que houve um aumento do índice para ambos os processos sendo que não houve diferença significativa entre eles durante toda a maturação (Tabela 3) mostrando que a ação das peptidases do fermento e da flora contaminante foi similar nos sistemas de queijos analisados. Aumento  
10 deste índice durante a maturação de queijo Prato também foi observado por Garcia et al. (2009), Folegatti (1994), Moretti; Nabuco; Penna (2004), Narimatsu et al. (2003), Gorostiza et al. (2004), Baldini (1998).

A quimosina residual rapidamente hidrolisa a  
15  $\alpha$ s1-caseína na ligação Phe23-Phe24 durante os estágios iniciais da maturação, resultando na formação do grande peptídeo  $\alpha$ s1-CN f24-199 ( $\alpha$ s1-I-caseína) e no pequeno  $\alpha$ s1-CN f1-23. A hidrólise dessa única ligação causa uma mudança rápida na textura borrachenta de queijo Cheddar em um produto mais homogêneo e suave  
20 (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987; SINGH; DRAKE; CADWALLADER, 2003). Como o IEM não foi significativamente diferente para os queijos produzidos com cada coagulante em nosso estudo, esperava-se um perfil de hidrólise similar da  $\alpha$ s1-caseína nesses queijos, porém isso não foi observado como mostra a  
25 eletroforese na Figura 6B.

A plasmina atua na hidrólise da  $\beta$ -caseína resultando na formação de 3  $\gamma$ -caseínas [  $\gamma$ 1- ( $\beta$ -CN f29-209),  $\gamma$ 2-( $\beta$ -CN f106-209) e  $\gamma$ 3-( $\beta$ -CN f108-209)], representando a região C-terminal e de 5 proteose-peptonas, representando a região N-terminal

(SINGH; DRAKE; CADWALLADER, 2003), afetando o IEM. De acordo com Singh; Drake; Cadwallader (2003), as  $\gamma$ -caseínas parecem acumular em queijo Cheddar durante a maturação, o que também ocorre no queijo Prato como mostra a eletroforese na Figura 6B, mas  
5 as proteose-peptonas são extensivamente hidrolisadas pelas peptidases e proteinases associadas ao envelope celular das culturas iniciadoras a pequenos peptídeos e aminoácidos livres, afetando do IPM.

No queijo Cheddar, o peptídeo  $\alpha$ s1-CN f1-23 é  
10 posteriormente hidrolisado por proteinases de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* em peptídeos menores, que apresentaram sabor amargo (SINGH; DRAKE; CADWALLADER, 2003). Como o queijo Prato também é produzido com essa espécie de cultura iniciadora, é provável que essa hidrólise também ocorra, afetando o IPM.

15 Assim, os IEM e IPM no queijo Prato são essencialmente afetados pela quimosina residual, plasmina e pelas enzimas proteolíticas das bactérias ácido-lácticas.

A proteólise também foi analisada por um método freqüentemente utilizado para monitorar processos  
20 proteolíticos de caseínas: eletroforese em gel de uréia-poliacrilamida, que possibilita a visualização da integridade das frações de caseína durante a maturação (Figura 6).

Na Figura 6A, dois grandes grupos de caseínas foram identificados no URÉIA-PAGE:  $\alpha$ s1-caseína, com maior  
25 mobilidade e b-caseína, com menor mobilidade eletroforética (SILVA; MALCATA, 2004). Observa-se também a região da família  $\alpha$ s2-caseína, cujas mobilidades eletroforéticas se situam entre as caseínas  $\alpha$ s1 e b (SGARBIERI, 2005).

A Figura 6B mostra a degradação das caseínas

dos queijos produzidos com o coagulante comercial (H1 a H60) e com o coagulante do *T. indiciae-seudaticae* (T1 a T60) durante os 60 dias de maturação. Nota-se uma suave degradação da as1-caseína, mais acentuada para os queijos produzidos com coagulante comercial, mostrando que a quebra das moléculas de caseína é específica para o tipo de coagulante utilizado (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987). Essa preferência está de acordo com a literatura, pois sabe-se que a quimosina residual no queijo ataca a fração as1- durante o período inicial de maturação formando um peptídeo maior (as1 f24-199 ou as1- I-caseína) que é relativamente resistente à hidrólise posterior (BALDINI, 1998) e outro menor (as1 f1-23) e que a fração b permanece mais estável (SILVA; MALCATA, 2004). Apesar desta maior estabilidade, a fração b também é degradada como mostra a presença de seus produtos de hidrólise, as frações  $\gamma$  (BALDINI, 1998; SILVA; MALCATA, 2004). A estrutura primária da  $\beta$ -caseína é susceptível à hidrólise pela protease plasmina, nas ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos 28-29, 105-106, e 107-108, produzindo os fragmentos peptídicos  $\gamma$  (FOX, 1989; SGARBIERI, 2005). A plasmina é um dos agentes responsáveis pela proteólise durante a maturação de queijos atuando principalmente no início da maturação juntamente com o coalho residual, liberando peptídeos que servirão de substrato para as enzimas do fermento e da flora contaminante (FOX, 1989; VISSER, 1993; BALDINI, 1998). Além da plasmina, a quimosina também age na  $\beta$ -caseína, na ligação Leu192-Tyr193 (VISSER, 1993).

Percebe-se na Figura 6B que a fração as2 também é degradada, de maneira similar para ambos os queijos. De acordo com Grappin; Rank; Olson (1985) essa fração é bastante resistente à quimosina e sua degradação estaria relacionada à



plasmina, cujos substratos preferidos são as frações  $\alpha_2$  e b (BALDINI, 1998).

Resultados similares de maior degradação da  $\alpha_1$ -caseína e menor degradação da b-caseína também foram encontrados por Folegatti (1994).

Em todas as variedades de queijos, a  $\alpha_1$ -caseína é o alvo principal para proteólise em queijos produzidos com coalhos comerciais e os coalhos são até selecionados com base na baixa atividade sobre a  $\beta$ -caseína (FOX, 1989). Proteases de origem microbiana são investigadas como substitutos adequados da renina na produção de queijos, mas geralmente apresentam alta atividade proteolítica que resulta em sabor amargo em queijos maturados, produzido principalmente pela ação do coagulante residual sobre seqüências altamente hidrofóbicas da caseína, inicialmente da fração b-, levando à formação de peptídeos extremamente hidrofóbicos, cujo acúmulo provoca amargor (SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001). Assim, o perfil similar de hidrólise da  $\beta$ -caseína nos queijos produzidos com ambos coagulantes sugere ação proteolítica satisfatória do coagulante do *Thermomucor*.

Dentre as principais características afetadas pela proteólise que ocorre durante a maturação do queijo Prato estão os índices de proteólise (IEM e IPM), a capacidade de derretimento e as propriedades de textura. Os resultados obtidos para esses parâmetros durante os 60 dias de maturação para os queijos produzidos com o coagulante do *Thermomucor indiciae-seudaticae* não diferiram significativamente dos obtidos para os queijos produzidos com o coagulante comercial. Além disso, o perfil de hidrólise das caseínas visualizado na URÉIA-PAGE mostrou-se gradual e ao mesmo tempo suave. Portanto, sugere-se que a

produção de queijo Prato com o coagulante do *Thermomucor indiciae-seudaticae* pode ser bem executada sob as condições convencionais de fabricação resultando num produto de boa qualidade tecnológica.

5 Não se tem conhecimento de nenhuma aplicação da protease de *Thermomucor indiciae-seudaticae* no processo de fabricação de queijo que reúna conjuntamente, todas as características construtivas e funcionais acima relatadas, e que diretamente ou indiretamente, é ou foi tão efetivo quanto a protease objeto da presente patente.

10 Tendo sido descrita e ilustrada a presente invenção, é para ser compreendido que a mesma pode sofrer inúmeras modificações e variações em sua forma de realização, desde que tais modificações e variações não se afastem a partir do espírito e escopo da invenção, tal como definido no quadro  
15 reivindicatório.

## REIVINDICAÇÕES

**1 – PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PROTEASE MICROBIANA** caracterizado por compreender no mínimo as seguintes etapas:

- 5 - esterilização de farelo de trigo em temperatura entre 110 e 120 °C por no mínimo 30 minutos;
- adição de inoculo (suspensão micelial) ao farelo de trigo em concentração entre 9 e 13 % em massa, mantendo-se entre 55 e 70% de umidade inicial;
- 10 - incubação da mistura em temperatura entre 40 e 50 °C por no mínimo 24 horas;
- extração enzimática da mistura.

**2 – PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PROTEASE MICROBIANA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do processo de extração enzimática ser realizado compreendendo no mínimo as seguintes etapas:

- adição de água destilada ou de solução tampão à mistura, com ou sem agitação;
- filtração e centrifugação do produto obtido na etapa anterior, com separação do sobrenadante;
- 20 - submissão ou não do sobrenadante obtido na etapa anterior, agora extrato enzimático bruto, a processo de ultrafiltração.

**3 – PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PROTEASE MICROBIANA**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato dos inoculados adicionados (suspensão micelial) serem compostos por *Thermomucor sp.*, particularmente *Thermomucor indicae-seudaticae*.

**4 – PROTEASE MICROBIANA** caracterizada

por ser obtida de acordo com as reivindicações 1 a 3.

**5 – PROTEASE MICROBIANA**, de acordo com as reivindicações 1, 3 e 4, caracterizada pelo fato dos inoculados adicionados (suspensão micelial) serem compostos por *Thermomucor* sp., particularmente *Thermomucor indicae-seudaticae*.

**6 – USO DA PROTEASE MICROBIANA**, de acordo com as reivindicações 4 e 5, caracterizado por sua aplicação no processo de fabricação de queijos em substituição ao coalho.

**7 – PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO** caracterizado pelo fato de ser utilizada protease microbiana, obtida de acordo com as reivindicações 1 a 6, em substituição ao coalho.

**8 – PRODUTO DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO** caracterizado por ser obtido de acordo com a reivindicação 7.

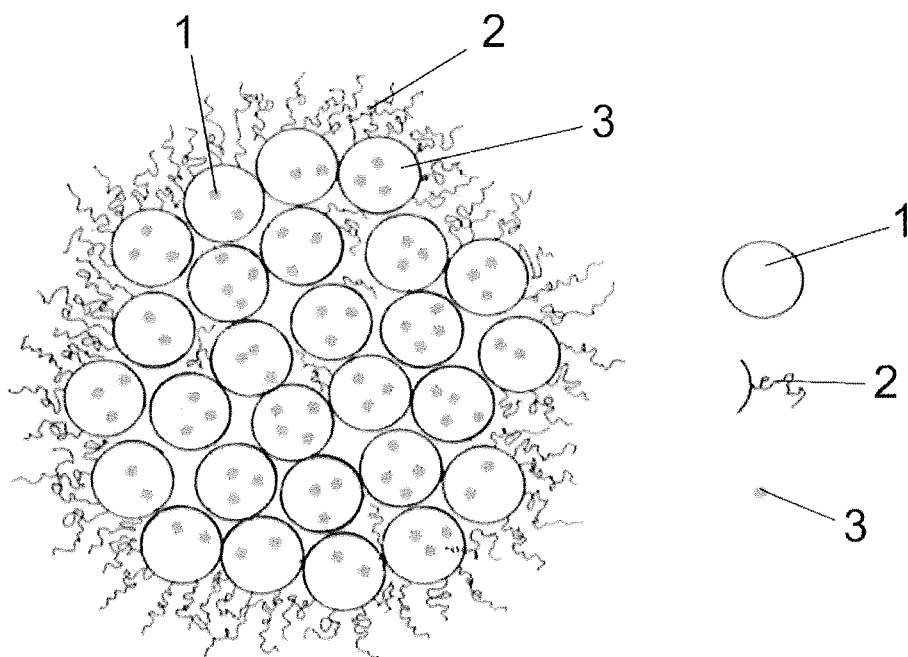


Fig. 1

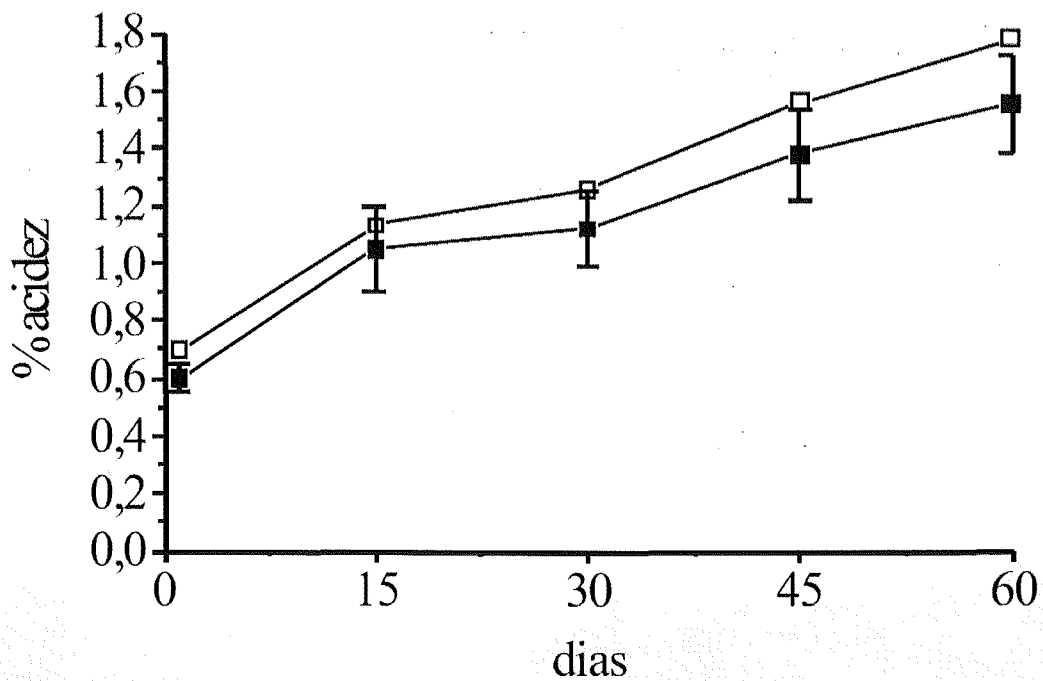


Fig. 2

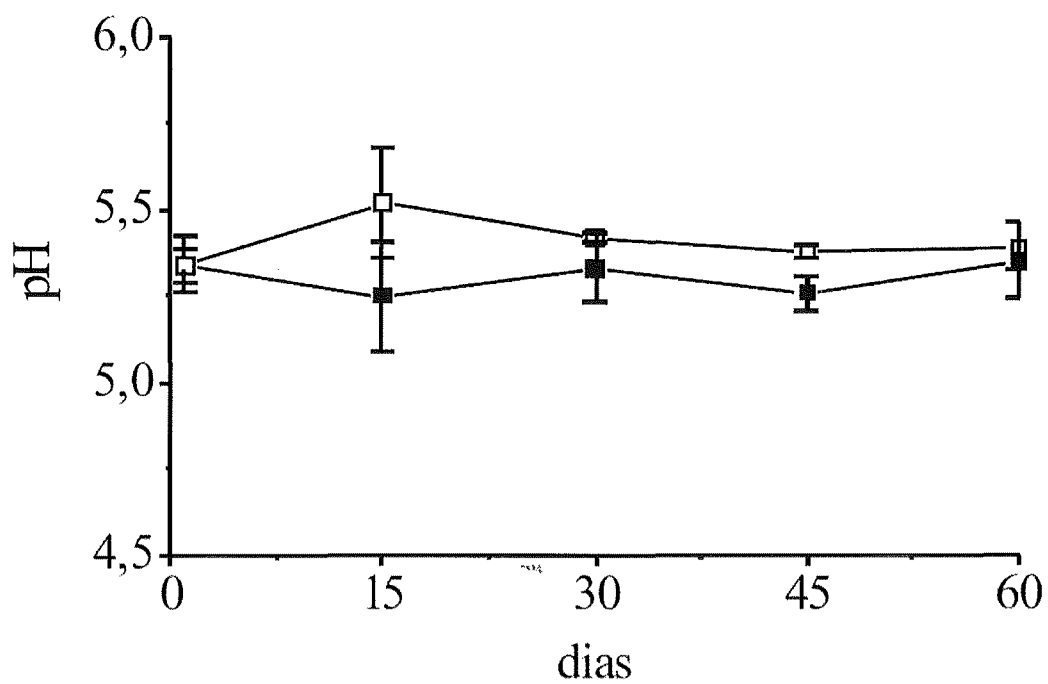


Fig. 3

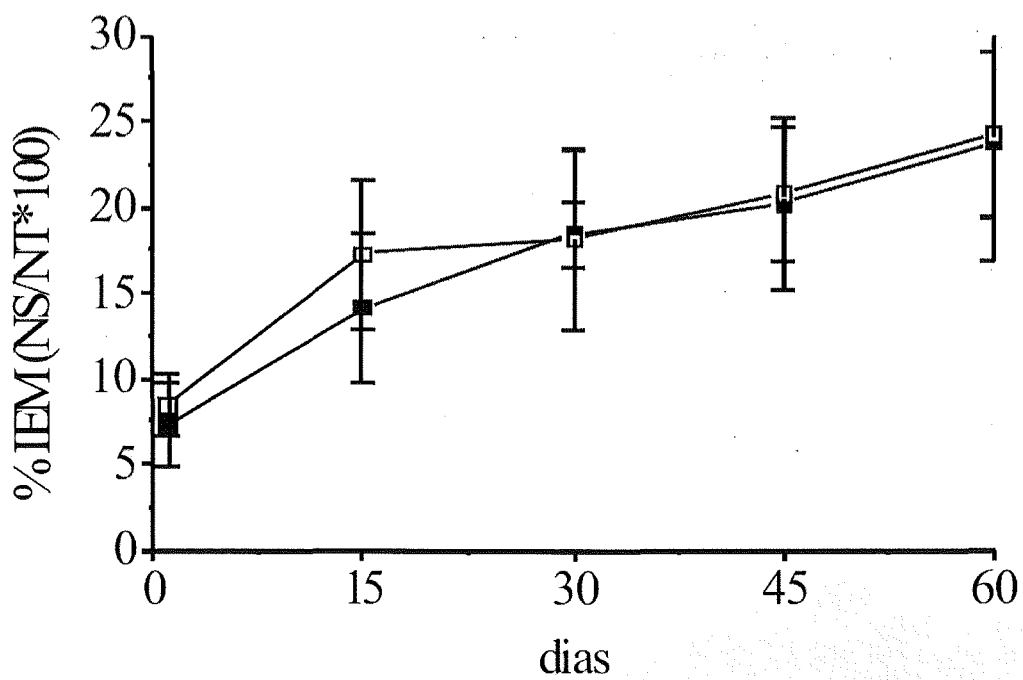
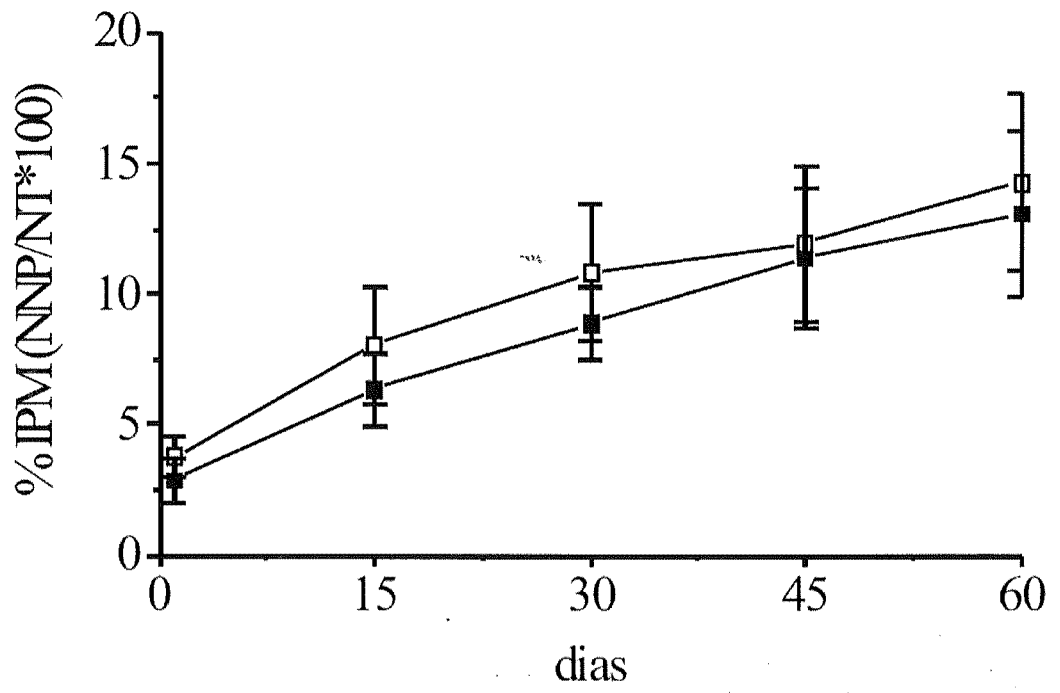


Fig. 4

*Fig. 5*

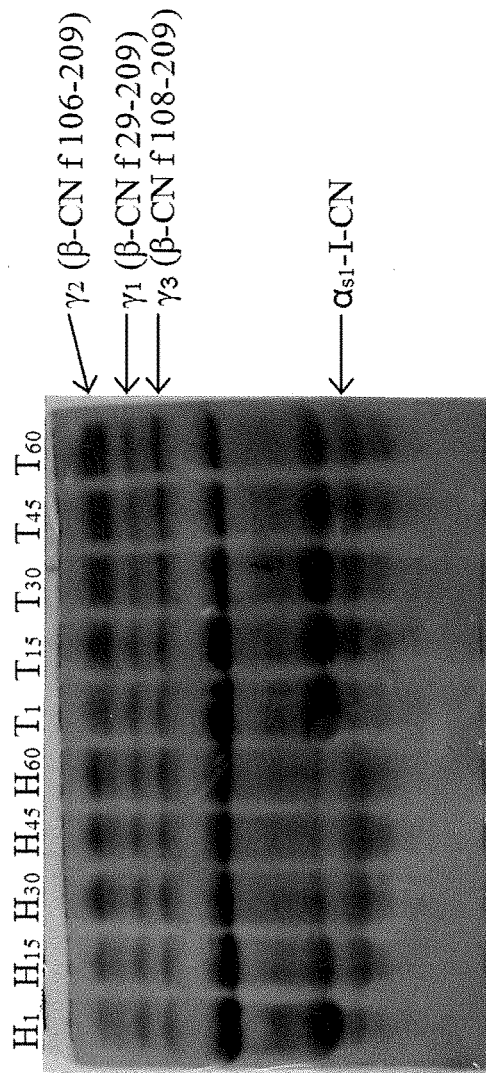


Fig. 6A

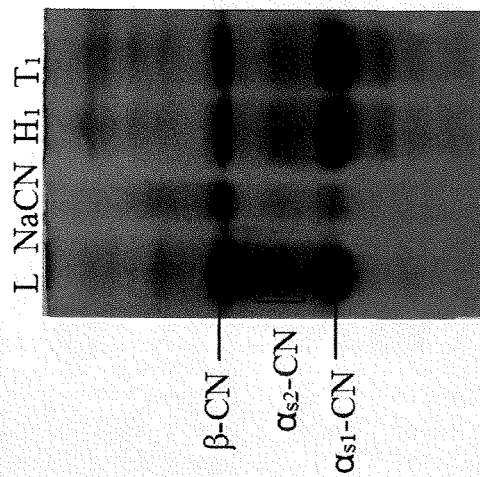


Fig. 6B



**RESUMO**

**Patente de invenção: “APLICAÇÃO DE PROTEASE MICROBIANA NO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO”.** A presente invenção descreve o processo de obtenção e o uso de uma protease

5 fúngica obtida por fermentação na produção de queijo, especificamente a *Thermomucor sp.*, particularmente *Thermomucor indicae-seudaticae*, em substituição ao coalho. A enzima pode ser usada para a elaboração de qualquer tipo de queijo que seja obtido

10 através de coagulação enzimática como, por exemplo, o minas frescal, mussarela, meia cura, prato, provolone, parmesão etc. Por se tratar de uma enzima microbiana, algumas vantagens devem ser salientadas: constante disponibilidade, baixo custo devido à

possibilidade do uso de substratos baratos para fermentação, maior aceitação entre pessoas contrárias à ingestão de produtos contendo

15 derivados de animais sacrificados e maior apoio por princípios religiosos e éticos de grupos contra o uso de enzimas animais.