

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

JUPYRACYARA JANDYRA DE CARVALHO BARROS

**Estudo *in situ* de culturas autóctones de *Lactobacillus helveticus* autolíticos sobre a
dinâmica bioquímica e sensorial do queijo Parmesão**

**São José do Rio Preto-SP
2009**

JUPYRACYARA JANDYRA DE CARVALHO BARROS

Estudo *in situ* de culturas autóctones de *Lactobacillus helveticus* autolíticos sobre a dinâmica bioquímica e sensorial do queijo Parmesão

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

**São José do Rio Preto - SP
2009**

Barros, Jupyrcyara Jandyra de Carvalho.

Estudo *in situ* de culturas autóctones de *Lactobacillus helveticus* autolíticos sobre a dinâmica bioquímica e sensorial do queijo Parmesão / Jupyrcyara Jandyra de Carvalho Barros. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2009.

106 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Queijo parmesão - Indústria. 3. *Lactobacillus helveticus*. 4. Queijo parmesão - Maturação. I. Penna, Ana Lúcia Barretto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 637.354.64

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Orientadora

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi
Universidade Federal de Uberlândia - UFU
Membro da Banca

Profa. Dra. Izildinha Moreno
Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL
Membro da Banca

Profa. Dra. Neuza Jorge
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Membro da Banca

Prof. Dr. Roger Darros Barbosa
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Membro da Banca

São José do Rio Preto - SP
2009

Este trabalho foi desenvolvido com o auxílio de profissionais qualificados de diferentes instituições.

O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

As culturas de *Lactobacillus helveticus* autóctones foram cedidas pela Prof. Dra. Daise Aparecida Rossi da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV - UFU).

Os queijos foram fabricados no Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, sob a orientação do Prof. Dr. Celso José de Moura.

As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA - UNESP).

O perfil eletroforético foi realizado no Laboratório de Bioquímica da UFU e Laboratório *Biogenetics*[®] - Uberlândia, sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro e Prof. MS. Gismar Vieira Silva, respectivamente.

Discentes do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (UNESP) participaram como provadores nos testes sensoriais.

As análises das frações voláteis foram realizadas no Laboratório de Química do Departamento de Química (UNESP), sob a orientação do Prof. Dr. Maurício Bóscolo.

A análise da microestrutura foi realizada no Laboratório de Microscopia e Microanálise (UNESP) sob a orientação do Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET), Prof. Dra. Lilian Ravazzi (Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV) e técnico Luis Roberto Faleiros Júnior (MET/MEV).

“Se você teve a oportunidade de conhecer este trabalho, possivelmente seja por dois motivos. Talvez, você seja uma das pessoas sábias de mente e coração que Deus, em sua infinita justiça e bondade, ofertou-me para inspirar-me na busca da minha evolução. Por outro lado, você utilize-o como consulta. De qualquer modo, desejo-lhe que as mesmas bênçãos que envolveram-me em cada momento na execução deste trabalho possam ser redobradas e direcionadas a você e a todos que lhe acompanham nesta caminhada. Tenha uma ótima leitura!”.

Dedico

Deus, Manoel Lopes e Joana Dalte

Caminhar sabendo que tudo fluirá em favor da nossa própria Evolução é uma das formas mais sábias de utilizar a mente. Oferecer ao próximo a oportunidade de ascensão é a atitude mais singela de quem está sempre Evoluindo. Grata pelos inúmeros gestos de abnegação, carinho e cumplicidade, sempre amparados pela Sabedoria Divina.
Amo vocês!

Ofereço

Alaurinda Cristiani, Amélia Sanches (*in memorian*)
Ana, Carlos Andrade, Carlos Eduardo, Carlos Henrique (*in memorian*), Eustáquio Antônio, Fabiana Almeida, João Eduardo, Jorge Luiz, Júlio César, Pedro, Roseâmely, Zenon.

Agradecimentos

Adriana Rodrigues Ribeiro (*in memorian*), Adriano Kultvak (*in memorian*), Adrielle Oliveira, Aline de Grandi, Aline Teodoro, Alysson Diniz, Amigos do Centro Espírita Francisco de Assis (CEFA, São José do Rio Preto), Amanda Rodrigues Ribeiro, Ana Lúcia Barretto Penna, Ana Paula Maciel, Ana Ribeiro, Analice Azevedo, Andaluza, André Nascentes, Andréa Rodrigues Ribeiro, Antônio Roberto di Marco, Aparecida Regina Diniz, Azrael, Caius Lucius, Carlos Henrique Carvalho, Carmélia Silva, Cássia Malacrida, Catharina Callochi, Célia Landi Franco, Celso José de Moura, Cláudia Ribeiro, Daise Aparecida Rossi, Daniel Cardoso, Débora, Demétrius, Denise Andreo, Denise Silva, Denise Soncini, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (IBILCE/UNESP), Departamento de Engenharia de Alimentos (UFG/Goiânia/GO), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (Universidade Federal de Santa Maria), Edison Luis Pinceli, Elfa Nattes Costa, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Fernanda Seixas, Fernando Leite Hoffmann, Francielle Marques, Franscesca Dutra, Francisco Fernandes dos Reis, Gilmar Toniolo, Ginaldo Vieira, Gismar Vieira, Gislaine de Oliveira Alves Paulino, Gleison Silva, Hélio Leonardo, Henrique Roitt. Janaína Reis, Jaqueline, João Cláudio Thoméo, João Jesuíno Demílio, José Onofre, Julyanna Andrade, Laboratório Biogenetics Tecnologia Molecular Ltda (UDI), Laboratório de Bioquímica (IBILCE/UNESP), Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO/UFU), Laboratório de Microscopia e Microanálise (IBILCE/UNESP), Laticínio Sonata (Votuporanga/SP), Laticínio Tirolez (Arapuá/MG), Larissa, Letícia Silva, Lidimara Caetano, Lilian Ravazzi, Liliane Pinheiro, Luana Bogno, Luciana Beatriz Carvalho, Lugiel, Luis Faleiros, Luiz Carlos Camolizi, Luiz Carlos Muniz, Luiz Fernando Moreira Izidoro, Marcel Campos, Márcio Roberto de Freitas, Maurício Bóscolo, Maria de Lourdes Rodrigues Ribeiro, Mieko Kimura, Narciso Silva, Neila Richards, Netinho, Neuza Jorge, Newton Mayer, Odécio Silva, Paulo Roberto dos Santos, Pedro Romanneli, Pedro Silva, Priscila Ângelo, Raquel Gutierrez, Renata Prado (*in memorian*), Rimar Diniz, Roberto da Silva, Roberto Diógenes, Roger Darros, Sabrina Casarotti Rodrigo Custódio, Ronaldo Rosa, Rosana Ferro, Roseli Francisco, Rosemar Brena, Salvador Ribeiro, Samir, Sebastiana Soares, Sebastião Taboga, Shirleny Romualdo, Silvia Kazama, Silvio Roberto Brandatte, Simara Pícoli, Sônia de Fátima, Sueli Gonçalves, Sulamita, Sofia, Tânia Gonçalves, Tharlisson Prado, Vania Batista, Vidiany Santos, Vera Lúcia Perussi, Vivyanne Melo.

O crescimento espiritual, humano e profissional será efetivado em sua plenitude, apenas se permitirmos a nós mesmos a troca de saberes. Sou grata pelo conhecimento adquirido e pelas vivências ofertadas. Desejo que a Essência de cada um de vocês possa fluir livremente; sobretudo, anseio que cada uma destas Essências Amigas, amparadas pela Centelha Divina, possam ser lançadas ao mundo, para inspirar novos ares.

Jupyracyara Jandyra de Carvalho Barros

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO GERAL.....	iv
GENERAL ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I - Aspectos tecnológicos e bioquímicos envolvidos na fabricação do queijo Parmesão.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	5
1. Introdução.....	6
2. Breve caracterização da variedade Parmesão.....	6
3. Aspectos tecnológicos da fabricação do queijo Parmesão.....	7
3.1 Microbiota oportunista como bioindicador da qualidade sanitária do queijo.....	9
3.2 Culturas lácticas e sua aplicabilidade na indústria queijeira.....	11
3.2.1 Mecanismo de ação da lactato desidrogenase (LDH) durante a lise de bactérias lácticas.....	13
3.3 Evolução dos componentes químicos no queijo Parmesão durante a estocagem..	15
3.3.1 Desenvolvimento do sabor e aroma lipolítico no queijo Parmesão.....	17
3.4. Análise da microestrutura de queijos por diagnóstico de imagens.....	18
3.5 Atributos sensoriais em queijos maturados.....	19
4. Considerações finais.....	21
5. Referências Bibliográficas.....	21
CAPÍTULO II - Avaliação do aspecto sanitário e microbiota láctica durante a maturação do queijo Parmesão.....	32
Sumário.....	33
Abstract.....	34
1. Introdução.....	35
2. Material e métodos.....	37
2.1 Viabilidade de bioindicadores de contaminação e lactobacilos termófilos no leite pasteurizado e queijo maturado.....	38
2.2 Análise estatística dos dados experimentais.....	40
3. Resultados e discussão.....	41
3.1 Qualidade sanitária do leite pasteurizado e do queijo Parmesão maturado.....	41

3.2 Viabilidade de lactobacilos termófilos durante o período de maturação do Parmesão.....	42
4. Conclusões.....	45
5. Referências Bibliográficas.....	46
CAPÍTULO III - Efeito de <i>Lactobacillus helveticus</i> autóctones com diferentes perfis autolíticos sobre a evolução dos componentes químicos no Parmesão maturado.....	50
Resumo.....	51
Abstract.....	52
1. Introdução.....	52
2. Material e métodos.....	54
2.1 Caracterização físico-química dos queijos.....	55
2.2 Atividade da lactato desidrogenase (LDH) como marcador da lise das culturas lácticas no queijo Parmesão	55
2.3 Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (<i>UREA - PAGE</i>).....	56
2.4 Análise estatística.....	56
3. Resultados e discussão.....	57
3.1 Análises físico-químicas do leite pasteurizado e do queijo Parmesão maturado.....	57
3.2 Evolução dos componentes químicos durante a proteólise do queijo Parmesão.....	61
3.3 Atividade da lactato desidrogenase no queijo Parmesão maturado.....	66
3.4 Proteólise da caseína como marcador da maturação do queijo Parmesão.....	67
4. Conclusões.....	71
5. Referências bibliográficas.....	72
CAPÍTULO IV - Compostos voláteis, perfil sensorial e análise da microestrutura do queijo Parmesão fabricado com <i>Lactobacillus helveticus</i> autóctones com diferentes perfis autolíticos	79
Resumo.....	80
Abstract.....	81
1. Introdução.....	82
2. Material e métodos.....	84
2.1 Perfil dos compostos voláteis.....	85
2.2 Avaliação sensorial.....	85
2.3 Análise qualitativa da microestrutura dos queijos maturados.....	86
2.4 Análise estatística.....	87
3. Resultados e discussão.....	88

3.1. Identificação de compostos voláteis.....	88
3.2. Perfil sensorial.....	91
3.3 Microestrutura.....	94
4. Conclusões.....	97
5. Referências bibliográficas.....	97
CONCLUSÃO GERAL.....	103
PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTES À TESE.....	104
1. Introdução.....	104
2. Trabalho aceito para publicação em periódico.....	104
3. Trabalhos submetidos à publicação em periódicos.....	104
4. Trabalhos apresentados em eventos científicos e publicados em anais	105
5. Resultados experimentais para futuras publicações.....	106

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II - Avaliação do aspecto sanitário e microbiota láctica durante a maturação do queijo Parmesão

- Figura 1. Fluxograma de fabricação do queijo Parmesão experimental..... 38
- Figura 2. Comportamento das culturas de lactobacilos termófilos nos queijos Parmesão A, Cc₁, D₁ e E₅ maturados a 18 °C durante 180 dias..... 44

CAPÍTULO III - Efeito de *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos sobre a evolução dos componentes químicos no queijo Parmesão maturado

- Figura 1. Evolução da acidez titulável (%) no queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias..... 62
- Figura 2. Evolução do teor de tirosina (mg.100g⁻¹) no queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias..... 63
- Figura 3. Evolução do teor de triptofano (mg.100g⁻¹) no queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias..... 64
- Figura 4. Evolução do índice de profundidade da maturação (%) no queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias..... 64
- Figura 5. Evolução do índice de extensão da maturação (%) no queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias..... 65
- Figura 6. Atividade da enzima LDH na matriz do queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias..... 66
- Figura 7. Microheterogeneidade das frações de caseína insolúveis em pH_{4,6} em gel UREA-PAGE obtida em queijo Parmesão fabricado com culturas A, Cc₁, D₁ e E₅ e maturado a 18 °C durante 180 dias. CN: caseína; Linha 1-6: Parmesão maturado por 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias; f*-*:clivagem indeterminada; 1P-9P: número de grupo fosfato..... 68

CAPÍTULO IV - Compostos voláteis, perfil sensorial e análise da microestrutura do queijo Parmesão fabricado com *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos

- Figura 1. Cromatograma das amostras de queijo Parmesão fabricado com as culturas de *Lactobacillus helveticus* A, Cc₁, D₁ e E₅, maturado a 18 °C por 60 dias..... 89
- Figura 2. Cromatograma das amostras de queijo Parmesão fabricado com as culturas de *Lactobacillus helveticus* A, Cc₁, D₁ e E₅, maturado a 18 °C por 120 dias..... 90
- Figura 3. Cromatograma das amostras de queijo Parmesão fabricado com as culturas de *Lactobacillus helveticus* A, Cc₁, D₁ e E₅, maturado a 18 °C por 180 dias..... 90
- Figura 4. Perfil sensorial de amostrass de queijo Parmesão fabricado com as culturas de *Lactobacillus helveticus* A, Cc₁, D₁ e E₅, maturado a 18 °C aos 180 dias..... 93

Figura 5 - Microestrutura do queijo Parmesão maturado a 18 °C (a, b - queijo Parmesão fabricado com a cultura A maturado por 30 (16.700x) e 60 dias (21.560x); c - queijo Parmesão fabricado com a cultura Cc₁ maturado por 60 dias (2.784x); d, f, g, i - queijo Parmesão fabricado com a cultura D₁ maturado por 90 (27.000x), 120 (7.750x), 150 (4.646x) e 180 dias (4.646x); e, h - queijo Parmesão fabricado com a cultura E₅ maturado por 90 (10.000x) e 150 dias (4.646x), respectivamente; B_a: bacilo; G: glóbulos de gordura; P: matriz protéica)..... 95

Figura 6 - Microestrutura do queijo Parmesão fabricado com a cultura autóctone E₅ e maturado a 18 °C (a - 30 dias 641x, setas: pontos de inserção dos glóbulos de gordura; b -30 dias 370x; c: 60 dias 648x; d - 60 dias 1.390x; e - 60 dias 1.090x; f - 60 dias 779x; Cr: cristais; G: glóbulos de gordura; P: matriz protéica)..... 96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - Avaliação do aspecto sanitário e microbiota láctica durante a maturação do queijo Parmesão

Tabela 1. Viabilidade e pH de <i>Lactobacillus helveticus</i> na cultura (LDR _{12%}) incubada a 42 °C por 16 horas, utilizada para fabricação do queijo Parmesão.....	43
---	----

CAPÍTULO III - Efeito de *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos sobre a evolução dos componentes químicos no queijo Parmesão maturado

Tabela 1. Características* físico-químicas do leite pasteurizado empregado no processamento do queijo Parmesão.....	57
Tabela 2. Caracterização* físico-química do queijo Parmesão fabricado com a cultura A e maturado a 18 °C durante 180 dias.....	58
Tabela 3. Caracterização* físico-química do queijo Parmesão fabricado com a cultura Cc ₁ e maturado a 18 °C durante 180 dias.....	58
Tabela 4. Caracterização* físico-química do queijo Parmesão fabricado com a cultura D ₁ e maturado a 18 °C durante 180 dias.....	59
Tabela 5. Caracterização* físico-química do queijo Parmesão fabricado com a cultura E ₅ e maturado a 18 °C durante 180 dias.....	59
Tabela 6. Análise densitométrica (%) das frações da caseína do queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.....	69

CAPÍTULO IV - Compostos voláteis, perfil sensorial e análise da microestrutura do queijo Parmesão fabricado com *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos

Tabela 1 - Relação dos descritores sensoriais e referências de escala adotados na avaliação sensorial do queijo Parmesão.....	86
Tabela 2. Compostos voláteis* identificados de amostras de queijo Parmesão fabricado com culturas de <i>Lactobacillus helveticus</i> , maturado a 18 °C por 180 dias.....	89
Tabela 3. Notas* atribuídas pelos provadores para as amostras de queijo Parmesão fabricado com as culturas de <i>Lactobacillus helveticus</i> A, Cc ₁ , D ₁ e E ₅ , maturado a 18 °C por 90, 120 e 150 dias.....	92

RESUMO GERAL

O uso de culturas de *L. helveticus* isoladas de soro-fermento na fabricação do queijo Parmesão pode representar a preservação da biodiversidade, e também uma alternativa na redução de custos dos laticínios. Esta economia, combinada com a melhoria da qualidade tecnológica pode representar produtos com melhor aroma, textura e sabor e menor custo aos consumidores. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de culturas autóctones isoladas de soro-fermento na fabricação do queijo Parmesão. Os queijos foram produzidos com *Lactobacillus helveticus* com perfil autolítico elevado (Cc₁, E₅) e perfil autolítico intermediário (A, D₁) maturados a 18 °C durante 180 dias. Mensalmente, foram avaliados a qualidade sanitária, viabilidade de bactérias lácticas, perfil físico-químico, atividade da lactato desidrogenase (LDH), perfil eletroforético e análise da microestrutura por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A microestrutura do queijo E₅ maturado por 30 e 60 dias foi avaliada também em microscopia eletrônica de varredura (MEV). A presença de compostos aromáticos foi avaliada no queijo maturado por 60, 120 e 180 dias usando cromatógrafo gasoso, após prévia concentração das substâncias voláteis por *head-space*. Análise descritiva quantitativa (ADQ) foi empregada nas amostras maturadas por 90 a 180 dias. Todas as amostras de leite e queijo Parmesão atenderam aos padrões legais quanto aos bioindicadores de contaminação avaliados. Bactérias lácticas apresentaram redução a partir de 90 dias de maturação. Houve aumento significativo nos teores de acidez, nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS_{pH4,6}) e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (NS_{TCA12%}) em todas as amostras de queijo Parmesão ao longo de 180 dias de maturação. A maior hidrólise da caseína e liberação dos aminoácidos tirosina e triptofano foi obtida quando os queijos foram fabricados pelas culturas D₁ e E₅. Nestes queijos, a LDH permaneceu ativa até o período final de maturação. Em todos os tratamentos houve a degradação da α_{s1} caseína em α_{s1-I} e α_{s1-II} , sendo identificada também a degradação da β -caseína em γ_1 , γ_2 e γ_3 caseína. Ao longo da maturação foi registrada a presença de acetato de etila, acetona, n-butiraldeído e propanol em todos os queijos analisados, sem apresentar um perfil aromático claramente definido. A ADQ demonstrou semelhança no perfil sensorial dos queijos D₁ e E₅, com diferença do queijo fabricado com a cultura comercial, preferido sensorialmente. A microestrutura mostrou a interação entre as culturas lácticas e os lipídeos em MET e de lipídios com a matriz protéica em MEV.

Palavras chave: Parmesão, *Lactobacillus helveticus* autóctones, autólise, maturação, qualidade.

GENERAL ABSTRACT

The use of cultures of *L. helveticus* isolated from natural whey starter in the production of Parmesan cheese can represent biodiversity preservation, and also an alternative in reducing costs to the dairy industry. These savings, combined with the improved technological quality may represent products with a better aroma, texture and taste and lower cost to consumers. This study aimed to evaluate the effect of autochthonous cultures isolated from natural whey starter in the production of Parmesan cheese. The cheeses were produced with added *Lactobacillus helveticus* with high autolytic profile (C_{C1}, E₅) and intermediary autolytic profile (A, D₁) and ripened at 18°C during 180 days. Once a month, the sanitary quality, viability of lactic acid bacteria, physicochemical profile, the activity of lactate dehydrogenase (LDH), electrophoretic profile and transmission electronic microstructure (TEM) were analysed. The microstructure of cheese sample E₅ ripened during 30 and 60 days was also evaluated using scanning electronic microstructure (SEM). The presence of aromatic compounds was evaluated in the ripened cheese at 60, 120 and 180 days using gas chromatography, after prior concentration of volatile compounds by head-space. Quantitative Descriptive Analysis (QDA) was applied in ripened samples at 90 and 180 days. All samples of milk and Parmesan cheese were in accordance to the legal standards of bioindicators of contamination. Lactic acid bacteria population was reduced after 90 days of ripening. There was a significant increase in acidity, soluble nitrogen in pH 4.6 (NS_{pH4,6}) and soluble nitrogen in trichloroacetic acid (NS_{TCA12%}) contents in all samples of Parmesan cheese during 180 days of ripening. The higher hydrolysis of casein and release of tyrosine and tryptophan amino acids were higher in cheese produced with the D₁ and E₅ cultures added. In these cheeses, the LDH activity stayed active until the final period of ripening. In all experiments, there was a degradation of α_{s1} -casein into α_{s1-I} and α_{s1-II} -casein, and β -casein into γ_1 , γ_2 and γ_3 fractions. During the 180 days of ripening the presence of ethyl acetate, acetone, propanol and n-butylaldehyde were recorded in all cheeses analysed. However, they did not show a clear aromatic pattern. The QDA showed similarity to the sensory profile of D₁ and E₅ cheeses and both showed a slight difference when compared to cheese made with a commercial culture, which was the preferred to the sensory taste panel. Electronic microstructure showed an interaction between lactic acid cultures and lipids using TEM and lipids with protein matrix using SEM.

Key words: Parmesan, *Lactobacillus helveticus* autochthonous, autolysis, ripening, quality.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, parte da produção leiteira é direcionada aos laticínios para a manufatura de produtos lácteos, como o queijo Parmesão. Esse produto pode ser comercializado sob formas íntegras e fracionadas, entretanto, é geralmente consumido pela população na forma ralada.

A tecnologia de fabricação do queijo Parmesão compreende, basicamente a adição de cultura láctica responsável pela maturação e coalho para a coagulação do leite, seguida do corte da coalhada para liberação do lactosoro, prensagem da massa, salga e maturação. O produto pronto para consumo é caracterizado pelo reduzido teor de umidade, consistência dura, textura compacta e cor amarelo-palha. A matriz desse queijo é alvo de intensa atividade lipolítica, devido à ação de lipases microbianas que atuam, incisivamente, na porção lipídica oriunda da matéria-prima empregada na fabricação.

Em queijos de massa dura como o Parmesão, o complexo enzimático da microbiota láctica é um dos principais fatores que auxiliam na estabilidade físico-química desse produto durante o seu período de maturação, conferindo sabor e aroma picantes, peculiares desse queijo. Todavia, essa etapa agrega elevado custo à tecnologia desse derivado lácteo, sendo comum a comercialização de peças de queijos em períodos inferiores a seis meses; tempo mínimo preconizado pela legislação vigente.

Na tecnologia de queijos que requerem prolongado período de vida de prateleira, diversas estratégias têm sido adotadas para abreviar o processo de maturação, sem que haja o comprometimento da qualidade do produto final. O emprego da cultura láctica autolisada, ou seja, culturas previamente submetidas ao tratamento térmico severo e elevada pressão, bem como a adição de lipases, são recursos comumente relatados na literatura especializada. Contudo, tais procedimentos podem impulsionar o desenvolvimento de precursores responsáveis pelo aroma e sabor indesejáveis na matriz do queijo, sendo detectáveis apenas em longo prazo. Ainda, tais tratamentos inativam as proteínas antimicrobianas lácticas, denominadas também como bacteriocinas, importantes à estabilidade microbiológica do produto durante o período de estocagem.

No Brasil, o Parmesão é elaborado na maioria dos laticínios utilizando culturas lácticas comerciais, que são compostas por bactérias lácticas termofílicas, como o *Lactobacillus helveticus*. Esse é caracterizado por apresentar ampla aptidão tecnológica e algumas linhagens dessa espécie apresentam habilidade autolítica.

A autólise espontânea de cultivos lácticos acelera a maturação, uma vez que as endoenzimas são liberadas para o meio extracelular, atuando, rapidamente, sobre carboidratos, lipídios e proteínas constituintes do queijo. Para a tecnologia do Parmesão, o uso de cultura de *L. helveticus* com perfil autolítico em detrimento da cultura láctica autolisada assegura o aroma e sabor do produto, permite a atividade das bacteriocinas lácticas, as quais inibem a proliferação da microbiota oportunista no produto durante o período de maturação, e reduz o custo de produção, uma vez que o armazenamento adequado dos queijos durante o período de cura representa um investimento considerável. Ainda, em países em desenvolvimento, a aceleração da maturação de queijos, e conseqüente redução na estocagem, também é vista como uma alternativa para aumentar a fabricação do queijo Parmesão.

Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa consistiu em avaliar o desempenho das culturas autóctones de *Lactobacillus helveticus* autolíticos isoladas de soro-fermento sobre a dinâmica bioquímica e sensorial do queijo Parmesão. Para melhor entendimento, os dados obtidos foram organizados em capítulos. No capítulo I apresenta uma revisão sobre o aspecto tecnológico do processo de fabricação do queijo Parmesão. O capítulo II é referente a caracterização da microbiota láctica e bioindicadores de contaminação durante a maturação do queijo. O perfil físico-químico e de aminoácidos e a degradação da caseína estão detalhados no capítulo III. A identificação e quantificação de substâncias responsáveis pelo aroma e sabor no Parmesão e os estudos da microestrutura das amostras experimentais foram descritos no capítulo IV.

CAPÍTULO I^{1,2}

¹BARROS, J. J. C; PENNA, A. L. B. Aspectos tecnológicos e bioquímicos envolvidos na fabricação do queijo Parmesão. **Revista SEMINA**, Londrina. (submetido à publicação, 2009).

²O texto foi formatado de acordo com as normas da SEMINA Ciências Agrárias, Londrina.

Aspectos tecnológicos e bioquímicos envolvidos na fabricação do queijo Parmesão
Technological and biochemical aspects involved in the production of Parmesan cheese

Resumo

Na tecnologia de fabricação de queijo Parmesão é empregado leite *in natura* ou pasteurizado e/ou reconstituído padronizado. O leite é fermentado por culturas lácticas termofílicas como *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*. As enzimas destes microrganismos atuam sobre os carboidratos, gorduras e proteínas, conferindo aroma e textura característicos desse produto. O queijo Parmesão pronto para consumo deve apresentar teor de gordura entre 25,0 % a 44,9 % e umidade não superior a 36,0 %. A lise, espontânea ou induzida, das culturas lácticas tem sido considerada uma alternativa para acelerar a maturação de queijos de massa dura. O Parmesão sofre intensa atividade proteolítica e lipolítica, que podem ser monitoradas pela evolução dos componentes do leite utilizando métodos objetivos ou subjetivos. Para avaliar a evolução da maturação são comumente empregadas análises cromatográficas e/ou espectrofotométricas, eletroforese, análise da microestrutura, e avaliação sensorial.

Palavras chave: Parmesão, caracterização, enzimas lácticas, maturação, qualidade.

Abstract

In Parmesan cheese producing, raw or pasteurized and/or reconstituted standardized milk are used. The milk is fermented using thermophilic lactic acid cultures, such as *Lactobacillus helveticus* and *Streptococcus thermophilus*. The enzymes of these microorganisms act on carbohydrates, fats and proteins, giving the characteristic flavor and texture of the product. The Parmesan cheese ready for consumption should contain between 25.0 % and 44.9 % of fat content and less than 36.0 % of moisture. The lysis of lactic cultures, spontaneous or induced, has been considered an alternative to accelerate the ripening of hard cheeses. During ripening the Parmesan undergoes intense lipolytic and proteolytic activity, which can be monitored by the evolution of milk components using subjective or objective methods. In order to evaluate the ripening chromatographic and/or spectrophotometric analysis, electrophoresis, analysis of the microstructure, and sensory evaluation are commonly used.

Key words: Parmesan, characterization, lactic enzymes, ripening, quality.

1. Introdução

O sistema agroindustrial do leite e seus derivados exerce forte impacto nas atividades sócio-econômicas do país. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2008), em 2008, a produção brasileira de leite atingiu no 1º trimestre 4.893 bilhões de litros, captados pelas indústrias sob inspeção sanitária federal, estadual ou municipal.

No Brasil, parte da produção leiteira é direcionada aos laticínios para a fabricação de queijos, obtendo-se 592 mil toneladas de queijo por ano, sendo 28 mil toneladas de queijo Parmesão (IBGE, 2006). Este produto é o segundo dentre as variedades de queijos estrangeiros mais consumidos, após o mussarela, podendo ser comercializado sob formas íntegras e fracionadas, entretanto, é geralmente consumido pela população na forma ralada.

O Parmesão é um queijo semi-gordo, maturado e de baixa umidade, obtido a partir da coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas e deve apresentar teor de gordura entre 25,0 % a 44,9 %, umidade não superior a 36,0 %.

2. Breve caracterização da variedade Parmesão

No Brasil, a legislação estabelece que o Parmesão pode ser fabricado com leite *in natura* ou pasteurizado e/ou reconstituído padronizado. É um queijo de consistência dura, textura compacta e granulosa, com crosta espessa de 4 mm a 8 mm, lisa e cor amarela-palha. Apresenta-se na forma cilíndrica, com peso oscilando entre 5 Kg a 10 Kg. O produto é ligeiramente picante e salgado, apresenta odor suave e agradável. A temperatura de armazenamento não deve exceder a 18 °C e deve ser maturado por cerca de seis meses (BRASIL, 1997). O rendimento da fabricação é em torno de 13 Kg de leite.Kg⁻¹ de queijo após sua completa maturação (PERRY, 2004).

Na Itália, Parmesão é o termo genérico aplicado aos queijos que utilizam processamentos semelhantes ao Grana Padano e Parmigiano-Reggiano, fabricados em regiões externas aos limites geográficos de origem destes queijos. As regiões italianas são amparadas pela legislação européia, a qual assegura a genuidade dos queijos, por meio de um registro de Denominação de Origem Protegida - DOP (GAIASCHI et al., 2001; SALVINI et al., 2006). As condições edafo-climáticas dessas regiões conferem ao leite *in*

natura, empregado no processamento, atributos peculiares, os quais são transferidos ao queijo, contribuindo para o aroma e sabor característicos desses produtos.

3. Aspectos tecnológicos da fabricação do queijo Parmesão

O leite destinado à manufatura de queijos deve apresentar acidez entre 15,0 °D e 18,0 °D. Em escala industrial, a padronização dos queijos é assegurada a partir do teor máximo de umidade e mínimo de gordura no extrato seco - ESD (FURTADO, 1991).

Para a fermentação utiliza-se bactérias ácido-láticas termofílicas, geralmente compostas por *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*, e a coagulação da massa é realizada a temperatura de 35 °C (McSWEENEY, 2004; FURTADO, 2005). Esta temperatura propicia o desenvolvimento das células lácticas (KENNY et al., 2003; MARILLEY; CASEY, 2004) e mantém ativo o complexo enzimático endógeno (LORTAL; CHAPOT-CHARTIER, 2005; KELLY; FOX, 2006). Esta temperatura é, ligeiramente, abaixo da temperatura ótima para ação do coalho (PERRY, 2004; STEPANIAK, 2004), de modo que a susceptibilidade das micelas de caseínas à proteólise não é afetada (McSWEENEY, 2004).

A coagulação ocorre de forma lenta, decorrente da insolubilização do cálcio durante o tratamento térmico elevado do leite. Em indústrias queijeiras que utilizam a pasteurização rápida, é comumente utilizada uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 50% para recuperar a aptidão original do leite para a coagulação e fabricação do Parmesão (FURTADO, 2005); todavia, o emprego abusivo desse sal pode conferir-lhe o gosto amargo (FURTADO, 1991; PERRY, 2004; SALÄUN, MIETTON; GAUCHERON, 2005).

O processo de mexedura e corte da coalhada é realizado em diferentes tempos e velocidades. Na primeira fase da mexedura a temperatura interna do grão é de 35 °C, favorecendo a viabilidade (RAY, 2003, MADIGAN; MARTINKO, PARKER, 2004) e atividade (CIBIK; CHAPOT-CHARTIER, 2004). Por se tratar de massa cozida, os grãos da coalhada do queijo Parmesão apresentam tamanhos aproximados de 0,2 cm e resultam em baixo teor de umidade e de ácido láctico e elevado teor de minerais, como o cálcio (FURTADO, 1991). A velocidade empregada na segunda etapa da mexedura é mais intensa, e a temperatura atinge 54 °C, promovendo a retirada de soro dos grãos, assegurando assim, o teor de umidade final (FURTADO, 1991). Este parâmetro está, intimamente, associado à concentração de lactose remanescente na massa, que pode

favorecer o desenvolvimento da microbiota secundária indesejável (SOOMRO; MASUD, ANWAAR, 2002; GATTI et al., 2004). Na fabricação do Parmesão, é conveniente empregar bactérias lácticas *starters* hábeis em metabolizar completamente a lactose, antes que sejam substituídas pela microbiota não *starter* (DUDLEY; STEELE, 2005). O metabolismo heterofermentativo das bactérias sobre a lactose pode desencadear sabor rançoso e gosto amargo no queijo (FURTADO, 2005), e ainda, induzir à cristalização desse açúcar na matriz do queijo (AGARWAL et al., 2006).

É imprescindível certificar o ponto da massa para submetê-la à prensagem. Essa avaliação, meramente subjetiva, é obtida a partir da compressão manual da massa. A firmeza e baixa adesividade dos grãos, aliados a rapidez de separação do soro são indícios valiosos para iniciar o processo de pré-prensagem. O peso usado para a pré-prensagem deve ser equivalente ao dobro do peso da massa, assegurando a temperatura adequada à coesão dos grãos, e ainda, impedir a formação de olhaduras mecânicas no queijo decorrentes da aeração. A prensagem, propriamente dita, confere o formato desejado ao queijo, expulsa a lactose residual e, contribui para a formação da casca (FURTADO, 1991).

A salmoura inicial deve apresentar concentração de 17 % a 18 %, posteriormente, os queijos devem ser submetidos a salga em salmoura com teor de 25 % (FURTADO, 1991). A incorporação de sal afeta as interações protéicas, principalmente na matriz de caseína, induzindo à hidratação e expansão dessas moléculas (PASTORINO; HANSEN, McMAHON, 2003; FURTADO, 2005). A adequada absorção de sal durante a salga resulta em queijos com teores de sal entre 0,5 % a 2,5 % (FURTADO, 1991).

O processo de salga é efetuado em câmaras frias sob temperaturas não superiores a 12 °C. Esta condição retarda a atividade enzimática de bactérias e fungos; todavia, é necessário efetuar o monitoramento físico-químico e microbiológico da salmoura, prevenindo a contaminação cruzada do queijo (MADIGAN; MARTINKO, PARKER, 2004). Bactérias patogênicas, tais como *Staphylococcus aureus*, são hábeis em manter seu metabolismo mesmo em soluções salinas concentradas em 25 %, permitindo sua proliferação no decorrer da estocagem e maturação (RAY, 2003). Esse fato é ainda mais preocupante, quando a temperatura é elevada, com intuito de acelerar a maturação dos queijos (AGARWAL et al., 2006).

O queijo Parmesão pronto para comercialização deve apresentar atividade de água (A_w) aproximada de 0,917 (FURTADO, 1991). O microrganismo *Staphylococcus aureus*

em temperaturas de 37 °C e A_w entre 0,870 e 0,900 é hábil em sintetizar toxinas termorresistentes (JAY, 2005), enquanto as culturas lácticas possuem seu complexo enzimático potencializado em ambientes com atividade de água entre 0,930 a 0,960 (LEROY; VUYST, 2004). Coppola et al. (2000) verificaram decréscimo da atividade de água em Parmigiano-Reggiano durante 150 dias de maturação, com valores aproximados de 0,970 e 0,950 para os queijos maturados por 30 dias e 150 dias, respectivamente. A população de bactérias lácticas termofílicas foi de 6,88 Log UFC.g⁻¹ e 6,44 Log UFC.g⁻¹, aos 30 e 150 dias de maturação, respectivamente.

Furtado (2005) e McSweeney (2004) mencionam o desenvolvimento de pigmentos escuros no queijo Parmesão durante a estocagem. Este problema pode ser evitado pela adição de um bacilo galactose positiva, como o *L. helveticus*, na composição da cultura láctica (TORRIANI; VESCOVO; SCOLARI, 1994). A habilidade que *Lactobacillus helveticus* possuem em sintetizar a enzima galactose-1-fosfato uridil transferase (KLEIN et al., 2001; TORINO et al., 2001) contribui para a oxidação completa da galactose, impedindo a formação de pigmentos escuros, as melanoidinas, no queijo Parmesão.

3.1 Microbiota oportunista como bioindicador da qualidade sanitária do queijo

Os carboidratos, lipídios e proteínas distribuídos em queijos duros e semi-duros são fontes em potencial tanto à proliferação da microbiota láctica quanto ao desenvolvimento de células microbianas oportunistas na matriz desses derivados lácteos (COPPOLA et al., 2000; ÖKSÜZTEPE; PATIR; ÇALICIOĞLU, 2005; SALAÜN; MIETTON; GAUCHERON, 2005). A atividade enzimática de microrganismos deteriorantes e patogênicos tende a reduzir a vida-de-prateleira dos queijos e, ainda, acarretar sérios prejuízos sob o ponto de vista de saúde pública (JAY, 2005; RIEDEL, 2005; SILVA JR., 2005).

O leite empregado na fabricação do Parmesão deve apresentar elevado grau de pureza química e microbiológica (MOURA et al., 1999). A presença de resíduos antimicrobianos pode inibir a reação glicolítica, etapa primordial à produção de queijos e de diversos derivados lácteos (MARILLEY; CASEY, 2004; FURTADO, 2005). Microrganismos saprofíticos, como *Pseudomonas fluorescens*, podem favorecer o aparecimento de gosto amargo e ranço no produto (MUNSCH-ALATOSSA; ALATOSSA, 2006). O complexo enzimático dessa espécie é constituído por lipases altamente ativas

(LERICHE, 2004, SKEIE, 2007), as quais são hábeis em hidrolisar os glóbulos de gordura (McSWEENEY; SOUZA, 2000).

Na fabricação do Parmesão (FURTADO, 2005), Parmigiano-Reggiano (COPPOLA et al., 2000) e Reggiano Argentino (PEROTTI et al., 2004), a inserção de células microbianas indesejáveis, advindas da matéria-prima e/ou de falhas higiênicas durante o processamento, pode acarretar defeitos irreversíveis ao produto final. Nesses produtos, os metabólitos de enterobactérias (COPPOLA et al., 2000), como coliformes totais, e das bactérias do gênero *Clostridium* (McSWEENEY, 2004; SKEIE, 2007) impulsionam o estufamento precoce e tardio do queijo, respectivamente, induzindo a formação de olhaduras e trincas em toda sua extensão. O estufamento tardio é ainda mais evidente em queijos que apresentam baixo índice proteolítico (FURTADO, 2005).

Nos queijos é comum a contagem de células microbianas para qualificar as condições higiênico-sanitárias do produto (RAY, 2003). Estes microrganismos são denominados bioindicadores de qualidade sanitária. De acordo com o Regulamento Técnico Geral para a Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos (BRASIL, 1996), para queijos de baixa umidade, as bactérias do grupo coliformes são empregadas como microrganismos indicadores, e os patógenos *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva não podem estar presentes. O Parmesão maturado pronto para comercialização deve apresentar contagem máxima de 5×10^2 UFC.g⁻¹ para coliformes termotolerantes, ausência de *Salmonella* sp em 25 gramas da amostra investigada e valor não superior a 10^3 UFC.g⁻¹ para coliformes totais e *S. coagulase* positiva. A Resolução RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001, recomenda o mesmo parâmetro proposto no Regulamento Técnico Geral, exceto a análise de coliformes totais (BRASIL, 2001). Quando o queijo é fabricado seguindo as Boas Práticas de Fabricação, estes requisitos são facilmente atendidos.

Em queijo Parmigiano-Reggiano, maturado por 150 dias não foi detectado coliformes termotolerantes em nenhum período de estocagem do produto (COPPOLA et al., 2000). Perotti et al. (2004) registraram valores inferiores a 10^2 UFC.g⁻¹ para coliformes totais em Reggiano Argentino maturado por 180 dias.

O monitoramento do aspecto sanitário é realizado, comumente, utilizando meios de culturas específicos, a partir de cultivos em profundidade e/ou superficial e em condições aeróbicas e anaeróbicas (SILVA et al., 2007). O diagnóstico associado à qualidade sanitária dos alimentos tem sido efetuado empregando também a tecnologia de substratos específicos que reduz o tempo de detecção desses bioindicadores e assegura a

confiabilidade da análise. Geralmente, esses métodos são classificados como cromogênicos, ou seja, a partir do parâmetro de cor é possível enumerar e/ou identificar células microbianas (JAY, 2005).

A contagem de coliformes totais e *Echerichia coli* por métodos rápidos é realizada pela associação da atividade do complexo enzimático dos microrganismos e de um substrato específico (MADIGAN; MARTINKO; PARKER., 2004). A hidrólise do substrato β -D-galactopiranosídeo pela enzima orto-nitro-fenil-galacturonidase (ONPG) confere uma coloração de laranja a púrpura, indicando a presença de coliformes . Em contrapartida, a ação da enzima β -glucoronidase sobre o substrato 4-metilumbeliferil β -D-glucoronídeo (MUG) resulta numa coloração azul à colônia, revelando a incidência de *E. coli*.

O processamento e a maturação de produtos fermentados contribuem para a inibição de patógenos e deteriorantes. No entanto, alguns microrganismos e/ou seus metabólitos permanecem ativos mesmo após o período de cura (LEROY; VUYST, 2004; LIN et al., 2006).

É necessário o uso de matéria-prima de acordo com os padrões preconizados pela legislação vigente, para evitar problemas de saúde pública, como as doenças transmitidas por alimentos (DTA), uma vez que microrganismos hábeis em sintetizar toxinas, podem fazê-lo quando as contagens são superiores a 10^5 células viáveis (RIEDEL, 2005; SILVA JR., 2005). Ainda, a prática higiênica adequada durante a fabricação dos queijos impede o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, assim como a formação de subprodutos indesejáveis, como aminas bioativas (KOMPRDA et al., 2005, INNOCENTE et al., 2007), que apresentam risco toxicológico, uma vez que podem comprometer o sistema imunológico do consumidor.

3.2 Culturas lácticas e sua aplicabilidade na indústria queijeira

As culturas lácticas adicionadas ao leite destinado à elaboração de queijos desempenham diferentes funções como diminuir o pH, facilitar a ação do coalho, auxiliar na expulsão do soro e atuar na maturação (McSWEENEY, 2004, LORTAL; CHAPOT-CHARTIER, 2005). Estas culturas podem ser classificadas como *starters* (*Lactic Acid Bacteria* - LAB) ou iniciadoras quando as bactérias são fermentadoras da lactose e não *starters* (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* - NSLAB), como *Leuconostoc* e

Propionibacterium, que vão atuar sobre outros substratos, tais como o citrato (GIRAFFA, 2004).

Na produção de queijos, o emprego de culturas autóctones, ou seja, culturas que se formam sob o controle de fatores tecnológicos em um determinado ambiente, sem sofrer a influência de microrganismos isolados de outras fontes (CANDIOTI et al., 2002; HÉBERT et al., 2000), assegura a biodiversidade natural da microbiota láctica e ainda transfere ao produto características específicas da região.

As bactérias da cultura láctica são importantes na padronização da qualidade dos queijos, transmitindo características e propriedades específicas (FALLICO et al., 2006) e, ainda, são capazes de competir ou inibir a proliferação de patógenos e microrganismos oportunistas (OGUNBANWO; SANNI; ONILUDE, 2003, BROMBERG et al., 2004). Culturas autóctones de *Lactobacillus helveticus* autolíticos inibiram o desenvolvimento de *Escherichia coli* ATCC 25922, das quais 20% também apresentaram espectro de inibição frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (BARROS, 2005).

Na fabricação do queijo Parmesão utiliza-se cultura láctica termofílica capaz de resistir ao cozimento da massa a uma temperatura de até 55 °C. Os principais gêneros que compõem a cultura são *Lactobacillus* e *Streptococcus* que apresentam crescimento ótimo na faixa de temperatura entre 37 °C a 45 °C (DI CAGNO et al., 2006). O *L. helveticus* é considerado um forte produtor de ácido, reduzindo o valor de pH até < 4,0 (PILLIDGE et al., 2002). A importância dessa característica em *L. helveticus*, somada à capacidade que essa espécie possui em acelerar a maturação de queijos (HANNON et al., 2003, BARROS et al., 2006, KENNY et al., 2006), resistir aos sais biliares (SHINODA et al., 2001), sintetizar bacteriocinas (BONADÈ et al., 2001), peptídeos bioativos (KILPI et al., 2007) e compostos aromáticos (KLEIN et al., 2001), sugerem aplicações potenciais para essa espécie, minimizando a dependência da importação de culturas lácticas pelo Brasil (BARROS, 2005).

Valence et al. (2000) e Hannon et al. (2003) avaliaram o emprego da autólise celular de bactérias lácticas termofílicas como uma alternativa para acelerar a maturação em queijos. Barros (2005) observou dentre as culturas autóctones de *L. helveticus* estudadas, rápida lise celular, seguida da inibição da enzima β -galactosidase no tempo máximo de 24 horas, fato que pode assegurar o controle da produção de ácido láctico, e ainda, acelerar a maturação em queijos.

O comportamento auxotrófico também é outro aspecto abordado por McSweeney (2004) como fator relevante à indústria queijeira. Madigan, Martinko, Parker (2004) explicam que esse caráter corresponde à resistência que as culturas possuem em atingir a fase logarítmica, também conhecida como reprodução bacteriana, na ausência de um nutriente específico. Geralmente, os microrganismos requerem a adição de aminoácidos para o seu metabolismo. Nos estágios finais da proteólise, à medida que as endopeptidases asseguram a homeostasia celular das espécies lácticas, a partir da degradação de substratos na matriz protéica, concomitantemente, observa-se a formação de compostos responsáveis pelo sabor e aroma (KLEIN et al., 2001; LEROY; VUYST, 2004; McSWEENEY, 2004).

3.2.1 Mecanismo de ação da lactato desidrogenase (LDH) durante a lise de bactérias lácticas

A lise de culturas termofílicas, como aquela observada em *Lactobacillus helveticus*, é importante para a indústria de laticínios, pois pode acelerar a maturação de queijos. Esta lise celular é promovida pela ação das autolisinas que hidrolisam ligações específicas na parede de peptidoglicana (DEUTSCH et al., 2002, ROSSI et al., 2002; MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004; WILKINSON; KILCAWLEY, 2005). A atividade das autolisinas favorece a liberação do complexo enzimático, constituído por proteinases (KENNY et al., 2003, KILPI et al., 2007) e peptidases (KENNY et al., 2006), presentes na região intracelular. Este sistema autolítico pode ser acionado naturalmente ou de forma induzida (KENNY et al., 2005; SCOLARI, VESCOVO, 2005).

Valence et al. (2000), Hannon et al. (2003) e Kenny et al. (2006) consideram como culturas lácticas autolíticas aquelas em que a lise celular se processa espontaneamente. A cultura láctica autolisada é constituída por linhagens previamente submetidas ao tratamento com sais, choques térmicos e/ou pressurização (DEUTSCH et al., 2002; FENELON et al., 2000, LAW, 2001).

Segundo Sánchez-Ponte (2003), as culturas lácticas autolíticas e autolisadas aceleram a maturação em queijos, pois durante a lise celular, as enzimas intracelulares, tais como a β -galactosidase (MONTANARI et al., 2000) e lactato desidrogenase (KENNY et al., 2003, SHEEHAN et al., 2005, KENNY et al., 2006) são liberadas, podendo atuar mais rápido e facilmente sobre o substrato. Além disso, o uso de culturas autolíticas confere qualidade adicional ao produto, pois o tratamento térmico, a adição de sais e aplicação de altas

pressões para a obtenção de cultivos autolisados podem inativar biomoléculas responsáveis pelo sabor, aroma e conservação dos queijos (SÁNCHEZ-PONTE, 2003, STEPANIAK, 2004, NELSON; COX, 2007).

A lactato desidrogenase atua de forma incisiva sobre o piruvato, induzindo sua redução a lactato. Nesta reação é observada a redução simultânea de NAD⁺ a NADH (MADIGAN; MARTINKO, PARKER, 2004; NELSON; COX, 2007).

Diversas estratégias têm sido empregadas para identificar o instante da lise celular, bem como o perfil autolítico de culturas lácticas, seja em meios de cultura específicos para os cultivos lácticos (ROSSI, 2001, CIBIK; CHAPOT-CHARTIER, 2004, BARROS, 2005), bem como na matriz do queijo maturado (DEUTSCH et al., 2002, KENNY et al., 2005, SCOLARI; VESCOVO, 2005).

Rossi (2001) monitorou o desenvolvimento de *Lactobacillus helveticus* autóctones em caldo *De Man Rogosa Sharp* (MRS) e a morte celular a partir de técnicas turbidimétricas e diagnóstico por imagens em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Barros (2005) registrou o caráter autolítico elevado, intermediário e não autolítico em *Lactobacillus helveticus* autóctones isolados e identificados por Rossi (2001) a partir da liberação da β -galactosidase em caldo MRS.

O monitoramento da liberação dos componentes intracelulares na matriz do queijo é o método mais eficiente para a avaliação da lise celular, principalmente quando é efetuado avaliando os ácidos desoxirribonucléico (DNA) e ribonucléico (RNA) a partir de técnicas biomoleculares. No entanto, no queijo essas moléculas são rapidamente degradadas dificultando a análise (LORTAL; CHAPOT-CHARTIER, 2005). Desta forma, a cinética de endoenzimas microbianas, como a lactato desidrogenase - LDH (EC 1.1.1.27) tem sido empregada, com êxito, como marcador de lise celular (HANNON et al., 2006).

Bunthof et al. (2001), Deutsch et al. (2002), Pillidge et al. (2002), Kenny et al. (2005), Hannon et al. (2006) avaliaram a autólise a partir da redução do NAD⁺. O produto formado, NADH, é detectável no comprimento de onda 340 nm (densidade óptica - DO_{340nm}), permitindo predizer a atividade da enzima LDH no meio. Cada unidade da enzima é equivalente a 1 μ M de NADH liberado por minuto por mililitro da amostra (U.mL⁻¹.min⁻¹), na temperatura de 37 °C. De forma equivalente, a atividade da LDH pode ser expressa como unidade por mililitro da amostra (U.mL⁻¹). Kenny et al. (2006) verificaram valores médios para a atividade da enzima LDH igual a 0,08 U.mL⁻¹; 1,14 U.mL⁻¹; 0,18 U.mL⁻¹ e 0,84 U.mL⁻¹, respectivamente, nos queijos Cheddar fabricados com

diferentes culturas (cultura pura de *Lactococcus lactis* 303 Chr. Hansen[®], cultura mista de *Lc. lactis* com *L. helveticus* DPC 4571, *Lactobacillus helveticus* com *L. helveticus* DPC 5353 e *Lactobacillus helveticus* com *L. helveticus* DPC 5364), maturados por 180 dias. A combinação *Lactobacillus helveticus* com *Lactobacillus helveticus* DPC 4571 apresentou maior atividade autolítica, intensificando o sabor e aroma no queijo Cheddar durante a maturação.

A cinética *in situ* da LDH permite predizer a velocidade das reações responsáveis pela maturação do queijo (PILLIDGE et al., 2002; KENNY et al., 2006). Todavia, para que este diagnóstico seja confiável é necessário que o pH seja favorável (SALÄUN, MIETTON, GAUCHERON, 2005). No caso do Parmesão, o pH deve estar entre 5,0 e 5,2 no final da maturação (PERRY, 2004), contribuindo para que a ação da LDH (SHEEHAN et al.; 2005), iniciada em temperaturas elevadas, seja mantida mesmo em temperatura reduzida.

3.3 Evolução dos componentes químicos no queijo Parmesão durante a estocagem

A maturação promove o sabor e potencializa outras características sensoriais no queijo Parmesão, tais como odor, aroma, adstringência e friabilidade (BOZZETTI, 2000; GOVINDASAMY-LUCEY et al., 2004;). Todavia, devido ao elevado custo que este processo representa, é comum encontrá-lo no mercado brasileiro com período de maturação inferior a seis meses, que é o tempo mínimo estabelecido na legislação, e ainda, com valor comercial que restringe o seu consumo à população com alto poder aquisitivo.

De acordo com Zambonelli et al. (2002), McSweeney (2004), no decorrer da maturação do queijo Parmesão e das suas variedades, há intensa atividade proteolítica e lipolítica, que podem ser monitoradas por métodos objetivos ou subjetivos. Métodos objetivos que utilizam análises químicas, cromatográficas (NOGUEIRA; LUBACHEVSKY; RANKIN, 2005), diagnóstico da microestrutura (LOPEZ; CAMIER; GASSI, 2007), eletroforese (SAINANI; VYAS; TONG, 2004), espectrofotometria (GAIASCHI et al., 2001), precipitação fracionada das proteínas (MADADLOU; KHOSROSHAHI; MOUSAVI, 2005, FALLICO et al., 2006), e métodos subjetivos, como a avaliação sensorial (SPADOTI; DORNELLAS; ROIG, 2005; CURI; BONASSI, 2007), têm sido empregados para determinar o grau de maturação em queijos (PEROTTI et al., 2004).

Na produção de um queijo de qualidade satisfatória, a cultura láctica deve ter poder acidificante, aromatizante ou uma combinação desses fatores (HANNON et al., 2003). Klein et al. (2001) propõem a adição de *Lactobacillus helveticus* autolíticos para assegurar estas características, entretanto, as vias metabólicas remanescentes, utilizadas por esta espécie, ainda são desconhecidas. Linhagens de *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807, quando inoculadas no leite, produziram elevados índices de precursores de sabor e aroma, tais como o diacetil, acetaldeído e compostos sulfurosos (TORINO et al., 2001). A aceleração da maturação em queijos suíços foi constatada por Valence et al. (2000) quando utilizaram *L. helveticus* autolítico na fabricação dessa variedade.

Outras substâncias aromáticas, tais como 2-metil propanal, 2-metil butanal, 3-metil butanal, fenilacetaldeído, etil butanoato, etil hexanoato, etil octanoato, diacetil, 2-heptanona, 2-nonanona, dimetil trissulfito, metional, 2,6-dimetil pirazina, ácido butanóico, ácido hexanóico e ácido octanóico são comumente identificadas e quantificadas em queijo Parmigiano-Reggiano (QIAN; REINECCIUS, 2002; BELLESIA et al., 2003). A síntese desses voláteis na matriz do queijo potencializa as características de aroma e odor desse produto.

Hannon et al. (2003) verificaram que em dois meses de maturação, amostras de queijos Cheddar fabricadas com *L. helveticus* DPC 4571 com intensa atividade autolítica apresentaram elevado índice proteolítico, resultando no desenvolvimento de sabor e aroma característicos.

O avanço da proteólise em queijos pode ser mensurado a partir dos índices de extensão e profundidade da maturação (FURTADO, 1991). As proteinases e peptidases bacterianas atuam sobre as proteínas e peptídeos produzindo compostos de baixo peso molecular e aumentando o teor de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético - TCA 12% (FARKEY; FOX, 1990). A extensão da proteólise é caracterizada pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis em pH 4,6 ($NS_{pH4,6}$) acumuladas durante o processo e expressas como porcentagem do nitrogênio total, também conhecido como índice de extensão da maturação (IEM). O índice de profundidade da maturação (IPM) relaciona o teor de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% ($NS_{TCA12\%}$) com o teor de nitrogênio total, tendo como compostos característicos: aminoácidos, oligopeptídeos e aminas, relacionados à atividade da cultura láctica (WOLFSCHOON-POMBO, 1983; McSWEENEY, 2004; PEREIRA et al., 2008).

Fox, Law (1991) e Furtado (2005) afirmam que a liberação dos aminoácidos tirosina e triptofano é uma consequência da ação das enzimas do coalho e da cultura. A presença de anel benzênico na estrutura destes aminoácidos e sua capacidade de determinação espectrofotométrica tornam sua quantificação um método simples e eficiente na determinação do índice de proteólise em queijos (FOX; LAW, 1991, McSWEENEY, 2004). As quantidades do aminoácido tirosina, normalmente, apresentam a mesma tendência daqueles dos índices de extensão e profundidade da maturação em queijos (PEROTTI et al., 2004). A atividade proteolítica das culturas também pode ser avaliada quantificando os aminoácidos de peptídeos liberados empregando o ortoftaldeído (OPA), que reage com o β -mercaptoetanol e aminas primárias, formando um complexo fluorescente detectável em densidade óptica de 340nm - DO_{340nm} (FOX, 1993).

3.3.1 Desenvolvimento do sabor e aroma lipolítico no queijo Parmesão

A liberação de ácidos graxos durante a maturação dos queijos é promovida pela lipase natural do leite (STEPANIAK, 2004; FURTADO, 2005) e pela ação das lipases de bactérias lácticas *starters* (GIRAFFA, 2004), como de *Lactobacillus helveticus* (McSWEENEY; SOUZA, 2000; COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003).

A especificidade da lipase de *Lactobacillus helveticus* pela posição *sn*-3 dos triglicerídeos influencia no desenvolvimento do sabor e aroma do queijo Parmesão, pois, geralmente, ácidos graxos de cadeia curta estão inseridos nessa posição. Embora a lipase de *L. helveticus* apresente baixa atividade, o longo tempo de maturação do queijo Parmesão permite à enzima atuar na posição *sn*-3 e promover a liberação de ácidos graxos esterificados (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003, McSWEENEY; 2004, STEPANIAK, 2004), que interferem no sabor do queijo (CANDIOTI et al., 2002).

Fenster, Rankin, Steele (2003) verificaram que lipases e esterases produzidas por *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32 desencadearam a produção do sabor e aroma em queijos Parmesão, uma vez que induzem a liberação de ácidos graxos. Estes atuam como precursores na formação de ésteres, tal como o diacetil, importante no desenvolvimento do sabor e aroma em queijos italianos, como o Parmesão e Grana Padano (QIAN; REINECCIUS, 2003). As lipases e esterases, geralmente, possuem pH ótimo entre 7,0 e 8,5 e temperatura ótima de 35 °C (QIAN; REINECCIUS, 2003, FURTADO, 2005).

A presença dos ácidos graxos livres (AGL) palmítico e esteárico, em concentrações aproximadas de $6 \times 10^2 \text{ mg.kg}^{-1}$ e $2 \times 10^2 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente em queijo Reggiano Argentino, produzido com *L. helveticus* isolados de soro-fermento natural e maturado por 180 dias, foi observada por Perotti et al. (2004). Estes valores foram comparados àqueles presentes no queijo Parmesão, o qual apresentou valor aproximado de $1,5 \times 10^3 \text{ mg.kg}^{-1}$ para ácido palmítico e $5 \times 10^2 \text{ mg.kg}^{-1}$ para ácido esteárico.

3.4 Análise da microestrutura de queijos por diagnóstico de imagens

De acordo com Lopez (2005), a funcionabilidade do queijo é influenciada pela concentração, tamanho e forma dos glóbulos de gordura, bem como pela estrutura destes no leite fluido. Os lipídios se apresentam no leite como uma emulsão, contudo, sua microestrutura nos produtos lácteos e, particularmente no queijo é pouco conhecida. Os glóbulos de gordura do leite podem ser alterados ou sofrer rupturas durante a fabricação dos queijos, em consequência aos tratamentos aplicados (YE et al., 2004; LOPEZ; CAMIER, GASSI, 2007).

Algumas modificações ocorridas durante a maturação, tais como degradação protéica e desenvolvimento das culturas inseridas no queijo, são facilmente detectáveis a partir de análises rotineiras. Todavia, as mudanças nas interações entre proteínas e gorduras, requerem diagnósticos a partir da visualização microscópica. As eletromicrografias do queijo permitem avaliar a estrutura da gordura e suas interações com as proteínas no decorrer da vida de prateleira do queijo (YE et al., 2004), podendo ser identificados pontos de inserção dos lipídios (FRAU et al., 1997; PARKER et al., 1998).

O emprego da microscopia fotônica, eletrônica de transmissão - MET (FRAU et al., 1997, PARKER et al., 1998) e eletrônica de varredura - MEV (MADADLOU; KHOSROSHAHI, MOUSAVI, 2005; FALLICO et al., 2006) têm sido adotadas como ferramenta adicional para avaliar a qualidade e/ou defeitos em queijos maturados (MAZEROLLES et al., 2001).

Nos períodos que antecedem a atividade proteolítica, a matriz caseínica apresenta caráter elástico (LAWRENCE; GILLES; CREAMER, 1983), entretanto, no decorrer da maturação, a ação conjunta das proteases e peptidases confere à mesma uma característica mais rígida (McSWEENEY, 2004, FURTADO, 2005). Fallico et al. (2006), ao acompanharem as alterações da microestrutura do queijo duro Piacentinu Ennese maturado

por 4 e 6 meses, observaram microestrutura mais compacta, decorrente da redução gradual da umidade, causada pela evaporação na superfície do queijo.

Na microestrutura obtida por MET em queijo Parmesão comercial foi possível visualizar a interação entre os glóbulos de gordura e as culturas lácticas (BARROS et al., 2009). Esse tipo de arranjo foi, inicialmente, observado, em queijos Cheddar por Dean; Berridge; Mabbitt (1959). Laloy et al. (1996) observaram que as populações de cultura láctica eram de 30 a 100 % maiores e de 4 a 10 vezes maiores em queijos Cheddar com redução de 50 % de gordura e em queijos Cheddar integrais, respectivamente, quando comparados com queijos Cheddar sem gordura.

Fenelon, O'Connor, Guinee (2000) observaram em queijos Cheddar com 33% (C33) e 6% (C6) de gordura, população de LAB iguais a 8,5 Log UFC.g⁻¹ durante 100 dias de maturação. Houve redução na amostra C33 para 1,9 Log UFC.g⁻¹ e 1,0 Log UFC.g⁻¹ no período de 180 a 225 dias de maturação, respectivamente. A população inicial de NSLAB para ambas amostras foi de 2,8 Log UFC.g⁻¹, com aumento significativo para 7,5 Log UFC.g⁻¹ nas duas amostras.

É comum detectar culturas lácticas lisadas em queijos maturados por longos períodos, sendo visível a formação de *debris*, que se caracterizam pela formação de dobras na célula morta não absorvidas pela matriz do queijo (BARROS et al., 2009).

O seccionamento, a desidratação e a fixação química das amostras para a análise de microestrutura são laboriosas e podem induzir ao surgimento de artefatos (LOPEZ; CAMIER, GASSI, 2007), desta forma é importante seguir, rigorosamente, as etapas de preparo das amostras a serem analisados.

3.5 Atributos sensoriais em queijos maturados

De acordo com Zambonelli et al. (2002), os aspectos sensoriais dos alimentos fermentados podem ser divididos em pré-fermentativos, fermentativos e pós-fermentativos. O primeiro grupo refere-se aos atributos intrínsecos à matéria-prima, enquanto que na segunda categoria estão àqueles provenientes do desdobramento químico dos substratos, presentes no produto *in natura*. Por último, é possível identificar as características sensoriais desenvolvidas durante o período de maturação (LORTAL; CHAPOT-CHARTIER, 2005). Os queijos de massa dura como Parmesão e suas variedades Grana

Padano e Parmigiano-Reggiano são exemplos clássicos de produtos que carregam as propriedades sensoriais pós-fermentativa (ZAMBONELLI et al., 2002).

As propriedades sensoriais são determinantes na escolha do produto pelo consumidor, podendo ser avaliadas por métodos analíticos e afetivos (MACHADO et al., 2004; WHETSTINE; CADWALLADER; DRAKE, 2005). Os métodos analíticos requerem provadores treinados, enquanto as opiniões pessoais são características marcantes dos testes afetivos (CARVALHO et al., 2005).

Os métodos descritivos, tais como perfil de sabor, perfil de textura e análise descritiva quantitativa (ADQ) são de grande utilidade na solução de diversos problemas associados ao controle de qualidade, estudos de vida de prateleira, desenvolvimento de novos produtos ou a interpretação das preferências dos consumidores (STONE; SIDEL, 1985, citados por VERRUMA-BERNARDI; DAMÁSIO, 2004).

A aparência, textura e sabor são importantes parâmetros empregados na análise sensorial de queijos. Com o objetivo de estudar a análise sensorial de queijos, para uniformizar o treinamento dos provadores e padronizar a metodologia analítica para caracterização de propriedades sensoriais de queijos duros e semi-duros, Lavanchy et al. (1994) e Bérodiér et al. (1997) elaboraram dois guias: *A guide to the sensory evaluation of texture of hard and semi-hard cheeses* e *Guide to smell, aroma and taste evaluation of hard and semi-hard cheeses*. Foram utilizados cinco queijos com denominação de origem controlada (*Appellation d'Origine Contrôlée* - AOC): Comte (França), Parmigiano-Reggiano e Fontina (Itália), Mahón (Espanha) e Appenzeller (Suíça). Posteriormente, Bozzetti (2000) elaborou uma ficha simplificada (Modelo Etana) contendo os atributos sensoriais dos dois guias (GIOMO, 2001).

O Modelo Etana apresenta um diagrama contendo os 14 descritores em uma escala de 5 pontos. Os atributos analisados são: odor, aroma, doce, ácido, salgado, amargo, adstringente, picante, elasticidade, firmeza, friabilidade, adesividade, solubilidade e umidade (BOZZETTI, 2000). Segundo Penna; Hoffmann; Bozzetti (2002) esse modelo permite descrever qualquer tipo de queijo de forma simples e correlacioná-lo à preferência do potencial consumidor.

4. Considerações finais

A qualidade do queijo Parmesão pronto para comercialização pode ser assegurada adotando os requisitos básicos de Boas Práticas de Fabricação, a tecnologia de fabricação empregada, e principalmente, pela seleção de culturas lácticas termofílicas adequadas, que durante a maturação sejam hábeis em promover alterações desejáveis na textura e sabor e aroma do queijo.

5. Referências bibliográficas

AGARWAL, S.; SHARMA, K.; SWANSON, B. G.; YÜKSEL, G. U.; CLARK, S. Nonstarter lactic acid bacteria biofilmes and calcium lactate crystals in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 5, p. 1452-1466, 2006.

BARROS, C. M. V.; CUNHA, C. R.; GALLINA, D. A.; VIOTTO, L. A.; VIOTTO, W. H. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo Prato *light*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 11-18, 2006.

BARROS, J. J. C. **Aptidões tecnológicas de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro - fermento natural - perspectivas à manufatura do Parmesão**. 2005. 43 p. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; FALEIROS JR., L. R.; TABOGA, S. R.; PENNA, A. L. B. Microestrutura e evolução dos componentes químicos na matriz do queijo Parmesão durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (submetido à publicação), 2009.

BELLESIA, F.; PINETTI, A.; PAGNONI, U. M.; RINALDI, R.; ZUCCHI, C.; CAGLIOTI, L.; PALYI, G. Volatile components of Grana and Parmigiano-Reggiano type hard cheese. **Food Chemistry**, London, v. 83, n. 1, p. 55-61, 2003.

BÉRODIER, F.; LAVANCHY, P.; ZANNONI, M.; CASALS, J.; HERRERO, L. ADAMO, C. **Guide to the smell, aroma and taste evaluation of hard and semi-hard cheeses**. Paris: INRA, 1997. não paginado.

BONADÈ, A.; MURELLI, F.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 153-158, 2001.

BOZZETTI, V. Los sellos de Etana, en la origen de las actividades lácteas. **IEL Industrias Lacteas Españolas**, p. 10-11, 2000.

BRASIL. Portaria nº 353, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Parmesão, Parmesano, Reggiano e Sbrinz. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 set. 1997. Seção 1, p. 19684.

BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Seção 1, p. 46-53.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C. L.; DELBONI, R. R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 137-144, 2004.

BUNTHOF, C. J.; SCHALKWIJK, S.; MEIJER, W.; ABEE, T.; HUGENHOLTZ, J. Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 9, p. 4264-4271, 2001.

CANDIOTI, M.C.; HYNES, E.; QUIBERONI, A.; PALMA, S.B.; SABBAG, N.; ZALAZAR, C.A. Reggianito Argentino cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 1, p. 923-931, 2002.

CARVALHO, A. M.; JUNQUEIRA, A. M. R.; VIEIRA, J. V.; BOTELHO, R. Análise sensorial de genótipos de cenoura cultivados em sistema orgânico e convencional. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 805-809, 2005.

CIBIK, R.; CHAPOT-CHARTIER, M. P. Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 459-463, 2004.

COLLINS, Y. F.; McSWEENEY, P. L. H.; WILKINSON, M. G. Evidence for a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 70, n. 1, p. 105-113, 2003.

COPPOLA, R.; NANNI, M.; IORIZZO, M.; SORRENTINO, E.; CHIAVARI, C.; GRAZIA, L. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 80, n. 1, p. 479-490, 2000.

CURI, R. A.; BONASSI, I. A. Elaboração de um queijo análogo ao Pecorino Romano produzido com leite de cabra e coalhada congelados. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 171-176, 2007.

DEAN, M. R.; BERRIDGE, N. J.; MABBITT, L. A. Microscopical observations on Cheddar cheese and curd. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 26, n. 1, p. 77-82, 1959.

DEUTSCH, S. M.; FERAIN, T.; DELCOUR, J.; LORTAL, S. Lysis of lisogenic strain of *Lactobacillus helveticus* in Swiss cheeses and first evidence of concomitant *Streptococcus thermophilus* lysis. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 7, p. 591-600, 2002.

DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; LIMITONE, A.; FOX, P. F.; GOBBETTI, M. Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 7, p. 4503-4514, 2006.

DUDLEY, E. G.; STEELE, J. L. Succinate production and citrate catabolism by Cheddar cheese nonstarter lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 1, p. 14-23, 2005.

FALLICO, V.; TUMINELLO, L.; PEDILIGGIERI, C.; HORNE, J.; CARPINO, S.; LICITRA, G. Proteolysis and microstructure of Piacentinu Ennese cheese made using different farm technologies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 1, p. 37-48, 2006.

FARKEY, N. Y.; FOX, P. F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science e Technology**, Cambridge, v. 1, n. 3, p. 37-40, 1990.

FENELON, M. A.; O'CONNOR, P.; GUINEE, T. P. The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in cheddar cheese during ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 10, p. 2173-2183, 2000.

FENSTER, K. M.; RANKIN, S. A.; STEELE, J. L. Accumulation of short n-chain ethyl esters by esterases of lactic acid bacteria under conditions simulating ripening parmesan cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 9, p. 2818-2825, 2003.

- FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1993. 439p.
- FOX, P. F.; LAW, J. Enzimology of cheese ripening. **Food Biotechnology**, New York, v. 5, n. 3, p. 239-262, 1991.
- FRAU, M.; MULET, A.; SIMAL, S.; MASSANET, J.; ROSSELLÓ, C. Microscopic crystalline inclusions in Mahón cheese. **Food Science and Technology International**, London, v. 3, n. 1, p. 23-47, 1997.
- FURTADO, M. M. **A arte e ciência do queijo**. 2. ed. São Paulo: Globo, 1991. 297p.
- FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos - causas e prevenção**. São Paulo: Metha, 2005. 200p.
- GAIASCHI, A.; BERETTA, B.; POIESI, C. ; CONTI, A. ; GIUFFRIDA, M. G.; GALLI, C. L.; RESTANI, P. Proteolysis of β -casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 60-65, 2001.
- GATTI, M.; FORNASARI, M. E.; LAZZI, C.; MUCCHETTI, G.; NEVIANI, E. Peptidase activity in various species of dairy thermophilic lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 223-229, 2004.
- GIOMO, A. Tasting the cheese and sensory analysis. In: SYMPOSIUM "CHEESE IN ALL THEIR ASPECTS" ANALYTICAL WEEK IDF/ISO/AOAC, de 13-18 de Maio de 2001. **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels, n. 369, p. 30-33, 2001.
- GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 251-260, 2004.
- GOVINDASAMY-LUCEY, S.; JAEGGI, J. J.; BOSTLEY, A. L.; JOHNSON, M. E.; LUCEY, J. A. Standardization of milk using cold ultrafiltration retentates for the manufacture of Parmesan cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 9, p. 2789-2799, 2004.
- HANNON, J. A.; DEUTSCH, S. M.; MADEC, M. N.; GASSI, J. Y; CHAPOT-CHARTIER, M. P; LORTAL, S. Lysis of starters in UF cheeses: behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 16, n. 4, p. 324-334, 2006.
- HANNON, J. A.; WILKINSON, M. G.; DELAHUNTY, C. O.; WALLACE, J. M.; MORRISSEY, P. A.; BERESFORD, T. P. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 4, p. 313-323, 2003.

HÉBERT, E. M.; RAYA, R. R.; TAILLIEZ, P.; GIORI, G. S. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 1-2, p. 19-27, 2000.

INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; PADOVESE, M.; MORET, S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. **Food Chemistry, London**, v. 101, n. 3, p. 1285-1289, 2007.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Industrial**, Rio de Janeiro: IBGE, 2006, 188p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da Produção Pecuária**, Rio de Janeiro: IBGE, 2008, 29p.

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KELLY, A. L.; FOX, P. F. Indigenous enzymes in milk: a synopsis of future research requirements. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 6, p. 707-715, 2006.

KENNY, O.; FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G.; BERESFORD, T.; JORDAN, K. Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 7, p. 509-516, 2003.

KENNY, O. M.; FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G.; BERESFORD, T. P.; JORDAN K. Comparative analysis of the autolytic potential of *Lactobacillus helveticus* strains during Cheddar cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 58, n. 4, p. 207-213, 2005.

KENNY, O.; FITZGERALD, R.J.; O'CUINN, G.; BERESFORD, T.; JORDAN, K. Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 7, p. 797-804, 2006.

KILPI, E. R.; KAHALA, M. M.; STEELE, J. L.; PIHLANTO; A. M.; JOUTSJOKI, V. V. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 8, p. 976-984, 2007.

KLEIN, N.; MAILLARD, M. B.; THIERRY, A.; LORTAL, S. Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 404-411, 2001.

- KOMPRDA, T.; NOVICKÁ, K.; KALHOTKA, L.; SMĚLÁ, D. Biogenic amine content in sterilized and pasteurized long-term stored processed cheese. **Czech Journal Food Science**, Forestry Brno, v. 23, n. 5, p. 209-216, 2005.
- LALOY, E.; VUILLEMARD, J. C.; SODA, M. E.; SIMARD, R. E. Influence of the fat content of Cheddar cheese on retention and localization of starters. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 7, p. 729-740, 1996.
- LAVANCHY, P.; BÉRODIER, F.; ZANNONI, M.; NOËL, Y.; ADAMO, C.; SQUELLA, J.; HERRERO, L. **A guide to the sensory evaluation of textura of hard and semi-hard cheeses**. Paris: INRA, 1994. não paginado.
- LAW, B. A. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. **International Dairy Journal**, Barking, v. 4, n. 11, p. 383-398, 2001.
- LAWRENCE, R. C.; GILLES, J.; CREAMER, L. K. The relationship between cheese texture and flavour. **New Zealand Journal Dairy Science and Technology**, Hamilton, v. 18, n. 3, p. 175-190, 1983.
- LERICHE, F. Alteration of raw-milk cheese by *Pseudomonas* spp.: monitoring the sources of contamination using fluorescence spectroscopy and metabolic profiling. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 33-41, 2004.
- LEROY, F.; VUYST, L. D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Food Science and Technology**, Brussels, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.
- LIN, W.; HWANG, C.; CHEN, L.; TSEN, H. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.
- LOPEZ, C. Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 45, n. 4, p. 497-511, 2005.
- LOPEZ, C.; CAMIER, B.; GASSI, J. Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 3, p. 235-247, 2007.
- LORTAL, S.; CHAPOT-CHARTIER, M. P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6/9, p. 857-871, 2005.
- MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, M. L.; SOARES, F. M.; PEREIRA JÚNIOR, F. N. P. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas

artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 516-521, 2004.

MADADLOU, A.; KHOSROSHAHI, A., MOUSAVI, M. E. Rheology, microstructure, and functionality of low-fat Iranian white cheese made with different concentrations of rennet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 9, p. 3052-3062, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Hall Person, 2004. 624 p.

MARILLEY, L.; CASEY, M. G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. Review article. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 139-159, 2004.

MAZEROLLES, G.; DEVAUX, M. F.; DUBOZ, G.; DUPLOYER, M-H.; RIOU, N. M.; DUFOUR, E. Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 81, n. 4, p. 509-527, 2001.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 4, p.127-144, 2004.

McSWEENEY, P. L. H.; SOUZA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 80, n. 3, p. 293-324, 2000.

MONTANARI, G.; ZAMBONELLI, C.; GRAZIA, L; BENEVELLI, M.; CHIAVARI, C. Release of β -galactosidase from Lactobacilli. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 38, n. 2, p. 129-133, 2000.

MOURA, J. C.; ABREU, L. R.; FURTADO, M. M.; ROSSI, D. A.; CARVALHO, E. P.; PINTO, S. M. Lipólise e avaliação sensorial em queijo tipo Parmesão fabricado com leite resfriado e inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 308, p. 3-8, 1999.

MUNSCH-ALATOSSA, P.; ALATOSSA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Jena, v. 161, n. 4, p. 334-46, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 1232p.

- NOGUEIRA, M. C. L.; LUBACHEVSKY, G.; RANKIN, S. A. A study of the volatile composition of Minas cheese. **Food Science and Technology**, London, v. 38, n. 5, p. 555-563, 2005.
- OGUNBANWO, S. T.; SANNI, A. I.; ONILUDE, A. A. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. **African Journal of Biotechnology**, Abraka, v. 2, n. 7, p. 179-184, 2003.
- ÖKSÜZTEPE, G.; PATIR, B.; ÇALICIOĞLU, M. Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Şavak Tulum cheese. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 29, n. 3, p. 873-879, 2005.
- PARKER, M. L.; GUNNING, P. A.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X.; BROCKLEHURST, T. F. The microstructure and distribution of microorganisms within mature Serra cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 4, p. 523-530, 1998.
- PASTORINO, A. J.; HANSEN, C. L.; McMAHON, D. J. Effect of salt on structure-function relationships of cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 60-69, 2003.
- PENNA, A. L. B.; HOFFMANN, F. L.; BOZZETTI, V. Avaliação sensorial de queijos usando o modelo Etana. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 17-26, 2002.
- PEREIRA, C. I.; GOMES, E. O.; GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Proteolysis in model Portuguese cheeses: effects of rennet and starter culture. **Food Chemistry**, Easton, v. 108, n. 3, p. 862-868, 2008.
- PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; MEINARDI, C. A.; CANDIOTI, M. C.; ZALAZAR, C. A. Substitution of natural whey starter by mixed strains of *Lactobacillus helveticus* in the production of Reggianito Argentino cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 1, p. 45-51, 2004.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Revista Química Nova**. Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.
- PILLIDGE, C. J.; RALLABHANDI, P. S. V. S.; TONG, X.; GOPAL, P. K.; FARLEY, P. C.; SULLIVAN, P. A. Autolysis of *Lactococcus lactis*. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 2-3, p. 133-140, 2002.

QIAN, M.; REINECCIUS, G. Identification of aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 6, p. 1362-1369, 2002.

QIAN, M.; REINECCIUS, G. Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese by a dynamic headspace (Purge-Trap) method. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 18, n. 8, p. 252-259, 2003.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. 608p.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 455p.

ROSSI, D. A. **Isolamento, identificação e caracterização da biodiversidade de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento de laticínios brasileiros**. 2001. 99p. (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

ROSSI, D. A.; ABREU, L. R.; CARVALHO, A. F.; DUARTE, G. C.; BARROS, J. J. C.; SILVA, V. A. Utilização de provas bioquímicas e do perfil de hidrolases de peptideoglicanas para identificação de *Lactobacillus helveticus* e outros lactobacilos termófilos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 392, p. 3-11, 2002.

SAINANI, M. R., VYAS, H. K.; TONG, P. S. Characterization of particles in cream cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 99, p. 2854-2863, 2004.

SALÄUN, F.; MIETTON, B.; GAUCHERON, F. Buffering capacity of dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 22, p. 95-109, 2005.

SALVINI, A.; STROPPIA, A.; CAGNAZZO, M.; PAPPALARDO, P.; BORIO, A.; MANERA, S. Identification of a particular cheese production by trace analysis with nuclear techniques. **Journal of Physics: Conference Series**, Bristol, v. 41, n.5/9, p. 547-550, 2006.

SÁNCHEZ-PONTE, M. D. Maduración acelerada de queso com bactérias lácticas atenuadas termicamente. **Revista Científica FCV-LUZ**, Maracaibo, v. 13, n. 4, p. 299-306, 2003.

SCOLARI, G.; VESCOVO, M. Lysis of *Lactobacillus casei* 5Mn 373 accelerates Grana cheese ripening. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 220, n. 2/3, p. 477-482, 2005.

SHEEHAN, A.; O'LOUGHLIN, C. O.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J.; Cheddar cheese cooking temperature induces differential lactococcal cell permeabilization and autolytic responses as detected by flow cytometry: implications for intracellular enzyme

- accessibility. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 5, p. 1007-1018, 2005.
- SHINODA, T.; KUSUDA, D.; ISHIDA, Y.; IKEDA, N.; KANEKO, K.; MASUDA, O.; YANAMOTO, N. Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 108-113, 2001.
- SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 6. ed. São Paulo: Varela, 2005. 623 p.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 544p.
- SKEIE, S. Characteristics in milk influencing the cheese yield and cheese quality. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jablonna, v. 16, n. 1, p. 130-142, 2007.
- SOOMRO, A. H.; MASUD, T.; ANWAAR, K. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation an human health - a review. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 1, n. 1, p. 20-24, 2002.
- SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Avaliação sensorial de queijo prato obtido por modificações do processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 705-712, 2005.
- STEPANIAK, L. Dairy enzymology. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 2/3, p. 153-171, 2004.
- STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. London: Academic Press, 1985.
- Apud: VERRUMA-BERNARDI, M. R.; DAMÁSIO, M. H. Análise descritiva de perfil livre em queijo mozzarella de leite de búfala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 536-542, 2004.
- TORINO, M. I.; TARANTO, M. P.; SESMA, F.; FONT DE VALDEZ, G. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 846-852, 2001.
- TORRIANI, S.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. An overview on *Lactobacillus helveticus*. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Vandoeuvre, v. 44, n. 1, p. 163-191, 1994.
- VALENCE, F.; DEUSTSCH, S. M.; RICHOUX, R.; GAGNAIRE, V.; LORTAL, S. Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 67, n. 2, p. 261-271, 2000.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; DAMÁSIO, M. H. Análise descritiva de perfil livre em queijo mozarela de leite de búfala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 536-542, 2004.

WHETSTINE, C. M. E.; CADWALLADER, K. R.; DRAKE, M. Characterization of aroma compounds responsible for the rosy/floral flavor in Cheddar cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 8, p. 3126-3132, 2005.

WILKINSON, M. G.; KILCAWLEY, K. N. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6/9, p. 817-830, 2005.

YE, A.; SINGH, H.; TAYLOR, M. W.; ANEMA, S. Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 84, n. 3, p. 269-283, 2004.

ZAMBONELLI, C.; CHIAVARI, C.; BENEVELLI, M.; COLORETTI, F. Effects of lactic acid bacteria autolysis on sensorial characteristics of fermented foods. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 40, n. 4, p. 347-351, 2002.

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.

CAPÍTULO II^{3,4}

¹BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A.; MOURA, C. J.; PENNA, A. L. B. Avaliação do aspecto sanitário e microbiota láctica durante a maturação do queijo Parmesão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 63, n. 364, 2008. (aceito para publicação).

⁴O texto foi formatado de acordo com as normas da Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes.

AVALIAÇÃO DO ASPECTO SANITÁRIO E DA MICROBIOTA LÁTICA DURANTE A MATURAÇÃO DO QUEIJO PARMESÃO

SUMÁRIO

Em produtos lácteos, como o queijo Parmesão, a presença de bactérias do grupo coliformes e do gênero *Staphylococcus* comprometem a qualidade higiênico-sanitária. Esta pesquisa objetivou verificar a qualidade sanitária e viabilidade de bactérias lácticas no leite fluido e queijo Parmesão ao longo do período de estocagem. Os queijos foram produzidos com a adição de diferentes culturas de *Lactobacillus helveticus* (A, Cc₁, D₁ e E₅), submetidos à maturação a 18 °C durante 180 dias, e avaliados quanto a contagem total de bactérias lácticas, bactérias do grupo coliforme e *Staphylococcus* coagulase positiva. O leite empregado em cada processamento foi analisado quanto a incidência destes mesmos bioindicadores, incluindo a avaliação de mesófilos e *Salmonella* sp. Todas as amostras de leite e queijo Parmesão demonstraram conformidade aos padrões legais quanto aos bioindicadores de contaminação avaliados. Os queijos apresentaram qualidade sanitária adequada e presença de bactérias lácticas, que registraram uma redução a partir de 90 dias de maturação.

Palavras chave: bactéria láctica; bioindicadores de contaminação; Parmesão; maturação.

EVALUATION OF SANITARY QUALITY AND LACTIC MICROBIOTA DURING PARMESAN CHEESE RIPENING

ABSTRACT

In dairy products, such as Parmesan cheese, the presence of bacteria from the coliform group and genus *Staphylococcus* compromise the hygienic and sanitary qualities of the product. This research aimed to evaluate the sanitary quality and viability of lactic acid bacteria in the milk and in Parmesan cheeses during the ripening period. The cheeses were produced with the addition of different cultures, *Lactobacillus helveticus* (A, Cc₁, D₁ e E₅), aged at 18°C for 180 days, and evaluated for the total lactic bacteria, coliform bacteria group and coagulase positive *Staphylococcus*. Milk used in each processing was analyzed by the incidence of these same bioindicators, including the assessment of mesophiles and *Salmonella* sp. All milk and Parmesan cheese samples were in accordance with legal standards regarding contamination bioindicators. Cheeses exhibited an adequate sanitary quality and the presence of lactic bacteria, which population reduced after 90 days of ripening.

Key words: lactic bacteria; contamination bioindicators; Parmesan; ripening.

1. Introdução

Dentre as diferentes etapas de fabricação do queijo Parmesão, destaca-se a bioconversão dos constituintes do leite pasteurizado ou *in natura* pelo complexo enzimático da microbiota autóctone e/ou exógena. Estas mudanças químicas e bioquímicas, observadas na coalhada e no queijo ao longo da maturação, quando processadas de forma satisfatória, agregam valor à matéria-prima, e ainda, asseguram a qualidade sensorial do produto pronto para consumo.

A tecnologia de fabricação do queijo Parmesão exige que o leite, integral ou parcialmente desnatado, apresente condições higiênico-sanitárias adequadas e seja isento de resíduos químicos para evitar interferência de forma negativa nas etapas iniciais de fermentação (MARILLEY & CASEY, 2004; FURTADO, 2005).

No Brasil, o queijo Parmesão é comumente fabricado com leite pasteurizado, cujos padrões microbiológicos estão estabelecidos pela Instrução Normativa 51 - IN 51, que regulamenta a produção, identidade e qualidade do leite. De acordo com a IN 51, a contagem de bactérias mesófilas deve ser igual ou inferior a $8,0 \times 10^4$ NMP.mL⁻¹, coliformes termotolerantes não superior a $2,0 \times 10^0$ NMP.mL⁻¹, máximo de $5,0 \times 10^0$ NMP.mL⁻¹ para coliformes totais e ausência de *Salmonella* sp em 25 mL no leite pós-pasteurização (BRASIL, 2002). Esta instrução não recomenda parâmetros para *Staphylococcus* coagulase positiva.

Os carboidratos, lipídios e proteínas presentes no queijo Parmesão são fontes potenciais para a proliferação da microbiota láctica e para o desenvolvimento de microrganismos saprofíticos e patogênicos durante o período de maturação (SALAÜN et al., 2005; ÖKSÜZTEPE et al., 2005). As bactérias da família Enterobacteriaceae, como àquelas do grupo coliforme, quando presentes no queijo podem provocar a formação de olhaduras e trincas em toda sua extensão (COPPOLA et al., 2000; McSWEENEY, 2004; COLOMBARI et al., 2005; SKEIE, 2007).

A análise de bioindicadores de contaminação é comumente utilizada para avaliar a qualidade sanitária de queijos duros como o Parmesão ou de suas variedades, devendo comparar os resultados laboratoriais aos padrões legais vigentes. As indústrias laticinistas, por exemplo, devem respeitar os padrões recomendados pelo Regulamento Técnico Geral Para Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos (BRASIL, 1996) onde devem ser analisadas cinco amostras de queijo pronto para consumo, e no máximo duas podem

apresentar valor máximo de $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ NMP.g⁻¹ para coliformes totais, população entre $1,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^2$ NMP.g⁻¹ para termotolerantes, entre $1,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^3$ NMP.g⁻¹ para *Staphylococcus* coagulase positiva, ausência de *Salmonella* sp em 25 gramas da amostra. Por outro lado, a Resolução RDC n.º 12, de 02 de janeiro de 2001, recomenda o mesmo parâmetro proposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento excetuando análise de coliformes totais (BRASIL, 2001).

Perotti et al. (2004) observaram valores inferiores a 10^2 UFC.g⁻¹ para coliformes totais em Reggianito Argentino maturado por 180 dias. Candiotti et al. (2002) ao analisarem coliformes totais em queijo Reggianito Argentino maturado por 180 dias verificaram valores $< 10^2$ UFC.g⁻¹. Coppola et al. (2000) observaram que em queijo Parmigiano-Reggiano maturado por 150 dias não foram detectados coliformes termotolerantes em nenhum período de maturação do produto.

Nos queijos que requerem longo período de maturação, o mecanismo de proteção natural pode estar associado à degradação do piruvato pela lactato desidrogenase (LDH) resultando em lactato (MADIGAN et al., 2004; NELSON & COX, 2006). Esta reação promove o decréscimo do pH, inibindo morfotipos bacilares e cocos indesejáveis (GIRAFFA, 2004). Ácidos orgânicos e outras substâncias antagônicas como diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas também são mencionados como fatores que restringem a proliferação de microrganismos deteriorantes e patogênicos em queijos maturados (BONADÈ et al., 2001; CLEVELAND et al., 2001; GATTI et al., 2004; SOOMRO et al., 2002; BARROS et al., 2008a).

Barros (2005) observou, *in vitro*, a capacidade de cinco culturas de *Lactobacillus helveticus* autóctones em inibir o desenvolvimento de *Escherichia coli* ATCC 25922, das quais 20% também apresentaram espectro de inibição frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A autora sugeriu o emprego destas culturas na fabricação de fermentos lácticos destinados à produção do queijo Parmesão, como uma alternativa de conservação deste produto ao longo da maturação.

Neste estudo o objetivo foi avaliar o aspecto higiênico-sanitário e a viabilidade de bactérias lácticas no leite pasteurizado e no queijo Parmesão durante o período de maturação.

2. Material e métodos

Foram utilizadas quatro culturas de *L. helveticus* identificadas por Rossi et al. (2002) e caracterizadas por Barros (2005) com perfil autolítico elevado (E₅) e perfil autolítico intermediário (A, D₁). A cultura comercial Cc₁ com perfil autolítico elevado foi utilizada como controle.

A ativação das culturas foi realizada a partir de três repiques sucessivos em caldo *De Man Rogosa e Sharp* - MRS (Difco™ Laboratories, Detroit, EUA) e incubação a 42 °C por 24 horas para garantir a estabilidade da cultura (JORGE et al., 1990). Em seguida, 1,5% da cultura foram inoculados em leite desnatado reconstituído (Itambé, Sete Lagoas, Brasil) a 12 % (LDR_{12%}) previamente aquecido a 42 °C e, posteriormente, incubado na mesma temperatura por 16 horas. A cultura foi resfriada a 5 °C e utilizada no momento da fabricação do queijo (Figura 1).

O pH da cultura lática foi avaliado utilizando o potenciômetro digital PM 608 (Analion®, Ribeirão Preto, Brasil). A viabilidade da cultura lática foi determinada transferindo-se 1 mL da cultura em 9 mL de água peptonada 1% estéril, constituindo-se a diluição 10⁻¹. A partir desta foram realizadas diluições seriadas até 10⁻¹⁰. Posteriormente, 1 mL de cada diluição selecionada foi inoculado, pela técnica de profundidade em placas estéreis, utilizando 15 mL de ágar *De Man Rogosa e Sharp* - MRS (Difco™ Laboratories, Detroit, EUA) como meio de cultura. Após completa solidificação, as placas foram incubadas invertidas a 37 °C em condições anaeróbicas durante 48 horas (adaptação de SILVA et al., 2007). O resultado obtido em cada placa foi multiplicado pela recíproca da diluição e o valor expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro da amostra (UFC.mL⁻¹).

Para a produção dos queijos experimentais, o leite integral *in natura* foi pasteurizado a 65 °C por 30 minutos no tanque encamisado para fabricação de queijo com capacidade de 200 litros. Por se tratar de uma pasteurização lenta, este processamento foi isento de cloreto de cálcio. O leite foi resfriado a 35 °C no próprio tanque e em seguida foi adicionado 1,5 % da cultura lática (FURTADO, 1991) e coalho genético CHY-MAX EXTRA (Chr. Hansen® Inc., Milwaukee, EUA), com força de 1:100.000, suficiente para coagular o leite em 30 minutos.

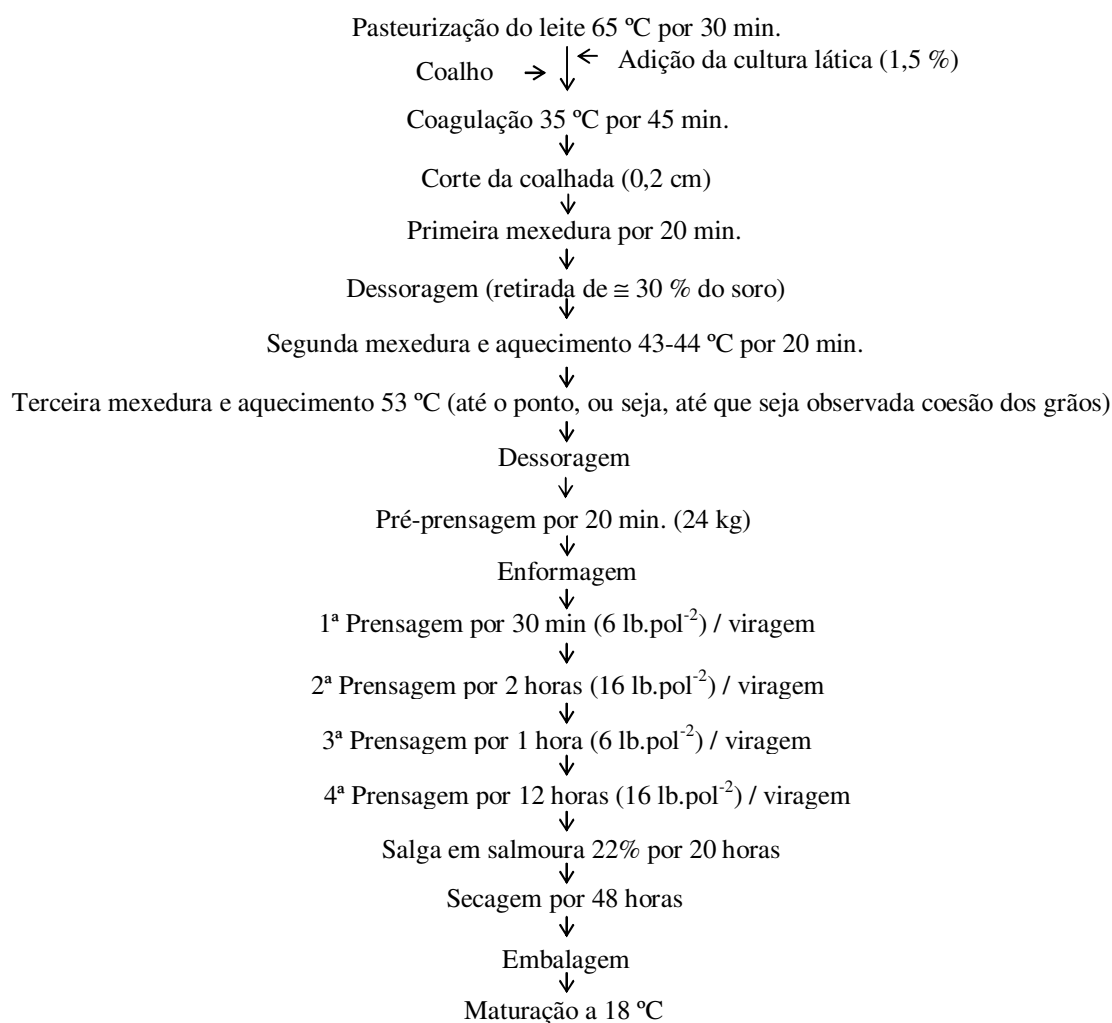


Figura 1. Fluxograma de fabricação experimental do queijo Parmesão.

Foram realizados dois processamentos para cada cultura. Em cada processamento utilizou-se 120 L de leite integral tipo C isento de resíduos de antibióticos, resultando na fabricação de 9 peças de cerca de 1,5 kg, perfazendo um total de 960 L de leite. Os queijos fabricados com as culturas A, Cc₁, D₁ e E₅ foram maturados a 18 °C durante 180 dias de maturação.

2.1 Viabilidade de bioindicadores de contaminação e lactobacilos termófilos no leite pasteurizado e queijo maturado

Para a enumeração dos microrganismos, inicialmente, foram realizadas diluições decimais para as amostras de leite pós-pasteurização e para as amostras de queijos

Parmesão maturados (30, 60, 90, 120, 150, 180 dias). Em 9 mL de água peptonada 1 % estéril foi adicionado 1 mL da amostra de leite, constituindo-se a diluição 10^{-1} , a partir da qual foram realizadas diluições seriadas até 10^{-4} . Para o queijo Parmesão, 10 g da amostra foram transferidas para 90 mL de citrato de sódio 2 %, constituindo-se a diluição 10^{-1} . A partir desta, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-10} utilizando 9 mL de citrato de sódio 2 % como diluente. As diluições foram reservadas para posterior enumeração de bactérias do grupo coliforme, bactérias mesófilas, *Staphylococcus* coagulase positiva e contagem de lactobacilos termófilos (SILVA et al., 2007). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Na contagem de bactérias do grupo coliforme, 1 mL de cada diluição selecionada foi transferida para placas contendo meio de cultura cromogênico *Compact Dry*[®] EC (Nissui Pharmaceutical Co, Tóquio, Japão). Estas placas foram incubadas invertidas a 37 °C durante 24 horas e, posteriormente, foram contadas as colônias características para coliformes totais (cor púrpura) e *Escherichia coli* (cor azul). O resultado foi multiplicado pela recíproca da diluição e o valor expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro - UFC.mL⁻¹, para as amostras de leite, e unidades formadoras de colônias por grama - UFC.g⁻¹, para as amostras de queijo maturado (SILVA et al., 2007).

Os microrganismos mesofílicos foram quantificados apenas para as amostras de leite pela técnica de cultivo em profundidade. Um mL de cada diluição selecionada foi distribuído em placas estéreis, acrescentou-se 15 mL de Ágar Padrão para Contagem - PCA (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Índia) fundido e resfriado a 45 °C. Após completa solidificação as placas foram incubadas invertidas a 37 °C durante 48 horas. O resultado foi multiplicado pela recíproca da diluição e valor expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro da amostra (UFC.mL⁻¹) (SILVA et al., 2007).

Staphylococcus coagulase positiva foi avaliado pelo método de *spreadplate* em ágar *Baird Parker* - BP (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Índia), depositando 0,1mL de cada diluição sobre a superfície do ágar e, com o auxílio de um bastão de vidro tipo *hockey* flambado, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio até a completa absorção. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 48 horas. Foram selecionadas as placas contendo entre 30 e 300 colônias, selecionando as colônias típicas (negras com halo transparente) e atípicas (negras isentas de halo transparente). A partir destas, foram selecionadas três colônias de cada placa, que foram inoculadas em tubos contendo 1 mL de Caldo *Brain Heart Infusion* - BHI (Difco[™] Laboratories, Detroit, EUA), os quais foram

incubados a 37 °C por 24 horas. Após, os cultivos foram analisados em microscopia diferencial de Gram, analisados quanto à presença da enzima catalase e capacidade em coagular o plasma sanguíneo (NewProv[®], Pinhais, Brasil), previamente ressuspendido em solução fisiológica estéril 0,85% (solução de cloreto de sódio - NaCl 0,85%). O resultado foi expresso em UFC.g⁻¹ (SILVA et al., 2007).

A análise de *Salmonella* sp foi realizada apenas para as amostras de leite utilizando o kit Lateral Flow System *Salmonella* (Dupont Qualicon[™], Wilmington, EUA). Para a análise, 25 mL do leite foram adicionados a 225 mL do meio de enriquecimento DuPont[™] Lateral Flow System *Salmonella*, seguida da incubação a 37 °C/24 horas. A seguir, uma alíquota da amostra enriquecida foi aplicada na fita de teste, e a leitura realizada após 10 minutos. A presença de duas linhas vermelhas na fita indica presença de 10⁰ UFC.mL⁻¹ de *Salmonella* sp no leite (SILVA et al., 2007).

A contagem total de lactobacilos termófilos no leite e queijo Parmesão maturado foi realizada utilizando ágar MRS conforme metodologia empregada para verificar a viabilidade da cultura láctica (adaptado de SILVA et al., 2007).

O aspecto higiênico-sanitário do queijo, maturado por seis meses a 18 °C, foi avaliado a partir das mesmas análises, excetuando a investigação de microrganismos mesofílicos e *Salmonella* sp.

2.2 Análise estatística dos dados experimentais

A análise de variância (ANOVA) das amostras foi realizada a partir de um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x6 (culturas x tempos de maturação) e 2 repetições. Foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias das amostras, considerando um nível de significância $p < 0,05$, utilizando o programa computacional SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (ZONTA & MACHADO, 1996).

3. Resultados e discussão

3.1 Qualidade sanitária do leite pasteurizado e do queijo Parmesão maturado

O caráter sanitário do leite é fator essencial à estabilidade microbiológica do Parmesão durante sua maturação (BARROS et al., 2008b). O leite pasteurizado utilizado nos processamentos apresentou conformidade à Instrução Normativa 51, com valor médio para coliformes totais e *Escherichia coli* menores que 1,0 Log UFC.mL⁻¹, valor inferior a 1,0 LogUFC.mL⁻¹ de *Staphylococcus* coagulase positiva e ausência de *Salmonella* sp (BRASIL, 2002). O maior valor médio para microrganismos mesofílicos nas amostras de leite foi de 0,07 Log UFC.mL⁻¹ para o leite utilizado na fabricação do queijo com a cultura D₁, seguido de 0,05 Log UFC.mL⁻¹ para àquele fabricado com a cultura E₅, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Barros et al. (2008b) verificaram resultados semelhantes para estes bioindicadores em leite pasteurizado destinado à produção comercial de queijos Parmesão maturados a 12 °C, registrando também valor máximo de 10² UFC.mL⁻¹ para microrganismos mesofílicos.

O espectro de inibição *in vitro*, obtido por Barros (2005), demonstrou a produção de substâncias antagônicas pelos *Lactobacillus helveticus* autóctones A, Cc₁, D₁ e E₅, com destaque para a cultura D₁, que foi capaz de inibir o desenvolvimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, com halos de inibição de 16,0 mm e 14,1 mm, respectivamente. Provavelmente, esta característica das culturas lácticas tenha sido efetiva também nos ensaios *in situ*, pois nas amostras de queijo Parmesão maturados por 30 a 180 dias, não foi identificado *Escherichia coli* ($< 1,0$ LogUFC.g⁻¹) e *Staphylococcus* coagulase positiva ($< 2,0$ LogUFC.g⁻¹) nas amostras. Todas as amostras analisadas estão de acordo com os padrões legais que sugerem limites máximos de 5,0x10² UFC.g⁻¹ e 1,0x10³ UFC.g⁻¹, para coliformes termotolerantes e *S. coagulase* positiva, respectivamente, para queijos de baixa umidade (BRASIL, 1996). As amostras de queijo Parmesão também estão de acordo com a Resolução RDC n^o. 12, de 02 de janeiro de 2001, que recomenda contagem máxima de 5,0x10² UFC.g⁻¹ para coliformes termotolerantes, ausência de *Salmonella* sp em 25 gramas da amostra investigada e valor não superior a 10³ UFC.g⁻¹ para *Staphylococcus* coagulase positiva (BRASIL, 2001). A incidência de coliformes totais foi registrada apenas nos períodos de 30 e 60 dias de maturação.

Leroy & Vuyst (2004) afirmam que os metabólitos de bactérias lácticas são efetivos

na indução da lise celular de microrganismos patogênicos e/ou saprofiticos. Possivelmente, este fato contribuiu para a redução de coliformes totais no decorrer do período de maturação ($p < 0,05$). Este resultado é favorável sob o ponto de vista tecnológico, pois estes microrganismos estão comumente associados à higiene operacional precária (COPPOLA et al., 2000; RIEDEL, 2005; SILVA JÚNIOR, 2005), e podem também resultar em alterações de sabor e textura do produto (COLOMBARI et al., 2005; SKEIE, 2007).

O decréscimo de coliformes totais ao longo da maturação também foi observado por Perotti et al. (2004) em Reggianito Argentino estocado por 180 dias, não sendo detectados coliformes termotolerantes. Barros et al. (2008b) ao analisarem diferentes lotes de queijo Parmesão comercial fabricado com *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*, verificaram que coliformes totais prevaleceram apenas em um dos lotes aos 30 dias de maturação, com valor médio de $1,2 \times 10^1$ UFC.g⁻¹ e que todos os lotes não apresentaram coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva.

No Brasil, devido às diversas enfermidades que acometem o rebanho leiteiro, diferentemente do que acontece nas regiões italianas, os queijos são fabricados com leite pasteurizado. Provavelmente, o tratamento térmico aliado à ação das proteínas antimicrobianas dos cultivos de *Lactobacillus helveticus*, e também às práticas corretas de higiene empregadas durante todo o processamento do queijo, impediram a proliferação dos patógenos no queijo Parmesão.

3.2 Viabilidade de lactobacilos termófilos durante o período de maturação do Parmesão

A população de lactobacilos termófilos no leite pasteurizado apresentou valores superiores quando comparados àqueles obtidos para microrganismos mesofílicos. Provavelmente, as condições anaeróbicas, aliada aos nutrientes dissolvidos no caldo MRS permitiram que os lactobacilos mantivessem sua homeostasia celular (JAY, 2005).

Houve diferença significativa na população de lactobacilos termófilos no leite empregado nos diferentes processamentos ($p < 0,05$). O valor máximo foi identificado no leite empregado no queijo fabricado com as culturas D₁ e E₅, com valor médio de 2,60 Log UFC.mL⁻¹. Os lactobacilos termófilos remanescentes após pasteurização, podem atuar de forma favorável, juntamente com as culturas adicionadas, agregando características

peculiares ao queijo durante a maturação (CANDIOTI et al., 2002).

O melhor desempenho em leite desnatado reconstituído a 12 % - LDR_{12%} foi observado para a cultura comercial Cc₁, seguida da cultura D₁, as quais apresentaram população média de 10,47 Log UFC.mL⁻¹ e 9,08 Log UFC.mL⁻¹, respectivamente, com diferença estatística significativa (p < 0,05) (Tabela 1). A atividade do microrganismo utilizado para a elaboração da cultura lática deve ser avaliada quanto à sua viabilidade e capacidade acidificante (FURTADO, 1991).

Tabela 1. Viabilidade e pH de *Lactobacillus helveticus* na cultura (LDR_{12%}) incubada a 42 °C por 16 horas, utilizada para fabricação do queijo Parmesão.

Culturas	População de <i>L. helveticus</i> no LDR _{12%} (Log UFC.mL ⁻¹)	pH do LDR _{12%}
A	8,02 ^c	4,79 ^b
Cc ₁	10,47 ^a	4,81 ^a
D ₁	9,08 ^b	4,60 ^d
E ₅	7,76 ^d	4,74 ^c

*Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b, c, d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05).

LDR_{12%}: Leite desnatado reconstituído a 12%.

O teor de sólidos totais presentes no leite usado na fabricação da cultura é parâmetro importante ao metabolismo do microrganismo, garantindo sua atividade ao longo de todas as etapas de produção do queijo. Furtado (1991) afirma que em leite desnatado reconstituído de 12 % de sólidos totais, utilizado conforme o desenvolvimento da cultura, é possível prever um pH final de 4,59 e viabilidade lática de 10⁸ células viáveis.mL⁻¹.

Dentre as culturas utilizadas, a menor população média de lactobacilos termófilos em LDR_{12%} foi registrada na cultura E₅ com 7,76 Log UFC.mL⁻¹, enquanto o menor pH foi igual a 4,60 observado para a cultura D₁ (Tabela 1). Culturas com pH igual ou inferior a 4,3 devem ser rejeitadas, pois afetam, negativamente, a ação do complexo enzimático das células láticas no processo de fermentação (FURTADO, 1991; STEPANIAK, 2004), bem como a competição com células microbianas oportunistas (BERESFORD et al., 2001; BONADÈ et al., 2001; LORTAL & CHAPOT-CHARTIER, 2005) durante a fabricação dos queijos. Nos diferentes queijos, a viabilidade de lactobacilos termófilos apresentou diferença estatística significativa (p < 0,05) ao longo de 6 meses de maturação do queijo Parmesão (Figura 2). Os valores médios da população de lactobacilos termófilos em 30

dias foram de 8,60 Log UFC.g⁻¹, 11,85 Log UFC.g⁻¹, 8,78 Log UFC.g⁻¹ e 8,32 Log UFC.g⁻¹ referente aos queijos fabricados com as culturas A, Cc₁, D₁ e E₅, respectivamente, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Houve redução desta população em períodos próximos aos 60 dias de maturação, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

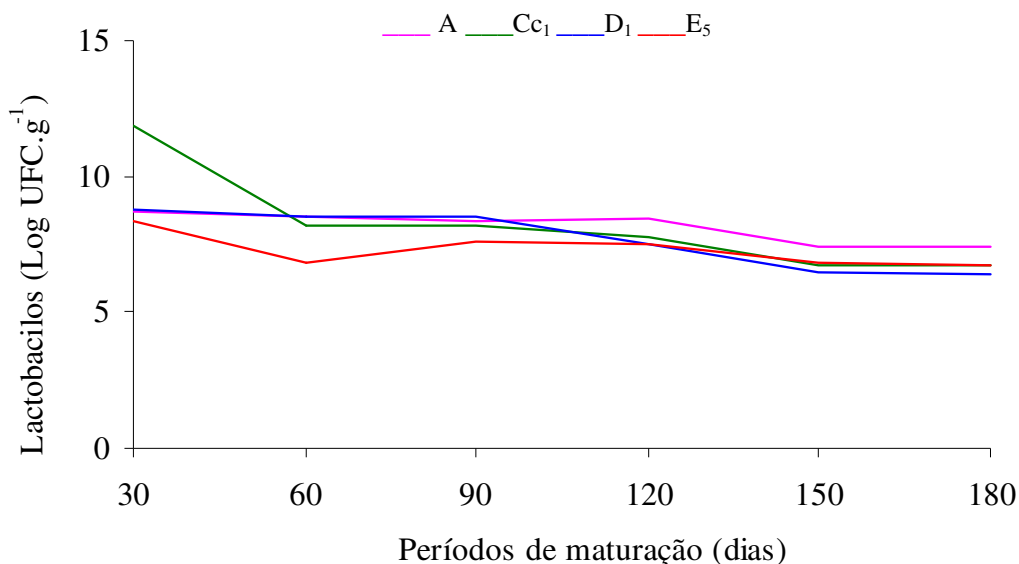


Figura 2. Comportamento das culturas de lactobacilos termófilos nos queijos Parmesão A, Cc₁, D₁ e E₅ maturados a 18 °C durante 180 dias.

Aos 60 dias a menor população de lactobacilos termófilos foi observada para o Parmesão fabricado com a cultura E₅ (6,84 Log UFC.g⁻¹). Aos 90 dias, observa-se a ascensão da cultura E₅, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os maiores valores médios foram observados com o uso das culturas Cc₁ e D₁, 8,37 Log UFC.g⁻¹ e 8,52 Log UFC.g⁻¹, respectivamente. Possivelmente, liberação de aminoácidos ou peptídeos decorrentes da ação de enzimas proteolíticas naturais do leite e coalho, estimularam o acréscimo desta população. As necessidades nutricionais também podem ter sido supridas pelo catabolismo de cofatores oxidados, os quais estão intimamente associados ao sabor e aroma do queijo (SMIT et al., 2005).

Houve decréscimo ($p < 0,05$) da população de lactobacilos termófilos nos queijos maturados por 180 dias. Foram observados 7,42 Log UFC.g⁻¹ no queijo fabricado com a cultura A, 6,73 Log UFC.g⁻¹ para Cc₁, 6,40 Log UFC.g⁻¹ para D₁ e 6,75 Log UFC.g⁻¹ para

E₅ ao término da maturação. Estes valores são similares aos encontrados por Coppola et al. (2000), que detectaram contagens de 6,88 Log UFC.g⁻¹ e 6,44 Log UFC.g⁻¹ em Reggiano Argentino maturado por 30 dias e 150 dias, respectivamente. Candiotti et al. (2002) verificaram contagens médias de a 10⁸ e 10⁶ células viáveis em queijo Reggiano Argentino maturado por 30 e 180 dias, respectivamente.

Barros et al. (2007), ao analisarem diferentes lotes de queijo Parmesão, também detectaram oscilações no crescimento dos lactobacilos termófilos, com 10⁷ UFC.g⁻¹ até 90 dias de maturação, seguido de um decréscimo médio para 10⁶ UFC.g⁻¹ a partir de 150 dias, ou seja, uma redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico.

De acordo com Salaün et al. (2005), a faixa de pH ótimo para o desenvolvimento da espécie *Lactobacillus helveticus* é de 5,5 a 6,5, uma vez que a atividade e estabilidade das suas proteases podem ser afetadas, consideravelmente, em pH 4,5. Embora Vorob'eva (2004) explique que *Lactobacillus* sp auxiliam no decréscimo do pH intracelular simultaneamente à redução do pH extracelular impedindo o choque osmótico, provavelmente isto não foi observado nos períodos iniciais de maturação. O baixo valor de pH pode ter inviabilizado as culturas ou aumentado sua fase de adaptação à matriz do queijo até 60 dias de maturação. Após este período, possivelmente, o efeito tamponante desenvolvido no Parmesão decorrente da ação das endopeptidases, com conseqüente liberação de aminoácidos hidrofóbicos, favoreceu o caráter auxotrófico dos lactobacilos (McSWEENEY, 2004), os quais podem ter assimilado os aminoácidos livres como fontes energéticas adicionais (MADIGAN et al., 2004). Estes microrganismos na presença de alta concentração de íons hidrogênio dissolvidos no queijo, mantiveram sua homeostasia (LEROY & VUYST, 2004) atingindo a fase logarítmica em estágios que antecedem os 90 dias de maturação.

4. Conclusões

A qualidade higiênico-sanitária do leite pasteurizado e do Parmesão nos diferentes períodos de maturação apresentou conformidade aos padrões legais quanto aos bioindicadores investigados. No decorrer da maturação foi registrada redução da população de lactobacilos termófilos até próximo dos 90 dias.

5. Referências bibliográficas

BARROS, J. J. C. **Aptidões tecnológicas de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro - fermento natural - perspectivas à manufatura do Parmesão**. 2005. 43 p. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; PENNA, A. L. B. Lactato desidrogenase como marcador da lise de culturas lácticas durante o período de maturação do queijo Parmesão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 24., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: SBM, 2007. CD-ROM.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A.; ABREU, L. R. Caráter lipolítico em *Lactobacillus helveticus* autóctones. In: SYMPOSIUM ON FOOD SAFETY, 1., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: SBM, 2008a. CD-ROM.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; FALEIROS JR., L. R.; TABOGA, S. R.; PENNA, A. L. B. Microestrutura e evolução dos componentes químicos na matriz do queijo Parmesão durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (submetido à publicação), 2008b.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

BONADÈ, A.; MURELLI, F.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 153-158, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Seção 1, p. 46-53.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.

CANDIOTI, M.C.; HYNES, E.; QUIBERONI, A.; PALMA, S.B.; SABBAG, N.; ZALAZAR, C.A. Reggiano Argentinian cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 1, p. 923-931, 2002.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

COLOMBARI, G.; ALLEGRETTI, A.; MELANI, D.; BETTONI, B.; PECORARI, M. Sviluppo di spore di clostridi nel terreno, negli alimenti zootecnici, nelle feci e nel latte di allevamenti a diverso livello evolutivo in área Parmigiano-Reggiano. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, Parma, v. 56, n. 5, p. 309-344. 2005.

COPPOLA, R.; NANNI, M.; IORIZZO, M.; SORRENTINO, E.; CHIAVARI, C.; GRAZIA, L. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 80, n. 1, p. 479-490, 2000.

FURTADO, M. M. **A arte e ciência do queijo**. 2. ed. São Paulo: Globo, 1991. 297p.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos - causas e prevenção**. São Paulo: Metha, 2005. 200p.

GATTI, M.; FORNASARI, M. E.; LAZZI, C.; MUCCHETTI, G.; NEVIANI, E. Peptidase activity in various species of dairy thermophilic lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 223-229, 2004.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 251-260, 2004.

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JORGE, A. O. C.; VEIRA, S.; HOFLING, J. F.; ALMEIDA, O. P. Determinação da dose letal 50% para *Staphylococcus aureus* (NCTC 8530) em camundongos portadores de tumor de Erlich. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 3, n. 21, p. 228-231, 1990.

LEROY, F.; VUYST, L. D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Food Science & Technology**, Brussels, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LIN, W.; HWANG, C.; CHEN, L.; TSEN, H. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 1, p. 74-81. 2006.

LORTAL, S.; CHAPOT-CHARTIER, M. P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6/9, p. 857-871, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed.; São Paulo: Hall Person, 2004. 624 p.

MARILLEY, L.; CASEY, M. G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. Review article. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 139-159, 2004.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 4, p.127-144, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4. ed., São Paulo: Sarvier, 2006. 1232p.

ÖKSÜZTEPE, G.; PATIR, B.; ÇALICIOĞLU, M. Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Şavak Tulum cheese. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 29, n. 3 p. 873-879. 2005.

PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; MEINARDI, C. A.; CANDIOTI, M. C.; ZALAZAR, C. A. Substitution of natural whey starter by mixed strains of *Lactobacillus helveticus* in the production of Reggianito Argentino cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 1, p. 45-51, 2004.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. 3. ed., São Paulo: Atheneu, 2005. 455p.

ROSSI, D. A.; ABREU, L. R.; CARVALHO, A. F.; DUARTE, G. C; BARROS, J. J .C.; SILVA, V. A. Utilização de provas bioquímicas e do perfil de hidrolases de

peptideoglicanas para identificação de *Lactobacillus helveticus* e outros lactobacilos termófilos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 392, p. 3-11, 2002.

SALÄUN, F.; MIETTONB, B.; GAUCHERON, F. Buffering capacity of dairy products. **International Dairy Journal, Barking**, v. 15, n. 22, p. 95-109, 2005.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 6 ed., 2005. 623 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S, GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela: 3 ed., 2007. 544p.

SKEIE, S. Characteristics in milk influencing the cheese yield and cheese quality. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jablonna, v. 16, n. 1, p. 130-142, 2007.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 591-610, 2005.

SOOMRO, A. H.; MASUD T.; ANWAAR K. Role os lactic acid bacteria (LAB) in food preservation an human healt - a review. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 1, n. 1, p. 20-24, 2002.

STEPANIAK, L. Dairy enzymology. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 2/3, p. 153-171, 2004.

VOROB'EVA, L. I. Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 40, n. 3, p. 217-224, 2004.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: UFPEL, 1996. 109p.

CAPÍTULO III^{5,6,7}

⁵BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A.; MOURA, C. J.; PENNA, A. L. B. Efeito de *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos sobre a evolução dos componentes químicos no queijo Parmesão maturado. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, (submetido à publicação, 2009).

⁶BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; PENNA, A. L.; IZIDORO, L. F. M.; SILVA, G. V.; ROSSI, D. A.; Proteólise da caseína como marcador da maturação do queijo Parmesão. **Revista Química Nova**, São Paulo, (submetido à publicação, 2009).

⁷O texto foi formatado de acordo com as normas da ABNT 6023 (2002).

Efeito de *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos sobre a evolução dos componentes químicos no queijo Parmesão maturado

Resumo

O metabolismo de *Lactobacillus helveticus* autolíticos na fabricação do queijo Parmesão tende a reduzir os custos, uma vez que culturas autolíticas podem acelerar a maturação sem afetar a qualidade do queijo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos sobre a evolução dos componentes químicos do queijo Parmesão maturado. Análises físico-químicas, o monitoramento da lactato desidrogenase (LDH) e a avaliação da proteólise por eletroforese foram realizados em amostras de queijo Parmesão fabricados com *Lactobacillus helveticus* com perfil autolítico elevado (Cc₁, E₅) e perfil autolítico intermediário (A, D₁), a cada 30 dias, durante seis meses. Houve aumento significativo nos teores de acidez, nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS_{pH4,6}) e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (NS_{TCA12%}) em todas as amostras de queijo Parmesão ao longo de 180 dias de maturação, sendo os menores valores observados no queijo fabricado com a cultura Cc₁. Nos queijos fabricados pelas culturas D₁ e E₅, as peptidases foram mais efetivas na liberação dos aminoácidos tirosina e triptofano, sendo observada também nestes queijos a atividade da LDH nos estágios finais de maturação. As diferentes culturas demonstraram comportamento específico, resultando na microheterogeneidade das frações de caseína.

Palavras chave: bactérias ácido-láticas, lactato desidrogenase (LDH), índice de maturação, Parmesão, perfil eletroforético.

Effects of autochthonous *Lactobacillus helveticus* with different autolytic profiles on the evolution of the chemical components of ripened Parmesan cheese

Abstract

The metabolism of autolytic *Lactobacillus helveticus* in the production of Parmesan cheese tends to reduce costs, as autolytic cultures can accelerate the ripening without affecting the quality of cheese. The purpose of this study was to evaluate the effect of autochthonous *Lactobacillus helveticus* with different autolytic profiles on the evolution of chemical components of ripened Parmesan cheese. Physicochemical analysis, the monitoring of lactate dehydrogenase (LDH) and the evaluation of proteolysis by electrophoresis were performed on samples of Parmesan cheese made with *Lactobacillus helveticus* with high autolytic profile (Cc₁, E₅) and intermediate autolytic profile (A, D₁), every 30 days, for 6 months. There was significant increase in levels of acidity, soluble nitrogen in pH 4.6 (NS_{pH4,6}) and soluble nitrogen in trichloroacetic acid (NS_{TCA12%}) in all samples of Parmesan cheese during the 180 days of ripening, with the lowest values observed in the cheese made with the culture Cc₁. In the cheese produced with the cultures D₁ and E₅, peptidase was more effective in releasing the amino acids tyrosine and tryptophan; the activity of LDH in the final stages of ripening was also observed in these cheeses. The different cultures have shown specific behaviors, resulting in microheterogeneity of the fractions of casein.

Key words: lactic acid bacteria, lactate dehydrogenase (LDH), index of ripening, Parmesan, electrophoretic profile.

1. Introdução

A tecnologia de fabricação do queijo Parmesão, desde a fermentação do leite ao queijo maturado, envolve bioconversões glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, processadas a partir de enzimas de alta especificidade, conferindo sabor, aroma e textura peculiares ao produto.

O queijo Parmesão pode ser obtido a partir da coagulação do leite com acidez entre 15 °D a 18 °D, pela ação do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas (BRASIL, 1997). É caracterizado por ser um produto semi-gordo com teor de gordura entre 25,0 % a 44,9 %, apresentando baixa umidade com valor não superior a 36,0 %, consistência dura, textura compacta e granulosa, com crosta espessa de 4 a 8 mm, lisa e cor amarelo-palha. Possui forma cilíndrica, com peso oscilando entre 5 e 10 kg. A temperatura de armazenamento não deve exceder a 18 °C e deve ser maturado por cerca de 6 meses

(BRASIL, 1997). O rendimento da fabricação é em torno de 13 kg de leite.kg⁻¹ de queijo após sua completa maturação (PERRY, 2004).

Na fabricação do Parmesão utiliza-se cultura láctica termofílica capaz de resistir ao cozimento da massa a uma temperatura de até 55 °C. Os principais gêneros que compõem a cultura são *Lactobacillus* e *Streptococcus* que apresentam crescimento ótimo na faixa de temperatura entre 37 °C a 45 °C (DI CAGNO et al., 2006).

A coagulação do leite para a fabricação do queijo Parmesão é iniciada à temperatura de 35 °C (McSWEENEY, 2004; FURTADO, 2005), e segundo Kenny et al. (2003); Marilley e Casey (2004), esta temperatura está abaixo da temperatura ótima de ação do coalho, o que propicia a viabilidade (RAY, 2003; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004) e vitalidade (CIBIK; CHAPOT-CHARTIER, 2004) das células lácticas, mantém o complexo enzimático endógeno ativo (LORTAL; CHAPOT-CHARTIER, 2005; KELLY; FOX, 2006) e impede que a susceptibilidade das micelas de caseínas à proteólise seja afetada (FORTINA et al., 2003; STEPANIAK, 2004; McSWEENEY, 2004).

É importante adotar bactérias lácticas *starters* capazes de metabolizar completamente a lactose, antes que sejam substituídas pela microbiota não *starter* na fabricação de queijos duros (DUDLEY; STEELE, 2005). O metabolismo heterofermentativo da lactose pelas bactérias lácticas pode desencadear gosto amargo (FURTADO, 2005), e ainda, induzir sua cristalização na matriz do queijo (RAJBHANDARI; KINDSTEDT, 2005; AGARWAL et al., 2006). Em queijos duros, a formação de melanoidinas decorrente da catálise incompleta da galactose pode ser evitada pela adição de bacilos galactose positiva, tal como o *L. helveticus* (TORRIANI; VESCOVO; SCOLARI, 1994), pois esta espécie é capaz de sintetizar a enzima galactose-1-fosfato uridil transferase (KLEIN et al., 2001; TORINO et al., 2001), impulsionando a oxidação completa deste substrato.

As vias metabólicas remanescentes, utilizadas por *Lactobacillus helveticus*, ainda são desconhecidas (KLEIN et al., 2001), no entanto, cepas de *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807, quando inoculados no leite, foram capazes de produzir elevados índices de precursores responsáveis pelo sabor e aroma, tais como diacetil, acetaldeídos e compostos sulfurosos (TORINO et al., 2001). Barros et al. (2008a) registraram a capacidade de *Lactobacillus helveticus* comercial Cc₁ e autóctones A, D₁ e E₅ em sintetizarem diacetil a 37 °C quando inoculados em leite desnatado reconstituído 12 % (LDR_{12%}) combinado com

creatina 1 %. Todos os cultivos produziram diacetil, destacando o desempenho da cultura A.

O queijo Parmesão é alvo de intensa atividade proteolítica (ZAMBONELLI et al., 2002; McSWEENEY, 2004; SCOLLARI; VESCOVO, 2005), que confere aroma e sabor ao produto ao longo da maturação (GOVINDASAMY-LUCEY et al., 2004; ANTUNES et al., 2005). Diante do custo elevado que esta etapa representa, é importante a utilização de culturas autolíticas e autolisadas pelas indústrias queijeiras para acelerar o processo de maturação. Os microrganismos autolíticos caracterizam-se por apresentarem lise celular espontânea (VALENCE et al., 2000; ROSSI et al., 2002), enquanto culturas autolisadas são aquelas que sofrem ruptura da parede celular de forma induzida, seja por choques osmóticos, térmicos e a partir de pressurização (FENELON; O'CONNOR; GUINNE, 2000; SÁNCHEZ-PONTE, 2003). Rossi et al. (2002) e Barros (2005) sugeriram o emprego de *Lactobacillus helveticus* com caráter autolítico como alternativa à redução do tempo de maturação para queijos duros sem afetar os parâmetros de qualidade destes produtos. A aceleração da maturação em queijos suíços foi constatada por Valence et al. (2000) quando utilizaram *L. helveticus* autolítico na fabricação desta variedade.

A seleção de culturas termofílicas como *Lactobacillus helveticus*, com potencial acidificante, aromatizante, com perfil autolítico ou uma combinação destas características, pode representar um avanço considerável à tecnologia de fabricação do queijo Parmesão. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo estudar o efeito de *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos sobre a evolução dos componentes químicos do queijo Parmesão maturado.

2. Material e métodos

Foram utilizadas quatro culturas de *L. helveticus* isoladas por Rossi et al. (2002) de soro-fermento de laticínios produtores de queijo Parmesão, Mussarela e Provolone que não utilizavam cultura láctica comercial para a produção dos queijos. As culturas apresentam perfil autolítico elevado (E₅) e perfil autolítico intermediário (A, D₁), conforme caracterizado por Barros (2005). A cultura comercial Cc₁ (Lh-B02, Chr. Hansen[®]) com perfil autolítico elevado foi utilizada como controle. O processamento dos queijos foi

realizado conforme descrito por Barros et al. (2008b) ⁸. Foram realizados dois processamentos para cada cultura, totalizando oito experimentos.

2.1 Caracterização físico-química dos queijos

Os produtos foram avaliados mensalmente, durante os 180 dias de maturação quanto à acidez (SILVA et al., 1997), atividade de água - A_w (VAN DENDER et al., 1995), teores de cinzas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), gordura (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), extrato seco total e extrato seco desengordurado (CASE; BRADLEY JUNIOR; WILLIAMS, 1985), proteína total (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1997), nitrogênio solúvel em pH 4,6 - $NS_{pH4,6}$ e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético - TCA 12 % - $NS_{TCA12\%}$ (SILVA et al., 1997), sal (SILVA et al., 1997), tirosina e triptofano (VAKALERIS; PRICE, 1959) e índices de extensão - IEM ($NS_{pH4,6}/NT\%$) e profundidade da maturação - IPM ($NS_{TCA12\%}/NT\%$) (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

2.2 Atividade da lactato desidrogenase (LDH) como marcador da lise das culturas lácticas no queijo Parmesão

A atividade da LDH foi quantificada, mensalmente, durante 180 dias de maturação (adaptado de HANNON et al., 2006). Em 20 mL de água destilada estéril, foram adicionados 5 g da amostra, previamente triturada, a ser analisada. Após agitação manual, a solução foi mantida a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em sistema Millipore[®] (Millipore Corporation, Bedford, EUA) equipado com filtro de 0,45 μm de porosidade. O filtrado foi submetido à leitura espectrofotométrica ($DO_{340\text{nm}}$) para determinação da atividade da enzima LDH utilizando o Kit LDH Liquiform[®] (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, Brasil). A atividade foi expressa em unidades. mL^{-1} do extrato aquoso ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$).

⁸ Capítulo II.

2.3 Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (UREA - PAGE)

A obtenção das amostras (*pellets*) para aplicação em gel de poliacrilamida *Urea-PAGE* foi realizada conforme adaptação do protocolo sugerido por Hayaloglu et al. (2005). Para cada experimento, mensalmente, 20 gramas de amostra previamente triturada foram misturados, de forma manual, com 400 mL de água destilada durante 5 minutos. Em seguida, o pH desta solução foi ajustado para 4,6 com ácido clorídrico 1 M, sendo posteriormente, mantida em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Após, a amostra foi aquecida à temperatura de 40 °C durante 1 hora, e centrifugada a 2500 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com água destilada por três vezes consecutivas para remoção do sal e, posteriormente, submetido à análise de identificação das frações de caseínas.

O *pellet* foi tratado para a obtenção das frações de caseína empregando a metodologia proposta por Shalabi e Fox (1987). Foram dissolvidos 20 mg do *pellet* em 1 mL de tampão para eletroforese, e posteriormente, agitados por 1 minuto. Em seguida, esta mistura foi aquecida a 50 °C por 5 minutos, e então foi resfriada a temperatura ambiente. Posteriormente, $1,4 \times 10^2$ µg de cada amostra foram distribuídas no gel. A caseína Hammarsten[®] (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizada como padrão.

O empilhamento e separação foram realizados empregando voltagens de 280 V e 300 V, respectivamente. Após a separação das frações e a coloração, os géis foram digitalizados com auxílio de um *scanner ScanJet 6300C* (Hewlett Packard[®], Palo Alto, EUA) para análise quantitativa das frações de caseína (análise densitométrica) e mobilidade eletroforética. Para a análise densitométrica, a densidade das bandas das amostras aplicadas no gel foi comparada com a densidade das diferentes frações da caseína Hammarsten[®], utilizando o programa *ImageMasterTM Total Lab Software 3.0* (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England) e o resultado expresso em porcentagem. A mobilidade eletroforética relativa (R_f) foi obtida pela razão entre a distância de migração de cada banda a partir da origem do gel e a distância entre a origem e o padrão.

2.4 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) das amostras foi realizada a partir de um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x6 (amostras x tempos

de maturação). Foi aplicado teste de Tukey para comparação das médias das amostras, considerando um nível de significância $p < 0,05$, utilizando o programa computacional SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (ZONTA; MACHADO, 1996).

3. Resultados e discussão

3.1 Análises físico-químicas do leite pasteurizado e do queijo Parmesão maturado

O leite utilizado na fabricação dos queijos está condizente com os requisitos físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002) (Tabela 1).

A acidez titulável média variou entre $16,50 \pm 0,17$ °D a $17,50 \pm 0,21$ °D ($p > 0,05$), em conformidade para uma matéria-prima destinada à produção do queijo Parmesão, a qual deve apresentar valor entre $15,0$ °D a $18,0$ °D (BRASIL, 1997; FURTADO, 2005). Candiotti et al. (2002) encontraram acidez de $18,0 \pm 1,0$ °D em leite padronizado com 2,5 % de gordura destinado à fabricação de Reggiano Argentino. Barros et al. (2008c) encontraram resultados semelhantes, $16,5$ °D para o leite utilizado na fabricação do queijo Parmesão comercial. O monitoramento da acidez do leite é imprescindível para assegurar sua estabilidade, sendo, comumente, realizado em indústrias laticinistas.

Tabela 1. Características* físico-químicas do leite pasteurizado empregado no processamento do queijo Parmesão.

Tratamentos	Acidez (°D)	Crioscopia (°H)	Densidade (g.mL ⁻¹)	Gordura (%)	Extrato seco total (%)
L _A	$17,50 \pm 0,21$	$-0,535 \pm 0,02$	$1,031 \pm 0,01$	$3,8 \pm 0,3$	$8,81 \pm 0,10$
L _{Cc1}	$16,50 \pm 0,17$	$-0,535 \pm 0,01$	$1,031 \pm 0,01$	$3,6 \pm 0,6$	$8,73 \pm 0,34$
L _{D1}	$17,00 \pm 0,42$	$-0,534 \pm 0,01$	$1,031 \pm 0,02$	$3,6 \pm 0,5$	$8,77 \pm 0,19$
L _{E5}	$17,00 \pm 0,40$	$-0,535 \pm 0,03$	$1,031 \pm 0,01$	$3,6 \pm 0,3$	$8,72 \pm 0,31$

*Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

**Nenhum dos valores na mesma coluna apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

L_A, L_{Cc1}, L_{D1}, L_{E5}: leite utilizado para fabricação do queijo Parmesão com as culturas A, Cc₁, D₁ e E₅ respectivamente.

Neste estudo, o teor de gordura dos diferentes lotes de leite não apresentou diferença estatística significativa, variando de $3,6 \pm 0,3$ % a $3,8 \pm 0,3$ % ($p > 0,05$).

Geralmente, o queijo Parmesão utiliza leite com 3,0 % a 3,5 % de gordura. Barros et al. (2008c) obtiveram 2,5 % de gordura em amostras de leite pasteurizado utilizado na fabricação do queijo comercial. De acordo com a rotina de cada indústria, o leite pode ser padronizado para posterior produção do queijo. Segundo McSweeney e Sousa (2000), a porção lipídica, aliada aos demais componentes do leite, confere os atributos sensoriais desejáveis ao queijo pronto para comercialização, pois as endoenzimas lácticas também podem hidrolisar a gordura no decorrer da maturação.

Apesar de pequenas variações numéricas, todas as amostras de queijo Parmesão apresentaram características físico-químicas estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) ao longo de 180 dias de maturação, exceto a atividade de água (Tabelas 2 a 5).

Tabela 2. Caracterização * físico-química do queijo Parmesão fabricado com a cultura A e maturado a 18 °C durante 180 dias.

Análises	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
Aw	0,978±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a
Cinzas/ST (%)	5,85±0,15 ^f	6,00±0,01 ^b	5,94±0,01 ^d	5,99±0,08 ^c	5,92±0,01 ^e	6,02±0,10 ^a
Gordura/ST (%)	52,6±0,3 ^c	52,7±0,4 ^b	51,7±0,2 ^e	53,0±0,5 ^a	52,5±0,1 ^d	51,2±0,1 ^f
Proteína total/ST (%)	43,28±1,18 ^a	41,99±0,83 ^e	42,25±0,79 ^d	42,27±0,87 ^d	42,41±0,82 ^b	42,34±0,70 ^c
NS _{pH4,6} /ST (%)	0,53±0,04 ^e	0,63±0,01 ^d	0,67±0,04 ^c	0,67±0,01 ^c	0,77±0,06 ^b	0,87±0,01 ^a
NS _{TCA} /ST (%)	0,25±0,05 ^f	0,50±0,04 ^e	0,52±0,04 ^d	0,62±0,04 ^c	0,64±0,01 ^b	0,65±0,01 ^a
Sal (%)	1,79±0,14 ^a	1,70±0,04 ^d	1,67±0,05 ^f	1,72±0,04 ^b	1,71±0,09 ^c	1,68±0,03 ^e
Umidade (%)	32,14±0,41 ^e	32,38±0,84 ^c	33,35±0,64 ^b	35,56±0,31 ^a	32,14±0,04 ^e	32,35±0,35 ^d

* Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b, c, d, e, f} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 3. Caracterização * físico-química do queijo Parmesão fabricado com a cultura Cc₁ e maturado a 18 °C durante 180 dias.

Análises	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
Aw	0,978±0,01 ^a	0,978±0,01 ^a	0,978±0,01 ^a	0,978±0,01 ^a	0,978±0,01 ^a	0,978±0,01 ^a
Cinzas/ST (%)	6,47±0,53 ^b	6,42±0,40 ^d	6,44±0,53 ^c	6,44±0,55 ^c	6,52±0,37 ^a	6,40±0,61 ^e
Gordura/ST (%)	45,2±0,5 ^b	44,9±0,50 ^c	44,8±0,4 ^c	45,5±0,1 ^a	44,4±0,4 ^d	45,2±0,1 ^b
Proteína total/ST (%)	45,72±0,33 ^a	44,48±0,43 ^d	44,32±0,09 ^e	44,70±0,04 ^c	43,53±1,53 ^f	44,95±0,08 ^b
NS _{pH4,6} /ST (%)	0,63±0,01 ^f	0,74±0,03 ^e	0,84±0,01 ^d	0,90±0,05 ^c	0,94±0,01 ^b	1,19±0,03 ^a
NS _{TCA} /ST (%)	0,29±0,06 ^f	0,60±0,02 ^e	0,70±0,01 ^d	0,72±0,01 ^c	0,79±0,05 ^b	0,81±0,03 ^a
Sal (%)	1,49±0,01 ^c	1,50±0,08 ^b	1,50±0,06 ^b	1,52±0,07 ^a	1,34±0,31 ^e	1,48±0,07 ^d
Umidade (%)	35,29±0,43 ^b	35,40±0,23 ^a	35,03±0,29 ^c	34,94±1,29 ^f	34,99±0,93 ^d	34,96±0,70 ^e

* Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b, c, d, e, f} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 4. Caracterização * físico-química do queijo Parmesão fabricado com a cultura D₁ e maturado a 18 °C durante 180 dias.

Análises	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
Aw	0,978±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a	0,978±0,01 ^a	0,978±0,01 ^a	0,978±0,01 ^a	0,978±0,01 ^a
Cinzas/ST (%)	6,46±0,21 ^c	6,63±0,31 ^a	6,52±0,33 ^b	6,30±0,04 ^d	6,24±0,84 ^e	6,45±0,43 ^c
Gordura/ST (%)	44,1±0,2 ^a	43,2±0,4 ^e	42,9±0,1 ^f	43,3±0,4 ^d	43,4±0,1 ^c	43,6±0,4 ^b
Proteína total/ST (%)	46,00±1,17 ^a	45,51±1,07 ^d	45,10±0,87 ^f	45,19±1,65 ^e	45,77±0,72 ^b	45,61±1,17 ^c
NS _{pH4,6} /ST (%)	0,57±0,01 ^f	0,73±0,04 ^e	0,93±0,02 ^d	0,97±0,01 ^c	0,98±0,04 ^b	1,00±0,05 ^a
NS _{TCA} /ST (%)	0,26±0,03 ^f	0,56±0,01 ^e	0,78±0,01 ^d	0,79±0,02 ^c	0,81±0,06 ^b	0,90±0,02 ^a
Sal (%)	1,20±0,05 ^a	1,19±0,03 ^b	1,14±0,15 ^e	1,15±0,14 ^d	1,18±0,05 ^c	1,14±0,15 ^e
Umidade (%)	34,80±0,33 ^d	34,86±0,13 ^c	34,64±0,43 ^f	34,78±0,81 ^e	35,30±0,93 ^a	35,25±0,09 ^b

* Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b, c, d, e, f} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p < 0,05).

Tabela 5. Caracterização * físico-química do queijo Parmesão fabricado com a cultura E₅ e maturado a 18 °C durante 180 dias.

Análises	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
Aw	0,978±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a	0,979±0,01 ^a
Cinzas/ST (%)	6,24±0,49 ^d	6,25±0,30 ^d	6,35±0,31 ^b	6,38±0,22 ^a	6,34±0,41 ^c	6,38±0,29 ^a
Gordura/ST (%)	48,6±0,5 ^f	49,0±0,5 ^d	50,5±0,4 ^b	50,1±0,2 ^c	49,7±0,4 ^e	50,8±0,4 ^a
Nitrogênio/ST (%)	6,89±0,08 ^d	6,89±0,13 ^d	7,00±0,06 ^b	6,89±0,06 ^d	6,92±0,09 ^c	7,04±0,06 ^a
Proteína total/ST (%)	43,74±0,98 ^a	42,75±1,26 ^f	43,43±0,88 ^d	43,42±0,83 ^e	43,58±1,06 ^c	43,67±0,86 ^b
NS _{pH4,6} /ST (%)	0,47±0,01 ^f	0,65±0,01 ^e	0,88±0,04 ^d	1,04±0,01 ^c	1,06±0,01 ^b	1,12±0,01 ^a
NS _{TCA} /ST (%)	0,35±0,05 ^f	0,49±0,01 ^e	0,66±0,01 ^d	0,72±0,05 ^c	0,73±0,05 ^b	0,79±0,11 ^a
Sal (%)	1,16±0,22 ^f	1,22±0,15 ^b	1,21±0,15 ^c	1,18±0,19 ^e	1,19±0,27 ^d	1,26±0,19 ^a
Umidade (%)	35,19±0,59 ^d	35,04±0,75 ^e	35,36±0,61 ^c	35,50±0,83 ^b	35,50±0,87 ^b	35,71±0,57 ^a

* Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b, c, d, e, f} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p < 0,05).

O menor valor detectado para Aw foi 0,978±0,01 para todos os tratamentos, superiores aos resultados descritos por Barros et al. (2008c), que observaram menor valor médio igual a 0,975±0,01 para queijo Parmesão comercial. Em ambos os casos, os valores de Aw são superiores aos encontrados por Coppola et al. (2000) em Parmigiano-Reggiano, onde foi observado valor de 0,950 em amostras maturadas por 150 dias. Com intuito de evitar perda excessiva de água e conseqüente rachaduras na superfície dos queijos experimentais, os mesmos foram maturados acondicionados em embalagens termo-enclhíveis, após a secagem por 2 dias, justificando os dados obtidos.

O teor de gordura no extrato seco variou de 42,9±0,1 % a 53,0±0,5 % e foi superior àquele observado em queijo Parmesão comercial (41,3±0,4 %), avaliado por Barros et al.

(2008c). Possivelmente, a padronização do teor lipídico do leite em 2,5 % nas amostras comerciais resultou queijos com teores de gordura no extrato seco (GES) inferiores àqueles registrados nesta pesquisa, cujo teor GES na matéria-prima foi de aproximadamente 3,7 % em todos os processamentos.

Conforme os padrões legais, as amostras analisadas podem ser classificadas como queijo semi-gordo (BRASIL, 1996). Malacarne et al. (2006) verificaram em queijo Parmigiano-Reggiano isento de embalagens e maturados durante 96 meses (4 anos), o acréscimo do teor lipídico de 27,45 % para 32,47 %. Estas oscilações foram registradas até o período máximo de 55 meses, sendo justificada pelo decréscimo da umidade dos queijos. Candiotti et al. (2002) observaram em queijos Reggiano Argentino fabricados com *Lactobacillus helveticus* autóctones Lh SF133, Lh SF138 e Lh SF209, maturados por 180 dias isentos de embalagens, valores médios iguais a 41,55 %, 38,80 % e 36,83 % de gordura no extrato seco, respectivamente.

Os maiores teores médios de gordura no extrato seco ($53,0 \pm 0,2$ % e $50,8 \pm 0,4$ %) foram observados para os queijos fabricados com *Lactobacillus helveticus* autóctones A e E₅, respectivamente. O teor de lipídios no queijo A, possivelmente, contribuiu para os melhores escores registrados no atributo aroma da avaliação sensorial (BARROS et al., 2008d). Provavelmente as lipases das culturas de *Lactobacillus helveticus*, mesmo na temperatura na maturação utilizada puderam hidrolisar os lipídios, originando compostos responsáveis pelo aroma do queijo.

Os queijos fabricados com a cultura D₁ apresentaram os maiores valores médios de proteína, com destaque para amostras maturadas por 30 dias ($46,00 \pm 1,17$ %). O menor teor protéico ($41,99 \pm 0,83$ %) foi encontrado nos queijos fabricados com a cultura A maturados por 60 dias. Aos 180 dias de maturação, o maior teor de proteína (46,96 %) foi observado em Reggiano Argentino fabricado com Lh SF 209 (CANDIOTTI et al., 2002). Malacarne et al. (2006) observaram que após 96 meses de maturação o valor médio protéico encontrado em queijos Parmigiano-Reggiano foi igual 54,63 %, superior aos detectados nas amostras experimentais.

As variações dos teores médios de NS_{pH4,6} em 30 dias foram de $0,47 \pm 0,01$ %, $0,53 \pm 0,04$ %, $0,57 \pm 0,01$ % e $0,63 \pm 0,01$ % para amostras de queijo fabricadas com as culturas E₅, A, D₁ e Cc₁, respectivamente. Estes resultados revelam a atividade residual da plasmina e também a ação do coalho, especificamente da quimosina (DELACROIX-BUCHET; FOURNIER, 1992, citado por CANDIOTTI et al., 2002). Barros et al. (2008c)

encontraram valores médios entre $0,24 \pm 0,01$ e $0,25 \pm 0,01$ % em queijo Parmesão comercial maturado por 30 dias. Ao término de 180 dias de maturação, o teor médio de $NS_{pH4,6}$ oscilou entre $0,87 \pm 0,01$ % a $1,19 \pm 0,03$ %.

Segundo Candiotti et al. (2002), o teor de $NS_{TCA12\%}$ permite predizer a ação das peptidases, pois quantifica frações médias e pequenas de peptídeos, aminoácidos e também porções menores de compostos nitrogenados como aminas, uréia e amônia. Nos ensaios experimentais, a maior atividade peptidolítica no Parmesão maturado por 30 dias foi registrado para o queijo fabricado com a cultura E_5 , seguida do queijo Cc_1 , com valores médios iguais a $0,35 \pm 0,05$ % e $0,29 \pm 0,06$ %, respectivamente. Todavia, a partir de 60 dias de maturação, as peptidases presentes no queijo D_1 demonstraram maior efetividade quando comparadas a todas as outras, resultando em maiores teores de $NS_{TCA12\%}$ durante a maturação (Tabela 4).

3.2 Evolução dos componentes químicos durante a proteólise do queijo Parmesão

De acordo com Saläun, Mietton e Gaucheron (2005), a concentração de íons hidrogênio dissolvidos no queijo exerce uma relação direta com o desempenho fisiológico da microbiota láctica, sendo também um fator incisivo na efetividade das reações enzimáticas durante a maturação do queijo. Neste estudo, a capacidade acidificante de cada cultura de *Lactobacillus helveticus* na matriz do queijo apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) ao longo dos 180 dias de maturação. Por outro lado, as amostras dos diferentes tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) aos 180 dias de maturação.

A evolução da acidez nas amostras dos queijos fabricados com a cultura autóctone A, de caráter autolítico intermediário, e com a cultura comercial Cc_1 , de perfil autolítico elevado, foi semelhante nos períodos que antecedem os 120 dias de maturação (Figura 1). O desdobramento da lactose na matriz destes queijos foram os mais elevados até 60 dias, sendo registrado acidez média de $1,36 \pm 0,02$ % e $1,34 \pm 0,01$ %, para os queijos A e Cc_1 , respectivamente. No queijo fabricado com a cultura A, aos 30 dias de maturação, quando comparado aos demais tratamentos, o elevado teor de acidez ($1,03 \pm 0,01$ %), pode ter contribuído para a intensa friabilidade observada sensorialmente (BARROS et al., 2008d).

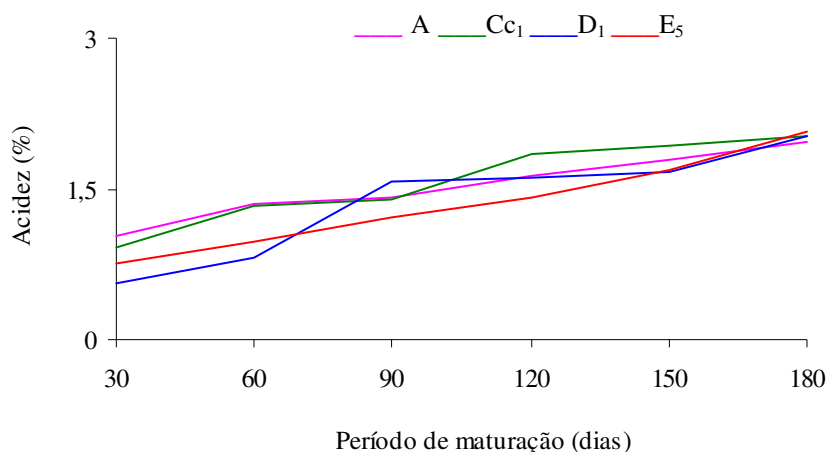


Figura 1. Evolução da acidez titulável (%) no queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.

A fermentação da lactose e produção de ácido lático no queijo Parmesão produzido com a cultura E₅, com caráter autolítico elevado, aumentou gradativamente ao longo do tempo. Esta característica é interessante industrialmente, pois contribui para a padronização desta variedade de queijo. Os valores médios encontrados para acidez em 30 dias, 90 dias e 180 dias foram de $0,75 \pm 0,02$ %, $1,21 \pm 0,03$ % e $2,06 \pm 0,05$ %, respectivamente. A linearidade observada na evolução da acidez no queijo E₅, isenta de oscilações causadas pela liberação de metabólitos da proteólise pode ser comparada ao observado por Barros (2005) em ensaios realizados *in vitro*. Este comportamento sugere a aplicação desta cultura como alternativa para acelerar o processo de maturação do queijo Parmesão.

De modo geral, os teores de acidez foram superiores aos observados em queijo Parmesão comercial aos 180 dias de maturação ($1,77 \pm 0,01$ %). Nas amostras comerciais também houve oscilações no teor de acidez durante todo o período de estocagem (BARROS et al., 2008c). As oscilações nos teores de acidez ocorrem em decorrência da liberação de peptídeos e aminoácidos que possuem porções N e C-terminal livres. Este comportamento é comumente registrado em sistemas proteolíticos como em queijos de massa dura (McSWEENEY, 2004; SALÄUN; MIETTON; GAUCHERON, 2005). A cultura D₁, embora apresente caráter autolítico intermediário, devido à evolução gradativa observada no queijo aos 90 dias de maturação poderia ser aplicada na fabricação de queijos duros que requerem breve período de maturação, tal como o queijo Montanhês.

Neste estudo a liberação dos aminoácidos tirosina e triptofano em todas as amostras de queijos foi efetiva, com diferença estatística significativa durante a estocagem ($p < 0,05$).

Os teores dos aminoácidos (Figuras 2 e 3) aumentaram na matriz dos queijos fabricados ao longo da maturação. A concentração mínima de tirosina detectada no queijo D₁ foi de $122,53 \pm 1,98 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ e valor máximo de $429,27 \pm 0,50 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, sendo $44,55 \pm 0,25 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ e $127,03 \pm 0,50 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ os teores mínimos e máximos de triptofano, respectivamente. No queijo E₅ maturado por 30 dias o teor de tirosina foi de $126,05 \pm 0,12 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ e $342,02 \pm 1,11 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ após 180 dias de estocagem, sendo os teores de triptofano após 30 dias e 180 dias de $47,52 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ e $120,23 \pm 1,24 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, respectivamente.

As proteases no queijo fabricado com as culturas autóctones A e D₁ e cultura comercial Cc₁ demonstraram menor efetividade na liberação do aminoácido tirosina quando comparada àquelas presentes no queijo E₅ a partir de 60 dias de maturação. Possivelmente, a elevada acidez nos queijos A e Cc₁, tenha afetado a atividade do complexo enzimático nestes queijos. A umidade do queijo E₅ (35,38 %), aliada às condições de baixa acidez pode ter favorecido a melhor atividade das proteases neste produto logo no início do período de maturação, resultando em teores mais elevados do aminoácido tirosina no período de 90 dias de maturação.

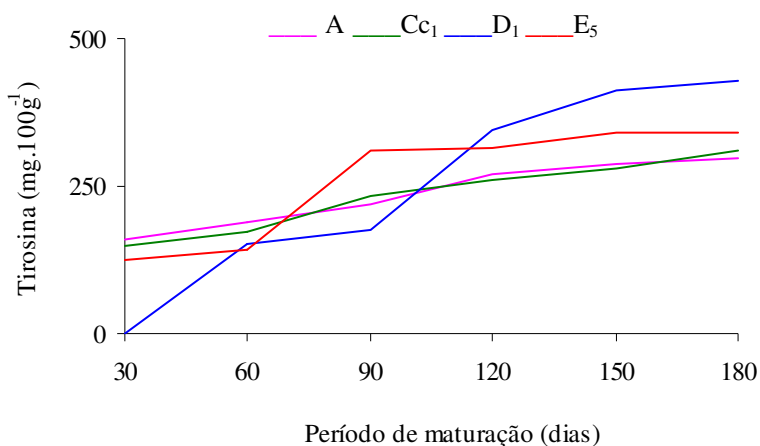


Figura 2. Evolução do teor de tirosina ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) no queijo Parmesão maturado a $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 180 dias.

Os teores médios de tirosina aos 180 dias foram de $297,24 \pm 0,25 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ para o

queijo fabricado com a cultura A e $310,44 \pm 0,53 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ para o queijo produzido com a cultura Cc_1 e os teores de triptofano foram de $119,08 \pm 0,29 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ para o queijo A e $138,80 \pm 0,46 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ para o queijo Cc_1 . Foi observada diferença estatística significativa aos 180 dias ($p < 0,05$).

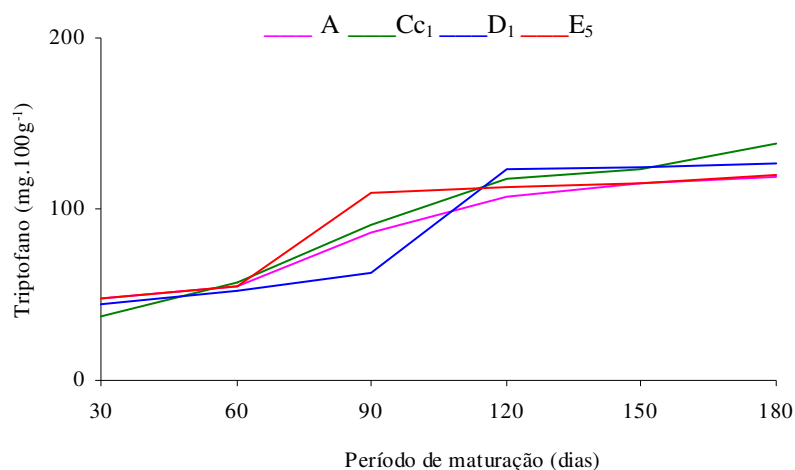


Figura 3. Evolução do teor de triptofano ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) no queijo Parmesão maturado a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 180 dias.

Na superfície de queijos com umidade máxima de 36 % é comum a presença de pigmentos brancos decorrentes da insolubilização da tirosina, indicando alta qualidade do queijo maturado (FURTADO, 2005). Segundo Perotti et al. (2005), o teor deste aminoácido, normalmente apresenta a mesma tendência dos índices de profundidade - IPM ($\text{NS}_{\text{TCA}12\%}/\text{NT}\%$) e extensão da maturação - IEM ($\text{NS}_{\text{pH}4,6}/\text{NT}\%$) (Figuras 4 e 5).

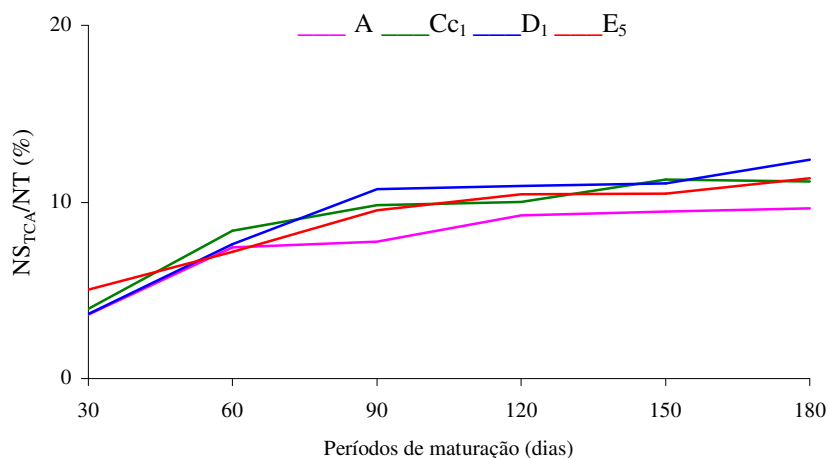


Figura 4. Evolução do índice de profundidade da maturação (%) no queijo Parmesão maturado a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 180 dias.

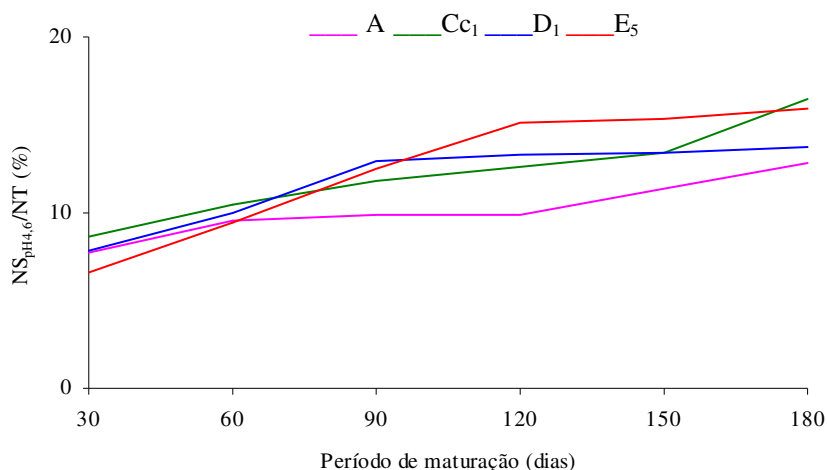


Figura 5. Evolução do índice de extensão da maturação (%) no queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.

A quebra das proteínas durante a maturação é responsável pelo aumento dos teores de nitrogênio solúvel - NS, nitrogênio não-protéico e NH_3 , e, portanto, dos índices de extensão e profundidade da maturação, os quais são calculados a partir das proporções de NS em pH 4,6 e NS em TCA 12% em relação ao nitrogênio total - NT, respectivamente (PEREIRA et al., 2008).

Houve aumento significativo ($p < 0,05$) dos valores de IPM para todas as amostras ao longo do período de maturação. O menor IPM foi igual a $3,62 \pm 0,88$ % observado na amostra A aos 30 dias, e o maior valor na amostra D₁ ($12,39 \pm 0,06$ %) após 180 dias de maturação (Figura 4). Os valores de IPM são valiosos para prever a evolução da proteólise, bem como a atividade da cultura láctica no Parmesão, pois durante a maturação substâncias nitrogenadas como aminoácidos, oligopeptídeos e aminas, resultantes dos processos bioquímicos são acumulados na matriz do queijo, refletindo diretamente nos atributos de aroma e sabor do produto final (FURTADO, 2005; PEREIRA et al., 2008). Este comportamento sugere a potencial aplicação do cultivo D₁ para a obtenção da cultura láctica a ser empregada na fabricação industrial de queijos Parmesão. A cultura E₅ apresentou comportamento similar à cultura comercial Cc₁. Estes resultados podem sugerir também o emprego de cultivos mistos (Cc₁ e A; Cc₁ e D₁; Cc₁ e E₅; A, Cc₁, D₁ e E₅; A, D₁ e E₅) como uma forma de combinar as características destas culturas resultando no Parmesão de melhor qualidade.

No decorrer da maturação, os valores de IEM após 30 e 60 dias para a amostra adicionada da cultura comercial foram os maiores, $8,58 \pm 0,14$ % e $10,47 \pm 0,13$ %, respectivamente.

respectivamente (Figura 5). Este aumento é um bom indicador da atividade proteolítica devido à ação do agente coagulante, onde são determinados os peptídeos de peso molecular alto e médio provenientes das α e β -caseínas, podendo também estar incluídos peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos (CHRISTENSEN et al., 1999; FARKYE; FOX, 1990).

3.3 Atividade da lactato desidrogenase no queijo Parmesão maturado

Os resultados médios obtidos da atividade da lactato desidrogenase (LDH) revelam diferença estatisticamente significativa ao longo do período de maturação para todos os tratamentos ($p < 0,05$). O queijo fabricado com a cultura A apresentou atividade progressiva de LDH até três meses, com valores médios de $0,22 \pm 0,08$ U.mL⁻¹, $0,31 \pm 0,10$ U.mL⁻¹ e $0,55 \pm 0,04$ U.mL⁻¹ em 30, 60 e 90 dias, respectivamente. Por outro lado, este comportamento não foi observado nos queijos Cc₁, D₁ e E₅.

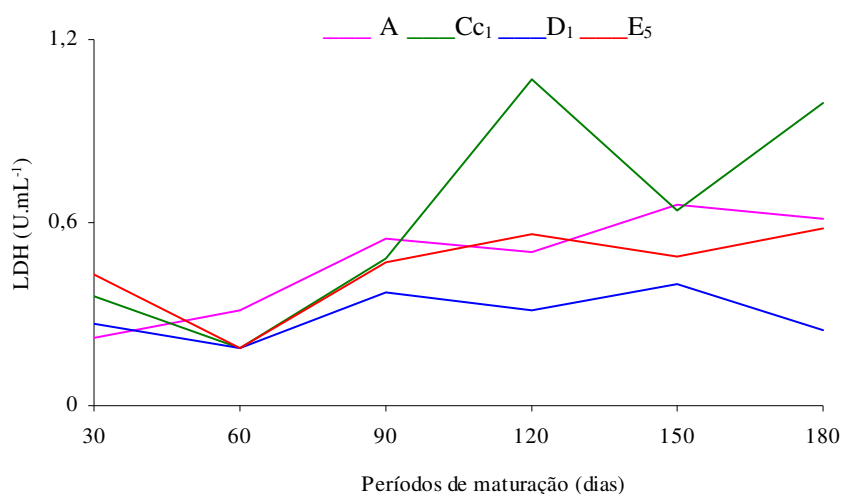


Figura 6. Atividade da enzima LDH na matriz do queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.

A correlação entre a viabilidade das bactérias lácticas em ágar MRS e a atividade da LDH permite prever o momento da liberação da enzima pelas culturas. Todavia, o decréscimo da LDH aos 60 dias não era esperado, pois, neste mesmo estágio houve redução da população de microrganismos lácticos nos queijos Cc₁, D₁ e E₅, contribuindo para a maior liberação da enzima (BARROS et al., 2008b). No queijo Cc₁, a atividade máxima da LDH foi aos 120 dias de maturação, apresentando valor médio $1,07 \pm 0,75$ U.mL⁻¹ seguida de redução aos 150 dias e aumento aos 180 dias, com valores médios de

0,64±0,08 U.mL⁻¹ e 0,99±0,58 U.mL⁻¹, respectivamente (Figura 6). Barros, Azevedo e Penna (2007) verificaram que em amostras de queijo Parmesão comercial fabricados com *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus* maturados a 12 °C por 180 dias, a máxima atividade da enzima LDH foi observada em 90 dias de maturação com 1,20 U.mL⁻¹ (8,17x10⁶ UFC.g⁻¹) sendo associada ao decréscimo da população de lactobacilos quando comparado a 60 dias (3,20x10⁷ UFC.g⁻¹).

Nos queijos Parmesão estudados o decréscimo da atividade da LDH nos mesmos intervalos em que foram registrados redução da população de lactobacilos termófilos pode ser consequência do estado viável não cultivável (VNC) apresentado por estas células. Bunthof e Abee (2002) e Giraffa (2004) classificam a fase de transição entre células viáveis e lisadas como estado de protoplasto. Estes, embora apresentem fragilidade osmótica, permanecem nos queijos devido às condições favoráveis neste ambiente, tais como o efeito tamponante (SALÄUN; MIETTON; GAUCHERON, 2005) e a interação desta microbiota aos substratos do queijo. Em alguns casos, estas bactérias apresentam-se envolvidas por glóbulos de gordura, como observado por Barros et al. (2008c).

Em três meses de maturação, provavelmente pelo avanço da proteólise e consequente liberação de peptídeos e aminoácidos, o queijo tende a atingir uma condição tamponante, potencializando a atividade do complexo enzimático presente no meio extracelular (McSWEENEY, 2004; SALÄUN; MIETTON; GAUCHERON, 2005). Tal fato, possivelmente, esclareça o aumento abrupto da LDH para 1,07±0,75 U.mL⁻¹ no queijo Cc₁ maturado por 120 dias. Kenny et al. (2006) verificaram em queijo Cheddar maior atividade autolítica para a cultura mista de *Lactobacillus helveticus* associada à cultura adjunta *L. helveticus* DPC 4571, apresentando valor de 1,14 U.mL⁻¹. Os autores afirmaram que a atividade da LDH pode auxiliar no desenvolvimento de sabor e aroma do queijo Cheddar durante a maturação.

3.4 Proteólise da caseína como marcador da maturação do queijo Parmesão

Os perfis eletroforéticos das frações insolúveis em pH_{4,6} representam a proteólise do queijo Parmesão fabricado pelas culturas A, Cc₁, D₁ e E₅, analisadas mensalmente, durante 180 dias. Observa-se a degradação das frações da caseína (CN) e a presença de peptídeos menores provenientes da clivagem destas frações (Figura 7). Em todas as

amostras a α_{s1} foi degradada em α_{s1-I} e α_{s1-II} , sendo também identificada a degradação da β -CN em γ_1 , γ_2 e γ_3 .

A degradação da β -CN resultou em fragmentos microheterogêneos de γ -CN com diferentes concentrações nos períodos de maturação estudados, possivelmente pela ação caseinolítica das proteases ligadas à parede celular (PPC) dos *Lactobacillus helveticus*. Estes fragmentos foram menos intensos no queijo fabricado com a cultura Cc₁ (Figura 7).

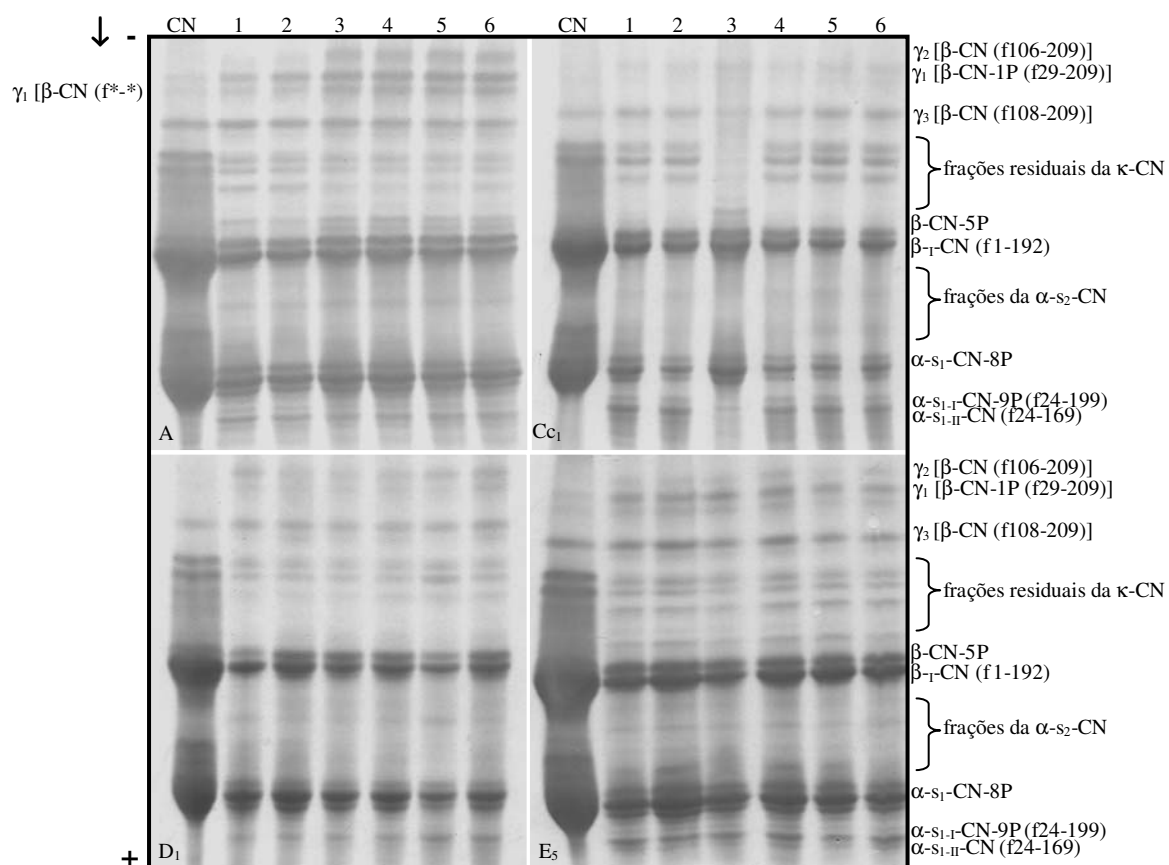


Figura 7. Microheterogeneidade das frações de caseína insolúveis em pH_{4,6} em gel UREA-PAGE obtida em queijo Parmesão fabricado com culturas A, Cc₁, D₁ e E₅ e maturado a 18 °C durante 180 dias. CN: caseína; Linha 1-6: Parmesão maturado por 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias; f*-*:clivagem indeterminada; 1P-9P: número de grupo fosfato.

Mayer, Rockenbauer e Mlcak (1998) registraram os fragmentos β , γ e α -CN em queijos Grana Padano maturado por 6 a 21 meses, e em Parmigiano-Reggiano maturado por 36 e 48 meses. Estas frações também foram relatadas por Antunes et al. (2005) nesta variedade de queijo, entretanto, não foi especificado o período de maturação das amostras investigadas.

Na análise densitométrica foi possível evidenciar diferenças significativas entre todos os tratamentos, nos diferentes períodos de maturação (Tabela 6) ($p < 0,05$).

Tabela 6. Análise densitométrica (%) das frações da caseína do queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.

Frações	Período de Maturação (dias)	A	Cc ₁	D ₁	E ₅
γ_2 [β -CN (f106-209)] R _f 0,054	30	1,93±0,06 ^{1D}	12,44±0,2 ^{1C}	17,88±1,04 ^{1B}	25,23±0,31 ^{1A}
	60	5,78±0,06 ^{1D}	13,17±1,55 ^{1C}	17,05±0,6 ^{1B}	23,22±0,01 ^{1B}
	90	29,03±0,06 ^{1B}	22,44±0,33 ^{1C}	11,81±0,25 ^{1D}	30,56±0,32 ^{1A}
	120	26,12±1,56 ^{1B}	15,16±1,6 ^{1C}	11,82±0,68 ^{1D}	33,75±0,05 ^{1A}
	150	31,34±0,06 ^{1B}	20,51±0,66 ^{1C}	15,73±0,25 ^{1D}	63,02±0,07 ^{1A}
γ_1 [β -CN (f29-209)] R _f 0,113	180	30,42±1,65 ^{1A}	22,00±0,27 ^{1D}	23,38±0,30 ^{1C}	22,84±0,85 ^{1B}
	30	28,22±1,90 ^{1A}	9,94±0,73 ^{1D}	13,19±0,02 ^{1C}	25,83±2,48 ^{1B}
	60	22,89±1,31 ^{1A}	9,37±0,07 ^{1D}	16,34±0,10 ^{1C}	18,42±0,55 ^{1B}
	90	32,52±0,02 ^{1A}	18,22±0,96 ^{1C}	13,31±0,28 ^{1D}	25,97±0,65 ^{1B}
	120	33,23±0,84 ^{1A}	11,76±1,72 ^{1D}	16,14±0,68 ^{1C}	26,25±0,39 ^{1B}
γ_3 [β -CN (f108-209)] R _f 0,229	150	35,58±0,11 ^{1A}	17,40±0,06 ^{1C}	12,31±0,90 ^{1D}	41,89±0,90 ^{1A}
	180	30,42±1,65 ^{1A}	19,54±0,07 ^{1B}	15,92±0,96 ^{1C}	15,42±1,30 ^{1D}
	30	47,13±0,26 ^{1A}	34,29±0,48 ^{1C}	24,60±0,70 ^{1D}	41,19±0,16 ^{1B}
	60	41,67±0,34 ^{1A}	23,08±0,70 ^{1D}	24,66±0,20 ^{1C}	35,71±0,35 ^{1B}
	90	42,34±0,10 ^{1B}	22,33±1,22 ^{1C}	22,28±1,47 ^{1D}	50,57±0,33 ^{1A}
β -CN R _f 0,529	120	38,71±0,28 ^{1B}	28,99±1,60 ^{1C}	20,86±1,07 ^{1D}	56,44±0,24 ^{1A}
	150	41,19±0,09 ^{1B}	35,78±2,82 ^{1C}	23,59±0,38 ^{1D}	56,60±0,50 ^{1A}
	180	38,41±1,67 ^{1B}	37,38±0,45 ^{1C}	26,19±0,81 ^{1D}	40,44±0,30 ^{1A}
	30	81,81±2,56 ^{1D}	98,70±1,84 ^{1C}	99,81±0,27 ^{1B}	99,93±0,10 ^{1A}
	60	86,36±1,01 ^{1A}	76,21±0,2 ^{1D}	83,18±0,67 ^{1C}	84,70±0,08 ^{1B}
α -s ₁ -CN R _f 0,839	90	84,12±0,94 ^{1A}	76,68±2,00 ^{1C}	72,07±0,62 ^{1D}	79,92±0,06 ^{1B}
	120	86,10±0,51 ^{1A}	75,03±1,13 ^{1C}	67,75±0,99 ^{1D}	83,85±3,26 ^{1B}
	150	87,35±0,14 ^{1A}	85,08±0,98 ^{1B}	62,69±0,39 ^{1D}	77,32±0,40 ^{1E}
	180	35,15±1,91 ^{1D}	70,59±0,45 ^{1A}	64,39±0,10 ^{1B}	50,40±0,07 ^{1C}
	30	99,01±1,40 ^{1B}	99,58±1,36 ^{1A}	96,23±0,98 ^{1D}	98,15±0,10 ^{1C}
α -s _{1-I} -CN(f102-199) R _f 0,864	60	93,60±0,72 ^{1A}	65,84±0,54 ^{1D}	87,61±0,10 ^{1B}	89,70±0,08 ^{1B}
	90	94,49±0,55 ^{1A}	85,12±1,39 ^{1B}	77,16±0,55 ^{1D}	80,35±0,18 ^{1C}
	120	95,92±0,28 ^{1A}	60,46±0,61 ^{1D}	78,72±0,51 ^{1C}	82,68±0,39 ^{1B}
	150	91,96±0,71 ^{1A}	64,54±0,02 ^{1D}	74,54±0,61 ^{1B}	69,78±0,21 ^{1C}
	180	28,67±0,22 ^{1D}	61,72±0,28 ^{1B}	64,03±0,08 ^{1A}	49,49±0,48 ^{1C}
α -s _{1-II} -CN(f24-199) R _f 0,929	30	90,40±0,19 ^{1A}	43,31±0,80 ^{1B}	66,53±0,45 ^{1B}	62,93±0,66 ^{1C}
	60	52,26±0,33 ^{1A}	35,86±1,41 ^{1D}	51,47±0,46 ^{1B}	37,42±1,57 ^{1C}
	90	60,59±0,21 ^{1A}	25,74±2,10 ^{1D}	48,42±0,05 ^{1C}	55,47±0,06 ^{1B}
	120	63,24±0,56 ^{1A}	36,08±1,26 ^{1D}	57,05±1,43 ^{1B}	43,94±0,04 ^{1C}
	150	54,23±0,95 ^{1C}	65,44±0,04 ^{1B}	44,82±0,09 ^{1D}	76,67±0,35 ^{1A}
α -s _{1-II} -CN(f24-199) R _f 0,929	180	84,38±1,04 ^{1A}	36,56±0,05 ^{1C}	43,53±0,37 ^{1B}	20,81±0,96 ^{1D}
	30	51,98±0,47 ^{1B}	62,19±1,29 ^{1A}	26,49±1,66 ^{1D}	42,66±0,45 ^{1C}
	60	46,61±0,93 ^{1B}	59,06±1,17 ^{1A}	25,98±1,34 ^{1D}	41,21±0,07 ^{1C}
	90	42,66±0,18 ^{1B}	21,20±0,64 ^{1D}	22,97±1,01 ^{1C}	51,41±0,36 ^{1A}
	120	41,09±1,28 ^{1A}	57,09±0,24 ^{1A}	26,62±1,31 ^{1C}	53,38±0,42 ^{1B}
150	44,49±1,28 ^{1D}	58,25±1,19 ^{1C}	40,55±0,03 ^{1A}	59,20±0,22 ^{1B}	
180	48,35±1,83 ^{1A}	47,01±2,75 ^{1B}	35,61±0,35 ^{1C}	32,26±0,99 ^{1D}	

*Média de dois processamentos.

a, b, c, d, e, f Letras diferentes na mesma coluna para cada uma das frações indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A, B, C, D Letras diferentes na mesma linha para cada uma das frações indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

No queijo fabricado com a cultura A é evidente o surgimento da fração γ_1 [β -CN-1P (f29-209)] em baixa intensidade, $28,22 \pm 1,90$ % e R_f 0,113 aos 30 dias de maturação, intensificando nos períodos subsequentes, com valor máximo igual a $35,58 \pm 0,11$ aos 150 dias de estocagem. Foi possível observar a sedimentação do fragmento γ_1 [β -CN (f*-*)], entretanto sua mobilidade eletroforética relativa e curva densitométrica não foram mensuradas. Também é possível evidenciá-la em 30 dias em baixa intensidade, apresentando concentração superior aos 90 dias, prosseguindo com acréscimo gradativo nos meses posteriores.

No queijo fabricado com a cultura E₅ foi observado comportamento peptidolítico contrário àquele observado nas amostras do queijo A, ou seja, a maior concentração das porções γ_1 [β -CN-1P (f29-209)] foi detectada aos 150 dias de maturação e o menor aos 180 dias, com valores médios iguais a $41,89 \pm 0,90$ % e $15,42 \pm 1,30$ %, respectivamente. Possivelmente, a maior concentração seja consequência da sobreposição de frações peptídicas com semelhante mobilidade eletroforética relativa. Em contrapartida, provavelmente, os baixos teores de γ_1 no final da maturação sejam resultados da clivagem desta fração por proteases liberadas pela microbiota láctica no queijo Cc₁.

Os queijos fabricados com as culturas Cc₁ e D₁ apresentaram discreto desdobramento da β -CN na fração γ_1 , com valor médio de $19,54 \pm 0,07$ % e $15,92 \pm 0,96$ %, respectivamente, aos 180 dias de maturação.

Em todos os eletroforetogramas foram registrados peptídeos da família α_{s2} -CN, que é caracterizada por apresentar migração eletroforética entre β -CN-5P e α_{s1} -CN-8P (SGARBIERI, 2005). Excetuando a amostra do queijo A, até os 150 dias de maturação, foi observada degradação da α_{s1} caseína em α_{s1-I} e α_{s1-II} caseína, com posterior hidrólise destes peptídeos após este período. A maior concentração da fração α_{s1-I} foi detectada aos 30 dias de maturação na amostra do queijo A.

Nas amostras dos queijos Parmesão fabricados com as culturas A, Cc₁, D₁ e E₅ a incidência máxima de α_{s1} -CN foi observada aos 30 dias, com valores médios de $99,01 \pm 1,40$ %, $99,58 \pm 1,36$ %, $96,23 \pm 0,98$ % e $98,15 \pm 0,10$ %, respectivamente ($p < 0,05$). Esta banda persistiu nos períodos subsequentes com redução na concentração, apresentando valores mínimos de $28,67 \pm 0,22$ %, $64,03 \pm 0,08$ % e $49,49 \pm 0,48$ %, para as amostras fabricadas com as culturas A, D₁ e E₅. O queijo fabricado com a cultura Cc₁ apresentou em média $60,46 \pm 0,61$ % de α_{s1} -CN aos 120 dias. A maior degradação da α_{s1} -

CN ocorreu após 150 dias de maturação, provavelmente pela maior intensidade da proteólise neste período, quanto também foi observada maior atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), exceto na amostra do queijo fabricado com a cultura Cc₁, em que a maior atividade da LDH ocorreu aos 120 dias, resultando em menor concentração da fração α_{s1} -CN.

O surgimento da fração α_{s1-I} -CN-9P (f24-199) em todos queijos é característico da proteólise primária, indicando possível ação residual do coalho. Os peptídeos α_{s2} -CN não foram registrados nos queijos fabricados com as culturas A, Cc₁, D₁ e E₅, provavelmente devido ao pequeno período de maturação (6 meses). Nas amostras experimentais a fração α_{s1-II} -CN (f24-169) foi registrada em todos os períodos com R_f igual a 0,929. As frações de α_{s1-I} e α_{s2} -CN não foram detectadas em amostras de queijo Parmesão comercializado na cidade de Campinas - SP, avaliadas por Antunes et al. (2005). Nas pesquisas de Mayer, Rockenbauer e Mlcak (1998), o fragmento α_{s2} -CN foi identificado em Grana Padano maturado por 0 a 21 meses, e em Parmigiano-Reggiano maturado por 36 e 48 meses, sendo relatadas hidrólises sucessivas da α_{s1-I} -CN em α_{s1-II} -CN.

A análise densitométrica da fração α_{s1-II} -CN apresentou resultados não demonstrando qualquer tendência, indicando acúmulo de frações nitrogenadas de mesma migração eletroforética. Possivelmente, o emprego de técnicas cromatográficas aliadas ao perfil eletroforético identificado neste estudo, auxiliaria na análise minuciosa destes fragmentos.

4. Conclusões

Houve aumento significativo nos teores de acidez para todos os tratamentos, com valores aproximados em todos os queijos após 180 dias. Houve evolução nos teores de NS_{pH4,6} e NS_{TCA12%} em todas as amostras de queijo Parmesão ao longo de 180 dias de maturação. No queijo fabricado com as culturas D₁ as peptidases foram mais efetivas na liberação dos aminoácidos tirosina a partir de 120 dias de maturação e para o aminoácido triptofano o maior teor foi observado no queijo Cc₁ aos 180 dias. No queijo Cc₁ foi observada a maior atividade da LDH durante 120 e 180 dias. Os diferentes tratamentos demonstraram comportamento específico, resultando na microheterogeneidade nas frações de caseína.

5. Referências bibliográficas

AGARWAL, S.; SHARMA, K.; SWANSON, B. G.; YÜKSEL, G. U.; CLARK, S. Nonstarter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 11, p. 1452-1466, 2006.

ANTUNES, A. J.; FOLEGATTI, M. I. S., MOTTA, E. M. P.; ALVAREZ, V. B. Electrophoretic patterns of ripened Brazilian cheeses. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 60, n. 3, p. 237-354, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Dairy Products. In: **Official Methods of Analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC, 1997.

BARROS, J. J. C. **Aptidões tecnológicas de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro - fermento natural - perspectivas à manufatura do Parmesão**. 2005. 43 p. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; PENNA, A. L. B. Lactato desidrogenase como marcador da lise de culturas lácticas durante o período de estocagem do queijo Parmesão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 24., 2007, Bern. **Anais...** Brasília: SBM, 2007. CD-ROM. 2007.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A.; ABREU, L. R. Caráter lipolítico em *Lactobacillus helveticus* autóctones. In: SYMPOSIUM ON FOOD SAFETY, 1., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: SBM, 2008a. CD-ROM.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A., MOURA, C. J. PENNA, A. L. B. Aspecto sanitário e microbiota láctica durante a maturação do queijo Parmesão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 364, 2008b.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; FALEIROS JR., L. R.; TABOGA, S. R.; PENNA, A. L. B. Microestrutura e evolução dos componentes químicos na matriz do queijo Parmesão durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (submetido à publicação), 2008c.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A.; MOURA, C. J.; PENNA, A. L. B. Biochemical and sensorial changes in Parmesan cheese manufactured with autochthonous starters of *Lactobacillus helveticus*. In: SYMPOSIUM ON CHEESE RIPENING, 5., 2008,

Bern. **Anais...** Bern: IDF, 2008d. p. 146, Disponível em:<<http://www.cheese2008.ch>>. Acesso em: 02 ago. 2008d.

BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

BRASIL. Portaria nº 353, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Parmesão, Parmesano, Reggiano e Sbrinz. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 set. 1997. Seção 1, p. 19684.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.

BUNTHOF, C. J.; ABEE, T. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 2934-2942, 2002.

CANDIOTI, M. C.; HYNES, E.; QUIBERONI, A.; PALMA, S. B.; SABBAG, N.; ZALAZAR, C. A. Reggianito Argentino cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening process. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 1, p. 923-931, 2002.

CASE, R. A.; BRADLEY JUNIOR, R. L. J.; WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 15.ed. Washington, p.327-404, 1985.

CIBIK, R.; CHAPOT-CHARTIER, M. P. Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 459-463, 2004.

CHRISTENSEN, J. E.; DUDLEY, E. G.; PEDERSON, J. A.; STEELE, J. L. Peptidases and amino acids catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 1-4, p. 217- 246, 1999.

COPPOLA, R.; NANNI, M.; IORIZZO, M.; SORRENTINO, E.; CHIAVARI, C.; GRAZIA, L. Microbiological characteristics of Parmigiano-Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 80, n. 1, p. 479-490, 2000.

DELACROIX-BUCHET, A.; FOURNIER, S. Protéolyse et texture des fromages à pâte cuite pressée. II. Influence de la chymosine et des conditions de fabrication **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 72, n. 1, p. 53-72, 1992.

DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; LIMITONE, A.; FOX, P. F.; GOBBETTI, M. Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 7, p. 4503-4514, 2006.

DUDLEY, E. G.; STEELE, J. L. Succinate production and citrate catabolism by Cheddar cheese nonstarter lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 1, p. 14-23, 2005.

FARKYE, N. Y.; FOX, P. F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 37-40, 1990.

FENELON, M. A.; O'CONNOR, P.; GUINEE, T. P. The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in cheddar cheese during ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 10, p. 2173-2183, 2000.

FORTINA, M. G.; RICCI, G.; MORA, D.; GUGLIELMETTI, S.; MANACHINI, P. L. Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in *Lactobacillus helveticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3238-3243, 2003.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos - causas e prevenção. São Paulo: Metha, 2005. 200p.**

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 251-260, 2004.

GOVINDASAMY-LUCEY, S.; JAEGGI, J. J.; BOSTLEY, A. L.; JOHNSON, M. E.; LUCEY, J. A. Standardization of milk using cold ultrafiltration retentates for the manufacture of Parmesan cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 9, p. 2789-2799, 2004.

HANNON, J. A.; DEUTSCH, S. M.; MADEC, M. N.; GASSI, J. Y.; CHAPOT-CHARTIER, M. P.; LORTAL, S. Lysis of starters in UF cheeses: behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 16, n. 4, p. 324-334, 2006.

HAYALOGLU, A. A.; GUVEN, M.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in Turkish White Brined cheese during ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v. 88, n. 10, p. 3460-3474, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. 533p.

KELLY, A. L.; FOX, P. F. Indigenous enzymes in milk: a synopsis of future research requirements. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 6, p. 707-715, 2006.

KENNY, O.; FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G.; BERESFORD, T.; JORDAN, K. Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 7, p. 509-516, 2003.

KENNY, O.; FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G.; BERESFORD, T.; JORDAN, K. Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 7, p. 797-804, 2006.

KLEIN, N.; MAILLARD, M. B.; THIERRY, A.; LORTAL, S. Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 404-411, 2001.

LORTAL, S.; CHAPOT-CHARTIER, M. P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6/9, p. 857-871, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Hall Person, 2004. 624 p.

MALACARNE, M., FORMAGGIONI, P.; FRANCESCHI, P.; SUMMER, A.; MARIANI, P. Proteolysis and lipolysis of Parmigiano-Reggiano cheese at different ripening periods: 12, 24, 55 and 96 months. **Annali di Facoltà Veterinaria di Parma**, v. 26, p.145-164, 2006.

MARILLEY, L.; CASEY, M. G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. Review article. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 139-159, 2004.

MAYER, H. K; ROCKENBAUER, C.; MLCAK, H. Evaluation of proteolysis in Parmesan cheese using electrophoresis and HPLC. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 78, n. 4, p. 425-438, 1998.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 4, p. 127-144, 2004.

McSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 80, n. 3, p. 293-324, 2000.

PEREIRA, C. I.; GOMES, E. O.; GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. **Food Chemistry**, Easton, v. 108, n. 3, p. 862-868, 2008.

PEROTTI, M. C., BERNAL, S. M., MEINARD, C. A., ZALAZAR, C. A. Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 11, p. 1150-1155, 2005.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Revista Química Nova**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

RAJBHANDARI, P.; KINDSTEDT, P. S. Development and application of image to quantify calcium lactate crystals on the surface of smoked Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 4157-4164, 2005.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. 608p.

ROSSI, D. A.; ABREU, L. R.; CARVALHO, A. F.; DUARTE, G. C; BARROS, J. J. C.; SILVA, V. A. Utilização de provas bioquímicas e do perfil de hidrolases de peptideoglicanas para identificação de *Lactobacillus helveticus* e outros lactobacilos termófilos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 392, p. 3-11, 2002.

SALÄUN, F.; MIETTONB, B.; GAUCHERON, F. Buffering capacity of dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 22, p. 95-109, 2005.

SÁNCHEZ-PONTE, M. D. Maduración acelerada de queso com bactérias lácticas atenuadas termicamente. **Revista Científica FCV-LUZ**, Maracaibo, v. 13, n. 4, p. 299-306, 2003.

SGARBIERI, V. C. Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHALABI, S. I.; FOX, P. F. Eletrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. **Irish Journal of Food Science Technology**, Dublin, v. 11, n. 2, p. 135-151, 1987.

SILVA, P. H. F., PEREIRA, D. B. C., OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. C. G. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. Juiz de Fora: Oficina de Impressão, 1997. 190 p.

STEPANIAK, L. Dairy enzymology. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 2/3, p. 153-171, 2004.

TORINO, M. I.; TARANTO, M. P.; SESMA, F.; FONT DE VALDEZ, G. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 846-852, 2001.

TORRIANI, S.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. An overview on *Lactobacillus helveticus*. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Vandoeuvre, v. 44, n. 1, p. 163-191, 1994.

VAKALERIS, D. G.; PRICE, W. V. Rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, n. 2, p. 264-276, 1959.

VALENCE, F.; DEUSTSCH, S. M.; RICHOUX, R.; GAGNAIRE, V.; LORTAL, S. Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 67, n. 2, p. 261-71, 2000.

VAN DENDER, A. G. F., SEVILHANO, L. A., YOTSUYANAGI, K.; JARDIM, D. C. P. Determinação da atividade de água de queijos usando crioscopia eletrônica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 3, p. 18-26, 1995.

ZAMBONELLI, C.; CHIAVARI, C.; BENEVELLI, M.; COLORETTI, F. Effects of lactic acid bacteria autolysis on sensorial characteristics of fermented foods. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 40, n. 4 p. 347-351, 2002.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: UFPEL, 1996. 109 p.

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.

CAPÍTULO IV⁹

⁹O texto foi formatado de acordo com as normas da ABNT 6023 (2002).

Compostos voláteis, perfil sensorial e análise da microestrutura do queijo Parmesão fabricado com *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos

Resumo

O sabor e o aroma são atributos importantes para qualificar queijos duros como o Parmesão, sendo provenientes das transformações enzimáticas, microbianas e químicas, resultantes do catabolismo do citrato, lactose, gordura e proteínas, com liberação de compostos voláteis na matriz do queijo no decorrer da maturação. A percepção sensorial obtida a partir de análise descritiva quantitativa (ADQ) e teste de preferência, aliadas às técnicas cromatográficas, que complementam a caracterização dos queijos duros permitem identificar ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres, grupos químicos frequentemente observados na variedade Parmesão. A análise da microestrutura é ferramenta adicional para avaliar a textura e interação dos componentes dos queijos, como o Parmesão. Neste trabalho, o objetivo foi identificar os compostos voláteis, avaliar os atributos sensoriais e a microestrutura do queijo Parmesão fabricado com *Lactobacillus helveticus* de perfil autolítico elevado (Cc₁, E₅) e perfil autolítico intermediário (A, D₁). As amostras do queijo maturado por 60, 120 e 180 dias foram submetidas à análise em cromatógrafo gasoso HP, após prévia concentração das substâncias voláteis por *head-space*. A análise descritiva quantitativa (ADQ) foi empregada nas amostras maturadas por 90 a 180 dias. A análise da microestrutura foi realizada, mensalmente, nas amostras de queijo maturados por 180 dias, empregando microscópio eletrônico de transmissão - MET e no queijo E₅ maturado por 30 e 60 dias empregando a microscopia eletrônica de varredura - MEV. Ao longo de 180 dias de maturação foi registrada a presença de acetato de etila, acetona, n-butiraldeído e propanol em todos os queijos analisados. Valeraldeído não foi detectado apenas no queijo Cc₁ aos 60 dias de maturação e o composto acetato de n-butila não foi detectado nos queijos fabricados com a cultura D₁. O composto 2,3 butanodiona apresentou decréscimo até níveis não detectáveis nas amostras A, Cc₁ e D₁ aos 180 dias. A ADQ demonstrou semelhança no perfil sensorial dos queijos D₁ e E₅ e ambos apresentaram discreta diferença quando comparados ao queijo fabricado com a cultura comercial, que foi o preferido sensorialmente. As amostras não apresentaram um perfil aromático claramente definido, com oscilações no perfil cromatográfico e perfil sensorial durante o período de estudo. Foi registrada interação entre as culturas lácticas e os lipídios em MET e de lipídios com a matriz protéica em MEV.

Palavras-chave: análise descritiva quantitativa, compostos voláteis, microestrutura, *Lactobacillus helveticus*, maturação, Parmesão.

Volatile compounds, sensory profile and microstructure analysis of Parmesan cheese made with autochthonous *Lactobacillus helveticus* with different autolytic profiles

Abstract

The flavor and aroma are important attributes to qualify hard cheeses such as Parmesan. They come from enzymatic, microbial and chemical transformations resulting from the catabolism of citrate, lactose, fat and protein, with the release of volatile compounds in the matrix of the cheese during the ripening. The sensory perception obtained from quantitative descriptive analysis (QDA) and test of preference, allied to chromatographic techniques, which complement the characterization of hard cheese, allow the identification of acids, alcohols, aldehydes, ketones and esters, chemical groups often observed in Parmesan cheeses. The analysis of the microstructure is an additional tool to evaluate the texture and interaction of the components of cheeses such as Parmesan. In this research, the objective was to identify the volatile compounds, to evaluate the sensory attributes and microstructure of Parmesan cheese made with *Lactobacillus helveticus* of high autolytic profile (Cc₁, E₅) and intermediate autolytic profile (A, D₁). Samples of the ripened cheese at 60, 120 and 180 days were subjected to analysis by gas chromatography HP, after previous concentration of volatile substances by head-space. The quantitative descriptive analysis (QDA) was used in ripened samples at 90 and 180 days. The analysis of the microstructure was undertaken every month, in samples of ripened cheese during 180 days, using a transmission electron microscope – TEM and in cheese E₅ ripened during 30 e 60 days, using a scanning electron microscope - SEM. During the 180 days of ripening the presence of ethyl acetate, acetone, propanol and n-butyraldehyde in all analysed cheese was detected. Valeraldehyde was not detected only in cheese Cc₁ at 60 days of ripening, and the compound n-butyl acetate was not detected in cheeses made with the culture D₁. The compound 2,3 butanodione decreased to non-detectable levels during the 180 days in samples A, D₁ and Cc₁. The QDA showed similarity in the sensory profile of the cheese D₁ and E₅ and both showed a slight difference when compared to cheese made with the commercial culture, which was preferred by the taste panel. The samples did not show a clear aromatic pattern, with changes in the chromatographic and sensory profiles during the studied period. Electronic microstructure showed an interaction between lactic acid cultures and lipids using TEM and lipids with protein matrix using SEM.

Key words: quantitative descriptive analysis, volatile compounds, microstructure, *Lactobacillus helveticus*, ripening, Parmesan.

1. Introdução

O perfil sensorial dos queijos de massa dura, como àquele observado em queijo Parmesão, está intimamente associado à origem e tratamento do leite, tipo e quantidade de culturas *starters* adicionadas, condições do processo de fabricação e tempo/temperatura de maturação. Durante o processo de cura, o queijo adquire aroma e sabor provenientes das transformações enzimáticas e químicas, resultantes do catabolismo do citrato, lactose, gordura e proteínas (DI CAGNO et al., 2003; PEROTTI et al., 2004; HANNON et al., 2005).

Nos queijos, a formação de sabor e aroma é decorrente da atividade das enzimas lipase e plasmina presentes no leite, enzimas do coalho e das bactérias ácido-láticas (LAB), envolvendo transformações bioquímicas classificadas em primárias e secundárias. As reações primárias abrangem o metabolismo do citrato e degradação da lactose residual, lipólise e proteólise, enquanto nas reações secundárias são utilizados como substratos os ácidos graxos e aminoácidos, produtos resultantes dos eventos primários (FOX et al., 2000; McSWEENEY, 2004).

Os produtos da catálise do citrato e oxidação do lactato pelas bactérias lácticas não *starters* (NSLAB) incluem acetato, etanol e ácido fórmico. O diacetil também é uma substância proveniente do metabolismo do citrato por cultivos lácticos como *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris* e *Leuconostoc lactis* (STEPANIAK, 2004; SMIT; SMIT; ENGELS, 2005).

As lipases atuam sobre os monoacilgliceróis, diacilgliceróis e tributirina presentes no leite (STEPANIAK, 2004). Embora a lipase de *L. helveticus* apresente baixa atividade, o longo tempo de maturação do queijo Parmesão permite à enzima atuar na posição *sn-3* e promover a liberação de ácidos graxos esterificados (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003; STEPANIAK, 2004). O metabolismo dos ácidos graxos resulta na formação de substâncias voláteis como metil éster, propil éster, butil éster, tioéster, metanotiol e 2-metil cetona (McSWEENEY, 2004).

No queijo Parmesão e em suas variedades Grana Padano, Parmigiano-Reggiano e Reggiano Argentino, são empregados métodos analíticos e afetivos para avaliar as características sensoriais relacionadas às reações pós-fermentativas (BARBIERI et al., 1994; BELLESIA et al., 2003; McSWEENEY, 2004; PEROTTI et al., 2005; QIAN; REINECCIUS, 2006).

Compostos de baixo peso molecular são comumente identificados e quantificados em queijo Parmigiano-Reggiano provenientes de reações químicas dos aminoácidos (QIAN; REINECCIUS, 2002; BELLESIA et al., 2003; QIAN; REINECCIUS, 2003), tais como 2-metil propanol, 2-metil butanol, 3-metil butanol, fenilacetaldéido, etil butanoato, etil hexanoato, etil octanoato, diacetil, 2-heptanona, 2-nonanona, dimetil trissulfito, metional, 2,6-dimetil pirazina, ácidos butanóico, hexanóico e octanóico. As proteinases e peptidases atuam sobre as frações protéicas, principalmente àquelas liberadas pela ação do coalho, produzindo compostos de baixo peso molecular (FARKYE; FOX, 1990).

Barros et al. (2008a) ao analisarem compostos voláteis em queijo Parmesão comercial maturado por 180 dias, empregando a técnica de concentração por *head-space*, consideraram-na eficiente na identificação de grupos aromáticos como álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres a partir da cromatografia gasosa.

A qualidade do queijo pode também ser avaliada pelos atributos sensoriais que apresentam, empregando testes de preferência ou análise descritiva quantitativa - ADQ (MACHADO et al., 2004 citados por WHETSTINE; CADWALLADER; DRAKE, 2005; HANNON et al., 2005). Para a ADQ são necessários provadores hábeis em distinguir descritores pré-determinados relacionados aos parâmetros de sabor, aroma e textura (MACHADO et al., 2004). Diante da importância que estes atributos apresentam para qualificar queijos duros e semi-duros como o queijo Parmesão, a Federação Internacional de Laticínios (*International Dairy Federation - IDF*) uniformizou os descritores com a elaboração de dois guias: *A guide to the sensory evaluation of texture of hard and semi-hard cheeses* e *Guide to smell, aroma and taste evaluation of hard and semi-hard cheeses* (LAVANCHY et al., 1994).

Segundo Bozzetti (2000), o Modelo Etana apresenta um diagrama contendo os 14 descritores, odor, aroma, doce, ácido, salgado, amargo, adstringente, picante, elasticidade, firmeza, friabilidade, adesividade, solubilidade e umidade, em uma escala de 5 pontos para caracterização de queijos de diferentes tipos. O inconveniente deste modelo consiste em avaliar atributos ausentes na variedade Parmesão, como a adstringência e elasticidade. Em contrapartida, o mesmo permite descrever qualquer tipo de queijo de forma simples e correlacioná-lo ao perfil do potencial consumidor (PENNA; HOFFMANN; BOZZETTI, 2002).

O odor refere-se à percepção das substâncias voláteis pelos receptores olfativos, enquanto o aroma consiste na percepção destes compostos a partir da degustação do

produto (CHAVES, 1998). Atributos de sabores primários doce, ácido, salgado e amargo são aqueles produzidos por estímulos provenientes de soluções aquosas de açúcares, ácidos, sais inorgânicos e quinina/cafeína, respectivamente (CHAVES, 1998; VERRUMBERNARDI; DAMÁSIO, 2004). A característica adstringência descreve a sensação resultante da contração da mucosa da boca, tal como produzida pelo tanino. O caráter picante é definido como a sensação física, percebida na língua independente da temperatura, gosto ou odor e pode ser causado por substâncias como pimenta e gengibre (LAVANCHY et al., 1994; CHAVES, 1998). As propriedades de textura, tais como elasticidade, firmeza e friabilidade referem-se, respectivamente, a taxa de recuperação de um material ao sofrer uma deformação, resistência do produto à deformação e forma/força com que o produto se fragmenta (LAVANCHY et al., 1994; CHAVES, 1998). A solubilidade é a dissolução do produto quando em contato com a saliva, enquanto que a umidade descreve a percepção da umidade liberada pelo queijo (LAVANCHY et al., 1994; CHAVES, 1998).

A formação e manuseio da coalhada afetam sua capacidade de reter gordura e umidade, influenciando assim sua composição e conseqüentemente sua textura (BENEVIDES et al., 2000). Nos períodos que antecedem a atividade proteolítica, a matriz caseínica apresenta caráter elástico, entretanto, no decorrer da maturação, a ação conjunta das proteases e peptidases resulta em uma característica mais rígida da matriz (LAWRENCE; GILLES; CREAMER, 1983). A compactação da microestrutura é decorrente da redução gradual da umidade causada pela evaporação da água na superfície do queijo (McSWEENEY, 2004). Estas mudanças podem ser monitoradas pelo emprego da microscopia eletrônica de transmissão - MET e eletrônica de varredura - MEV (FRAU et al., 1997). Em se tratando da variedade Parmesão, a escassez de trabalhos sobre sua microestrutura, revela a necessidade de estudos mais detalhados sobre esta temática.

Neste trabalho, o objetivo foi identificar os compostos voláteis e avaliar os atributos sensoriais e a microestrutura do queijo Parmesão fabricado com *Lactobacillus helveticus* comercial e autóctones, com diferentes perfis autolíticos.

2. Material e métodos

Foram utilizadas quatro culturas de *L. helveticus* caracterizadas por Rossi et al., (2002) e Barros (2005): E₅ com perfil autolítico elevado e A e D₁ com perfil autolítico

intermediário. A cultura comercial Cc₁ (Lh-B02, Chr. Hansen[®]) com perfil autolítico elevado foi utilizada como controle. O processamento dos queijos foi realizado conforme descrito por Barros et al. (2008b). Foram realizados dois processamentos para cada cultura. Em cada processamento utilizou-se 120 L de leite integral pasteurizado isento de resíduos de antibióticos, resultando na fabricação de nove peças de aproximadamente 1,5 kg.

2.1 Perfil dos compostos voláteis

As amostras de queijo Parmesão, maturadas por 60, 120 e 180 dias a 18 °C, foram trituradas em granulometria de 3 mm, e 2 g de amostra de cada período foram acondicionadas em frascos de vidro, devidamente vedados com *Parafilm*[®] M (Marienfeld, Bad Mergentheim, Alemanha) e mantidos a -18 °C até o momento da análise.

Todas as análises qualitativas foram efetuadas no cromatógrafo gasoso 5890 Séries II (Hewlett Packard[®], Palo Alto, EUA), empregando-se uma coluna capilar HP-FFAP de polietilenoglicol (50 m x 0,22 mm x 0,5 µm) e detecção por ionização de chama (FID), modo *split*, com uma razão de divisão de 1:20.

Os compostos voláteis foram capturados pela técnica de *head-space* utilizando uma fibra de micro-extração em fase sólida, constituída de *carboxen/polidimetilsiloxano* - CAR/PDMS (Supelco[®], Bellefonte, EUA), após prévio aquecimento a 60 °C por 10 minutos. Após este período, a fibra foi inserida no injetor do cromatógrafo por 1 minuto, para desorção dos voláteis coletados empregando gás nitrogênio numa vazão de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e a pressão na cabeça da coluna de 85 KPa. A temperatura inicial de aquecimento da coluna cromatográfica foi de 50 °C por 5 minutos, com taxa de aquecimento de 15 °C por minuto, temperatura final 220 °C por 13,3 minutos e temperatura do injetor e detector a 250 °C. Os padrões analíticos empregados foram constituídos por álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres (BELLESIA et al., 2003; QIAN, REINECCIUS, 2003). Os padrões foram diluídos de forma a obter concentração de 1000 ppm (BARROS et al., 2008a).

2.2 Avaliação sensorial

As amostras maturadas durante 90, 120, 150 e 180 dias foram cortadas em cubos de aproximadamente 5 g, retirados, aleatoriamente, das peças íntegras e avaliadas por oito provadores de ambos os sexos, previamente treinados quanto aos atributos presentes no

modelo Etana (escala graduada de cinco pontos), proposto por Bozzetti, Morara, Zannoni (GIOMO, 2001). A seleção foi realizada a partir da sensibilidade dos provadores, ao gosto ácido (LAVANCHY et al., 1994), sendo selecionados os indivíduos que acertaram um mínimo de 70% (7/10) no total de testes realizados, com significância de $p < 0,05$ (MORAES, 1983).

Para o treinamento dos provadores, foram oferecidas amostras de queijos comerciais para que os mesmos familiarizassem com os termos a serem utilizados na avaliação sensorial do queijo Parmesão. Os descritores e amostras de referências podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação dos descritores sensoriais e referências de escala adotados na avaliação sensorial do queijo Parmesão.

Atributos sensoriais	Referências	Atributos sensoriais	Referências
Ácido	Mussarela	Firmeza	Parmesão (duro)
Adesividade	Queijo fundido	Friabilidade	Parmesão (duro)
Adstringência	Característico do caju	Odor	Parmesão (duro)
Amargo	Brie	Picante	Parmesão (faixa azul)
Aroma	Parmesão (duro)	Salgado	Mussarela
Doce	Massdan	Solubilidade	Gorgonzola
Elasticidade	Mussarela	Úmido	Gorgonzola

Para análise sensorial ADQ os provadores receberam uma bandeja contendo água, biscoito tipo água e sal e as amostras de queijo maturadas. Em cada período de maturação, cada provador recebeu 8 amostras (4 tratamentos x 2 repetições).

2.3 Análise qualitativa da microestrutura dos queijos maturados

Para a análise em microscópio eletrônico de transmissão - MET, mensalmente, no período total de 180 dias, os queijos maturados foram fixados em solução de 2,0 % de glutaraldeído e paraformaldeído em tampão 0,05 M *Milloning* durante 12 horas. A seguir, as amostras foram lavadas com tampão PIPES e fosfato, e pós-fixadas em uma solução de 2 % tetraóxido de ósmio (OsO_4) em tampão fosfato durante 1,5 horas. Em seguida, essas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato e desidratadas em uma série graduada de acetona (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 95 %, 15 minutos cada), e posteriormente, em acetona absoluta três vezes, 15 minutos cada. As amostras desidratadas foram embebidas em meio Araldite[®] de baixa viscosidade (1Acetona:1Araldite[®]) durante 16 horas, seguida de

infiltração e inclusão em Araldite[®] por 2 horas a 37 °C e polimerização por 48 a 72 horas em estufa a 60 °C, para obtenção dos blocos. Estes foram seccionados usando um ultramicrotomo, e as secções ultrafinas de 80 nm foram coradas com 4 % uranil acetato e chumbo para análise em microscópio eletrônico de transmissão LEO Zeiss 906 (Zeiss, Cambridge, Inglaterra) (adaptado de AWAD; ABDEL-HAMID, EL-SHABRAWY, 2002, DABOUR et al., 2005).

Amostras de queijos fabricados com a cultura autóctone E₅, maturadas durante 30 e 60 dias foram submetidas à análise de microscopia de varredura - MEV para melhor entendimento da interação dos glóbulos de gordura junto à rede protéica. Os queijos foram fixados em tampão 0,05 M *Milloning*, até o momento da análise. A metodologia utilizada foi proposta por Madi-Ravazzi (2007)¹⁰. Em seguida, foram realizados enxágues sucessivos com água destilada, para posterior fixação em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 4% durante 2 horas. Após, realizou-se novamente enxágues sucessivos em água destilada e posteriormente as amostras foram desidratadas usando-se soluções de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 %, 100 %, 100 %), por 10 minutos para cada concentração. Após secagem em ponto crítico em EMITECH 850[®] (*Emitech Ltda Ashford, Kent, Inglaterra*), procedeu-se a organização das amostras nos *stubs* metálicos circulares, previamente, submetidos à imersão em acetona 100 % durante 1 minuto. Para adesão dos espécimes aos *stubs*, foi utilizada uma fita adesiva de cobre, dupla face, permitindo assim, melhor fluxo de elétrons da amostra ao porta-espécime. Os *stubs* contendo os espécimes foram cobertos com ouro em EMITECH 550[®] (*Emitech Ltda Ashford, Kent, Inglaterra*), resultando numa espessura de 35 nm. As amostras foram analisadas em microscopia de varredura - LEO 435 VPi (Zeiss, Cambridge, Inglaterra), sendo a operacionalização em 10 kV e 15 kV.

2.4 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) dos atributos sensoriais das amostras foi realizada a partir de um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x2x4 (tratamentos x repetições x tempos de maturação). Foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias das amostras, considerando um nível de significância $p < 0,05$,

¹⁰MADI-RAVAZZI, L. **Microscopia eletrônica de varredura com ênfase à análise de amostras biológicas**. São José do Rio Preto - SP. 2007, 33 p., Apostila.

utilizando o programa computacional SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (ZONTA; MACHADO, 1996).

3. Resultados e discussão

3.1 Identificação de compostos voláteis

Foram identificados álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres em todas as amostras investigadas. Valeraldeído não foi detectado apenas no queijo Cc₁ aos 60 dias de maturação e o composto acetato de n-butila não foi detectado no queijo fabricado com a cultura autóctone D₁ (Tabela 2).

As frações voláteis isopropanol, n-butanol e propanol, pertencentes ao grupo dos álcoois, foram detectadas nos queijos fabricados com a cultura comercial Cc₁ e culturas autóctones A, D₁ e E₅, com destaque para o queijo A, no qual estas frações se mantiveram presentes em todos os períodos de maturação estudados (60, 120 e 180 dias). O isopropanol não foi detectado nos queijos Cc₁ e E₅ aos 60 dias e o composto n-butanol foi detectado nestas mesmas amostras em períodos intermitentes.

Nas amostras analisadas, o propanol se manteve presente em todos os períodos de maturação. Estas substâncias também foram identificadas em queijo Parmesão e Parmigiano-Reggiano (BELLESIA et al., 2003; QIAN; REINCCIUS, 2003; BARROS et al., 2008a). McSweeney (2004) explica que a biossíntese dos álcoois pode ser consequência do metabolismo da lactose, redução da metil cetona, assimilação dos aminoácidos e degradação dos ácidos linoléico e linolênico.

As amostras dos queijos D₁ e E₅, maturados por 60 e 120 dias, respectivamente, apresentaram maiores intensidades (Figuras 1-3) dos picos cromatográficos referentes aos padrões valeraldeído (4,5 min.) e acetaldeído (2,5 min.).

O composto n-butiraldeído foi identificado em todas as amostras durante todo o período de maturação estudado. A menor incidência foi observada de acetato de n-butila foi detectado no queijo A nos períodos de 120 e 180 dias, no queijo Cc₁ aos 180 dias e no queijo E₅ aos 60 dias de maturação. O decréscimo até níveis não detectáveis do acetaldeído nos queijos A e D₁ aos 180 dias de cura, possivelmente, seja resultado da utilização deste composto como precursor em vias metabólicas destinadas à síntese de substâncias aromáticas como àquelas pertencentes ao grupo dos álcoois (CURIONI; BOSSET, 2002).

Tabela 2. Compostos voláteis* identificados de amostras de queijo Parmesão fabricado com culturas de *Lactobacillus helveticus*, maturado a 18 °C por 180 dias.

Composto	T _r	A			Cc ₁			D ₁			E ₅		
		60	120	180	60	120	180	60	120	180	60	120	180
Acetaldeído	2,50	+	+	ND	+	+	+	+	+	ND	+	+	+
Acetona	3,00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetato de etila	3,90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valeraldeído	4,50	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
Benzaldeído	4,78	+	+	ND	+	+	ND	+	ND	+	ND	+	+
2,3 butanodiona	4,90	+	+	ND	+	+	ND	+	+	ND	ND	+	+
Propanal	5,20	+	+	+	ND	+	ND	+	+	ND	+	+	ND
Isopropanol	6,00	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	ND	+	+
Propanol	6,70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetato de n-butila	7,10	ND	+	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND
Hexanal	7,40	+	+	+	ND	+	+	ND	+	ND	+	+	+
n-butanol	7,90	+	+	+	+	ND	+	+	+	ND	+	ND	+
Octanal	8,00	+	ND	ND	+	ND	+	ND	+	+	+	+	+
n- butiraldeído	14,70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isovaleraldeído	15,00	+	+	+	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+

*Média de dois processamentos.

T_r: Tempo de retenção (min.); +: presença do composto; ND: composto não detectado.

60, 120, 180: Período de maturação em dias.

A, Cc₁, D₁ e E₅: Culturas lácticas empregadas para a fabricação do Queijo Parmesão.

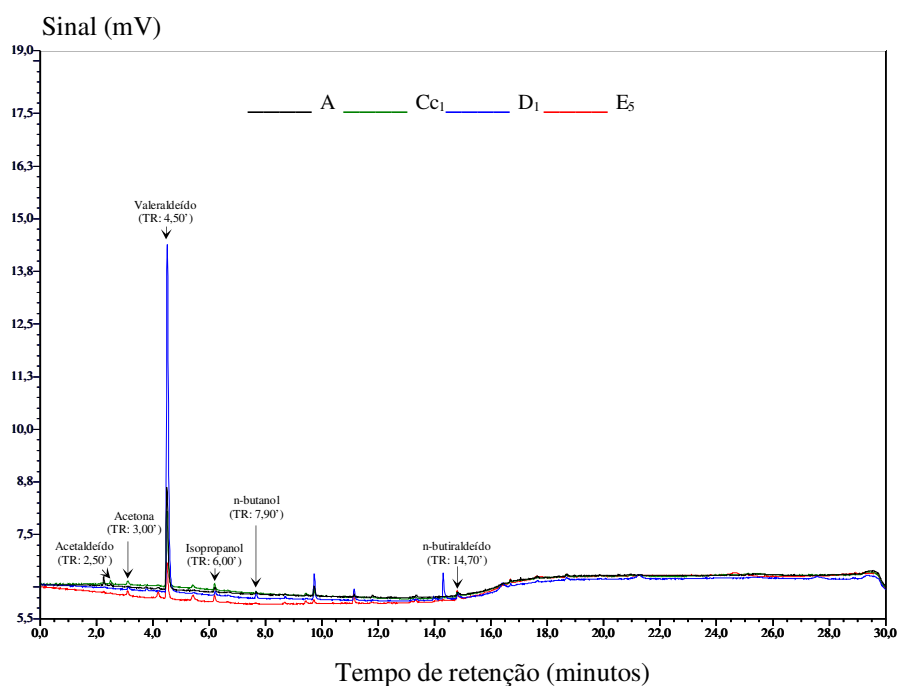


Figura 1. Cromatograma das amostras de queijo Parmesão fabricado com as culturas de *Lactobacillus helveticus* A, Cc₁, D₁ e E₅, maturado a 18 °C por 60 dias.

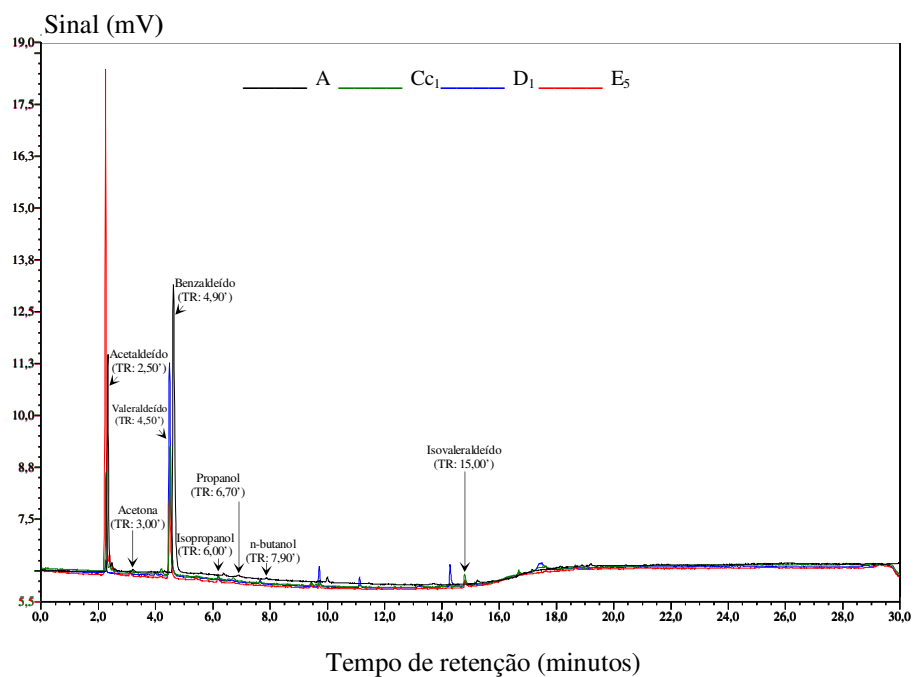


Figura 2. Cromatograma das amostras de queijo Parmesão fabricado com as culturas de *Lactobacillus helveticus* A, Cc₁, D₁ e E₅, maturado a 18 °C por 120 dias.

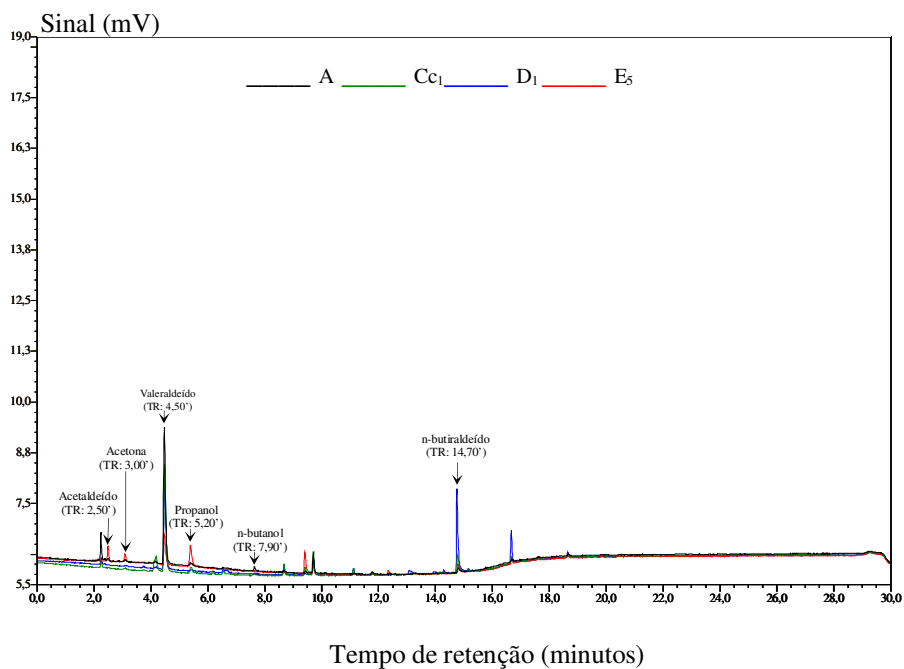


Figura 3. Cromatograma das amostras de queijo Parmesão fabricado com as culturas de *Lactobacillus helveticus* A, Cc₁, D₁ e E₅, maturado a 18 °C por 180 dias.

Nos queijos A, Cc₁, D₁ e E₅, a presença de aldeídos pode ser conseqüência da transaminação dos aminoácidos (McSWEENEY, 2004). Em queijos, os aldeídos são substâncias transitórias, podendo ser reduzidos a álcoois primários ou oxidados em ácidos. Possivelmente, isto explica a ausência do acetaldeído nos queijos A e D₁ após 180 dias de maturação (CURIONI; BOSSET, 2002).

A acetona e o composto 2,3 butanodiona foram registrados em todas as amostras, sendo que a acetona esteve presente em todos os períodos de maturação. A presença destes compostos, possivelmente seja conseqüência do metabolismo da lactose residual e também do citrato durante as transformações bioquímicas primárias (McSWEENEY, 2004). Em amostras de queijo Parmesão comercial maturado a 12 °C durante 180 dias, a acetona também foi identificada em todos os períodos (BARROS et al., 2008a).

O éster acetato de etila foi determinado em todas as amostras investigadas, entretanto o acetato de n-butila não foi detectado em nenhum período de maturação no queijo D₁. Possivelmente, este resultado seja conseqüência da especificidade da lipase das culturas A, Cc₁ e E₅ pela posição *sn*-3 dos triacilgliceróis, liberando ácidos graxos voláteis esterificados (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003; McSWEENEY, 2004; STEPANIAK, 2004).

3.2 Perfil sensorial

O perfil sensorial dos queijos fabricados com as culturas de *Lactobacillus helveticus* A, Cc₁, D₁ e E₅, de modo geral não apresentou diferença estatística significativa ao longo do tempo e entre os tratamentos aplicados ($p > 0,05$) (Tabela 3). Aos 90 dias de maturação, o queijo D₁ apresentou a menor nota para o atributo aroma ($2,1 \pm 0,6$) em relação aos queijos A ($3,5 \pm 0,2$), Cc₁ ($3,5 \pm 0,3$) e E₅ ($3,3 \pm 0,5$), porém com maiores notas para odor e aroma aos 180 dias de maturação.

Os provadores atribuíram menor nota para o gosto ácido ($1,3 \pm 0,1$) para o queijo fabricado com a cultura D₁ e a maior nota para o queijo A ($2,3 \pm 0,9$) aos 120 dias de maturação. O queijo D₁ recebeu aos 90 dias valor médio igual a 2,0 e 1,1 aos 180 dias de maturação. Estes resultados não eram esperados, pois os valores médios da acidez titulável na matriz dos queijos A, Cc₁, D₁ e E₅ apresentaram aumento ao longo de seis meses (BARROS et al., 2009). Entretanto, este comportamento pode estar relacionado à formação

de compostos da degradação das proteínas, que de forma combinada minimizaram a percepção do caráter ácido pelos provadores.

Tabela 3. Notas* atribuídas pelos provadores para as amostras de queijo Parmesão fabricado com as culturas de *Lactobacillus helveticus* A, Cc₁, D₁ e E₅, maturado a 18 °C por 90, 120 e 150 dias.

Atributo	PM (dias)	A	Cc ₁	D ₁	E ₅
Odor	90	3,4±0,4 ^{aA}	3,0±0,1 ^{aA}	3,3±0,1 ^{aA}	3,4±0,2 ^{aA}
	120	2,8±0,1 ^{aA}	2,4±0,1 ^{aA}	2,7±0,7 ^{aA}	3,0±0,2 ^{aA}
	150	3,2±0,1 ^{aA}	3,1±0,6 ^{aA}	3,4±0,1 ^{aA}	2,9±0,3 ^{aA}
Aroma	90	3,5±0,2 ^{aA}	3,5±0,3 ^{aA}	2,1±0,6 ^{bB}	3,3±0,5 ^{aA}
	120	3,3±0,1 ^{aA}	2,6±0,1 ^{bA}	2,7±0,6 ^{bA}	3,2±0,3 ^{aA}
	150	3,5±0,1 ^{aA}	2,7±0,2 ^{bB}	3,6±0,2 ^{aA}	2,9±0,3 ^{aA}
Doce	90	0,7±0,3 ^{aA}	1,1±0,2 ^{aA}	1,1±0,6 ^{aA}	0,6±0,1 ^{aA}
	120	1,0±0,1 ^{aA}	1,4±0,7 ^{aA}	1,5±0,4 ^{aA}	1,5±0,3 ^{aA}
	150	0,8±0,1 ^{aA}	1,0±0,7 ^{aA}	1,3±0,6 ^{aA}	1,2±0,3 ^{aA}
Ácido	90	1,8±0,4 ^{aA}	2,2±0,1 ^{aA}	2,0±0,4 ^{aA}	1,9±0,5 ^{aA}
	120	2,3±0,9 ^{aA}	1,8±0,1 ^{aA}	1,3±0,1 ^{aA}	1,6±0,4 ^{aA}
	150	2,1±0,5 ^{aA}	1,8±0,4 ^{aA}	1,5±0,4 ^{aA}	1,5±0,1 ^{aA}
Salgado	90	2,2±0,4 ^{aA}	2,1±0,4 ^{aA}	1,8±0,1 ^{aA}	2,6±0,4 ^{aA}
	120	2,0±0,1 ^{aA}	1,8±0,1 ^{aA}	1,6±0,7 ^{aA}	1,6±0,2 ^{aA}
	150	2,3±0,4 ^{aA}	2,7±0,2 ^{aA}	1,9±1,0 ^{aA}	1,8±0,3 ^{aA}
Amargo	90	1,6±0,1 ^{aAB}	1,6±0,1 ^{aAB}	0,9±0,3 ^{bB}	2,3±0,2 ^{aA}
	120	1,4±0,3 ^{aA}	1,4±0,2 ^{aA}	1,3±0,4 ^{abA}	2,0±0,2 ^{abA}
	150	1,6±0,1 ^{aA}	1,4±0,7 ^{aA}	2,0±0,1 ^{aA}	1,3±0,3 ^{bA}
Adstringente	90	0,3±0,1 ^{aB}	0,5±0,1 ^{aB}	0,4±0,1 ^{bB}	0,9±0,1 ^{aA}
	120	0,4±0,1 ^{aA}	0,4±0,1 ^{aA}	0,4±0,2 ^{bA}	0,7±0,1 ^{aA}
	150	0,5±0,1 ^{aAB}	0,3±0,2 ^{aB}	0,7±0,1 ^{aA}	0,8±0,1 ^{aA}
Picante	90	2,1±0,3 ^{aA}	2,2±0,1 ^{aA}	2,3±0,2 ^{aA}	2,1±0,8 ^{aA}
	120	1,6±0,1 ^{aA}	1,8±0,1 ^{aA}	1,3±1,0 ^{aA}	1,8±0,5 ^{aA}
	150	2,6±0,4 ^{aA}	2,2±0,2 ^{aA}	2,3±1,3 ^{aA}	2,0±0,1 ^{aA}
Elasticidade	90	1,3±0,2 ^{aA}	0,5±0,1 ^{aA}	0,9±0,2 ^{aA}	1,1±0,7 ^{aA}
	120	0,6±0,2 ^{aA}	0,6±0,2 ^{aA}	1,1±0,8 ^{aA}	1,1±0,1 ^{aA}
	150	1,1±0,2 ^{aA}	0,6±0,1 ^{aA}	1,4±0,8 ^{aA}	0,9±0,1 ^{aA}
Firmeza	90	2,7±0,2 ^{aA}	3,4±0,1 ^{aA}	3,0±0,1 ^{aA}	3,0±0,3 ^{aA}
	120	2,8±0,3 ^{aA}	2,8±0,1 ^{aA}	2,3±0,5 ^{aA}	2,1±0,5 ^{aA}
	150	2,6±0,4 ^{aA}	3,1±0,5 ^{aA}	1,9±0,5 ^{ab}	2,5±0,4 ^{aA}
Friabilidade	90	2,5±0,4 ^{aA}	2,9±0,2 ^{aA}	2,6±0,1 ^{aA}	2,6±0,4 ^{aA}
	120	2,4±0,6 ^{aA}	2,3±0,2 ^{aA}	1,9±0,7 ^{aA}	1,7±0,5 ^{aA}
	150	2,3±0,7 ^{aA}	2,2±0,5 ^{aA}	2,0±0,1 ^{aA}	1,4±0,4 ^{aA}
Adesividade	90	1,2±0,3 ^{aA}	0,6±0,1 ^{aA}	0,8±0,1 ^{aA}	0,9±0,1 ^{aA}
	120	1,3±0,3 ^{aA}	0,9±0,1 ^{aA}	1,0±0,2 ^{aA}	1,1±0,6 ^{aA}
	150	1,3±0,5 ^{aA}	0,7±0,1 ^{aA}	1,5±0,5 ^{aA}	1,1±0,2 ^{aA}
Solubilidade	90	1,8±0,1 ^{aA}	1,6±0,1 ^{aA}	1,6±0,3 ^{aA}	1,8±0,1 ^{aA}
	120	1,4±0,2 ^{aA}	1,4±0,1 ^{aA}	1,4±0,1 ^{aA}	1,6±0,3 ^{aA}
	150	1,8±0,4 ^{aA}	1,5±0,1 ^{aA}	1,3±0,1 ^{aA}	1,6±0,3 ^{aA}
Umidade	90	1,5±0,3 ^{aA}	1,1±0,1 ^{aA}	1,5±0,2 ^{aA}	1,2±0,1 ^{aA}
	120	1,5±0,2 ^{aA}	1,4±0,1 ^{aA}	1,5±0,4 ^{aA}	1,6±0,1 ^{aA}
	150	1,9±0,2 ^{aA}	1,1±0,4 ^{aA}	1,8±0,1 ^{aA}	1,4±0,1 ^{aA}

*Média de dois processamentos.

A, Cc₁, D₁ e E₅: Cultura láctica empregada para a fabricação do Queijo Parmesão. PM: Período de maturação.

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna para cada uma das culturas indicam diferença significativa (p<0,05).

^{A, B} Letras diferentes na mesma linha para um mesmo período, para cada um dos atributos indicam diferença significativa (p<0,05).

A característica friabilidade foi mais pronunciada nos queijos A e Cc₁. Em 90 dias de maturação o valor médio para o queijo A foi de 2,5±0,4 e 2,9±0,2 para o queijo Cc₁, enquanto valor médio igual a 2,8±0,4 foi encontrado para o queijo Cc₁ aos 180 dias,

(Figura 4). Esta característica demonstra a capacidade do produto ser triturado, ou reduzido para a forma de pó, importante para o queijo Parmesão, pois grande parte de sua produção é comercializada na forma ralada. A acidez titulável observada aos 30 dias de maturação no queijo A ($1,03 \pm 0,1$ %) e no queijo Cc₁ ($0,91 \pm 0,1$ %) foi superior a observada nas demais amostras (BARROS et al., 2009), justificando, possivelmente, a maior friabilidade apresentada por estes queijos.

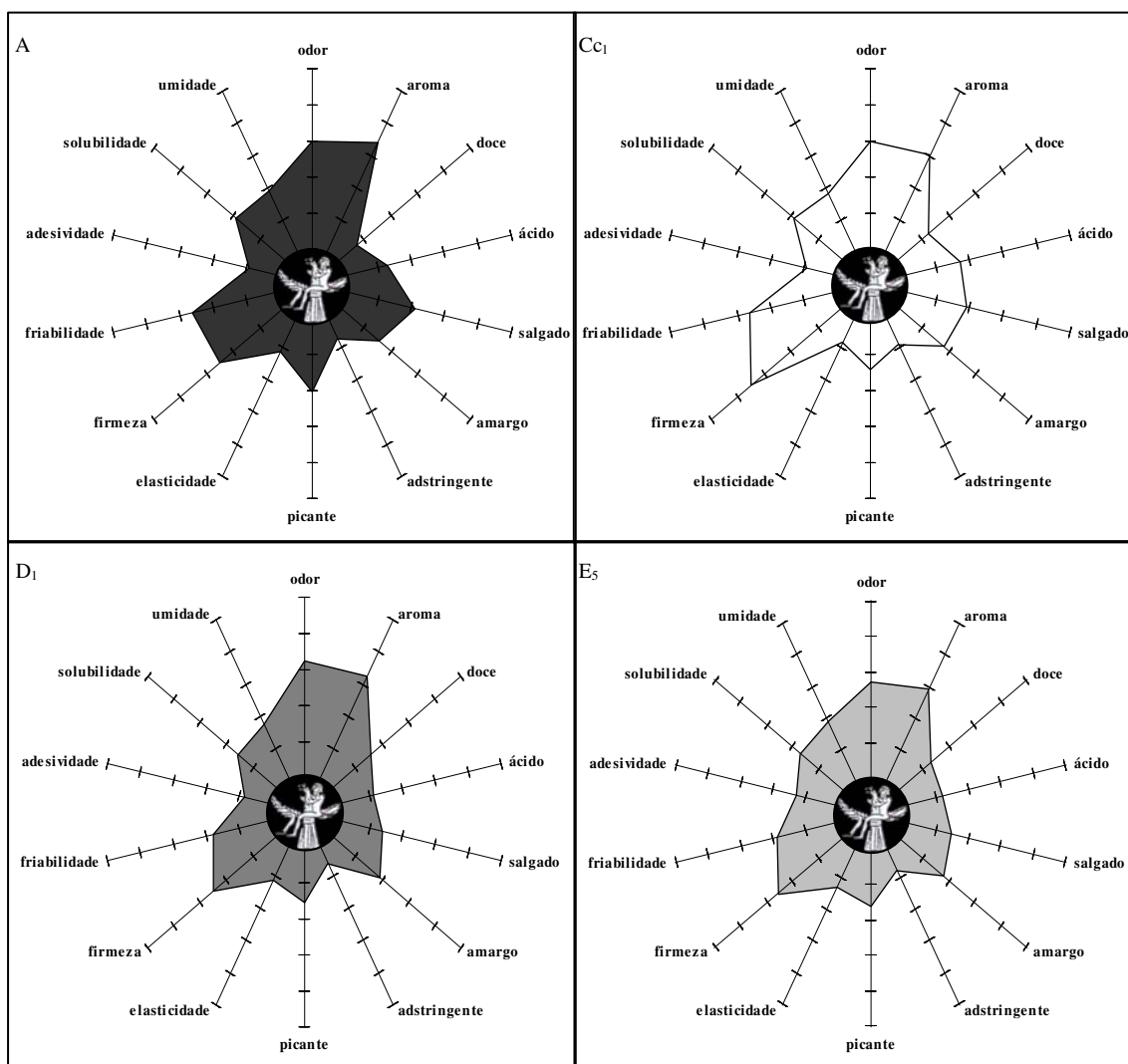


Figura 4. Perfil sensorial de amostras de queijo Parmesão fabricado com as culturas de *Lactobacillus helveticus* A, Cc₁, D₁ e E₅, maturado a 18 °C aos 180 dias.

Na opinião dos provadores, o atributo picante não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os queijos Cc₁, D₁ e E₅, apresentando notas $1,4 \pm 0,1$, $1,5 \pm 0,7$, $1,6 \pm 0,5$ após 180 dias de maturação, respectivamente. Por outro lado, o queijo A apresentou nota igual a $2,0 \pm 0,3$ para este mesmo descritor.

O queijo Cc₁ apresentou a maior nota para firmeza ($3,5\pm 0,1$) aos 180 dias de maturação, indicando possivelmente a efetividade da proteólise pelas proteases e peptidases (McSWEENEY, 2004), que resultam em alterações de textura. Geralmente, em queijos Parmesão submetidos à maturação desprovidos de embalagem é ainda mais nítido o surgimento de uma matriz protéica densa proveniente da redução gradual da umidade causada pela evaporação da água na superfície do queijo. Neste estudo com intuito de evitar perda excessiva de água e conseqüente rachaduras na superfície dos queijos, procedeu-se a embalagem com material termo-encolhível, após 48 horas de secagem, justificando os dados obtidos.

O perfil sensorial não permitiu uma diferenciação clara entre as amostras. Na variedade Parmesão os subprodutos provenientes das reações proteolíticas e lipolíticas tendem a ser mais expressivos em queijos maturados por períodos superiores a 48 meses (DE DEA LINDNER, 2008).

3.3 Microestrutura

O estudo qualitativo das eletromicrografias de transmissão - MET demonstra maior distribuição de proteínas e gorduras, seguida da incidência de bactérias. Durante o período de maturação, foi possível observar a interação das culturas lácticas, bacilos, com os glóbulos de gordura (Figura 5 a, b). A presença de bactérias lácticas na porção lipídica também foi observada por Dean, Berridge e Mabbitt (1959) e Parker et al. (1998) em queijos Cheddar e Serra, respectivamente. Barros et al. (2008c) verificaram a partir da MET, morfotipos bacilares e cocos envolvidos pelos lipídios presente na rede protéica do Parmesão comercial fabricado com *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*.

Na Figura 5, no período de 30 dias de maturação (Figura 5 a, b), os glóbulos de gordura apresentam tamanhos maiores quando comparados àqueles observados aos 120 dias (Figura 5 f), 150 dias (Figura 5 g e 5 h) e 180 dias (Figura 5 i). Possivelmente, o surgimento dos pequenos glóbulos de gordura pode ser conseqüência da ação de lipases microbianas ativas na matriz do queijo durante a maturação (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003) e/ou proveniente do tratamento aplicado no processamento desse derivado lácteo (LOPEZ, 2005; LOPEZ; CAMIER; GASSI, 2007).

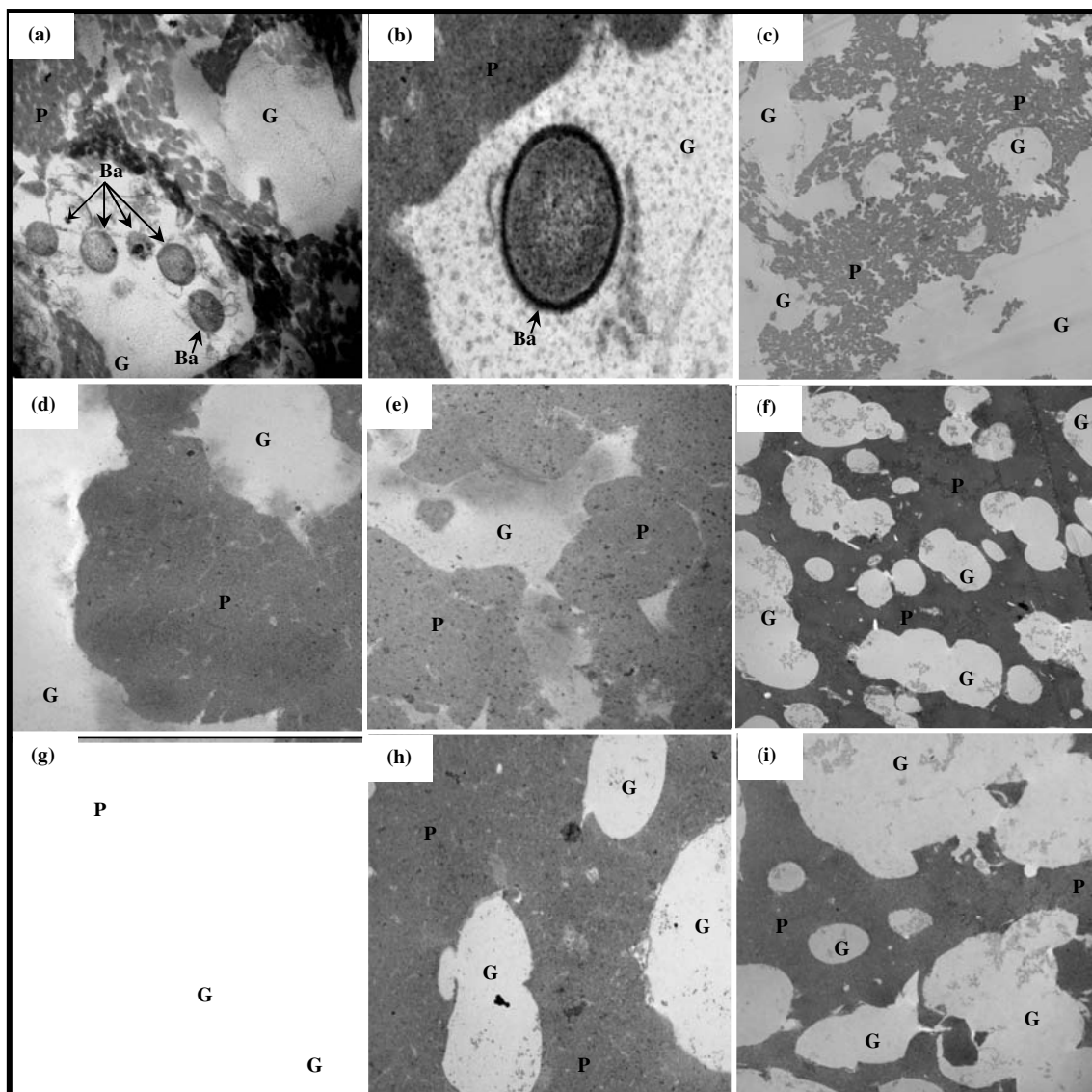


Figura 5 - Microestrutura do queijo Parmesão maturado a 18 °C (a, b - queijo Parmesão fabricado com a cultura A maturado por 30 (16.700x) e 60 dias (21.560x); c – queijo Parmesão fabricado com a cultura Cc₁ maturado por 60 dias (2.784x); d, f, g, i - queijo Parmesão fabricado com a cultura D₁ maturado por 90 (27.000x), 120 (7.750x), 150 (4.646x) e 180 dias (4.646x); e, h - queijo Parmesão fabricado com a cultura E₅ maturado por 90 (10.000x) e 150 dias (4.646x), respectivamente; B_a: bacilo; G: glóbulos de gordura; P: matriz protéica).

Em queijo Parmesão comercial maturado a 18 °C também foi observado a presença de glóbulos de gordura com menores dimensões quando comparados àqueles registrados nos períodos iniciais da maturação (BARROS et al., 2008c).

As eletromicrografias de varredura demonstram a interação dos glóbulos de gorduras e matriz protéica do queijo Parmesão (Figura 6).

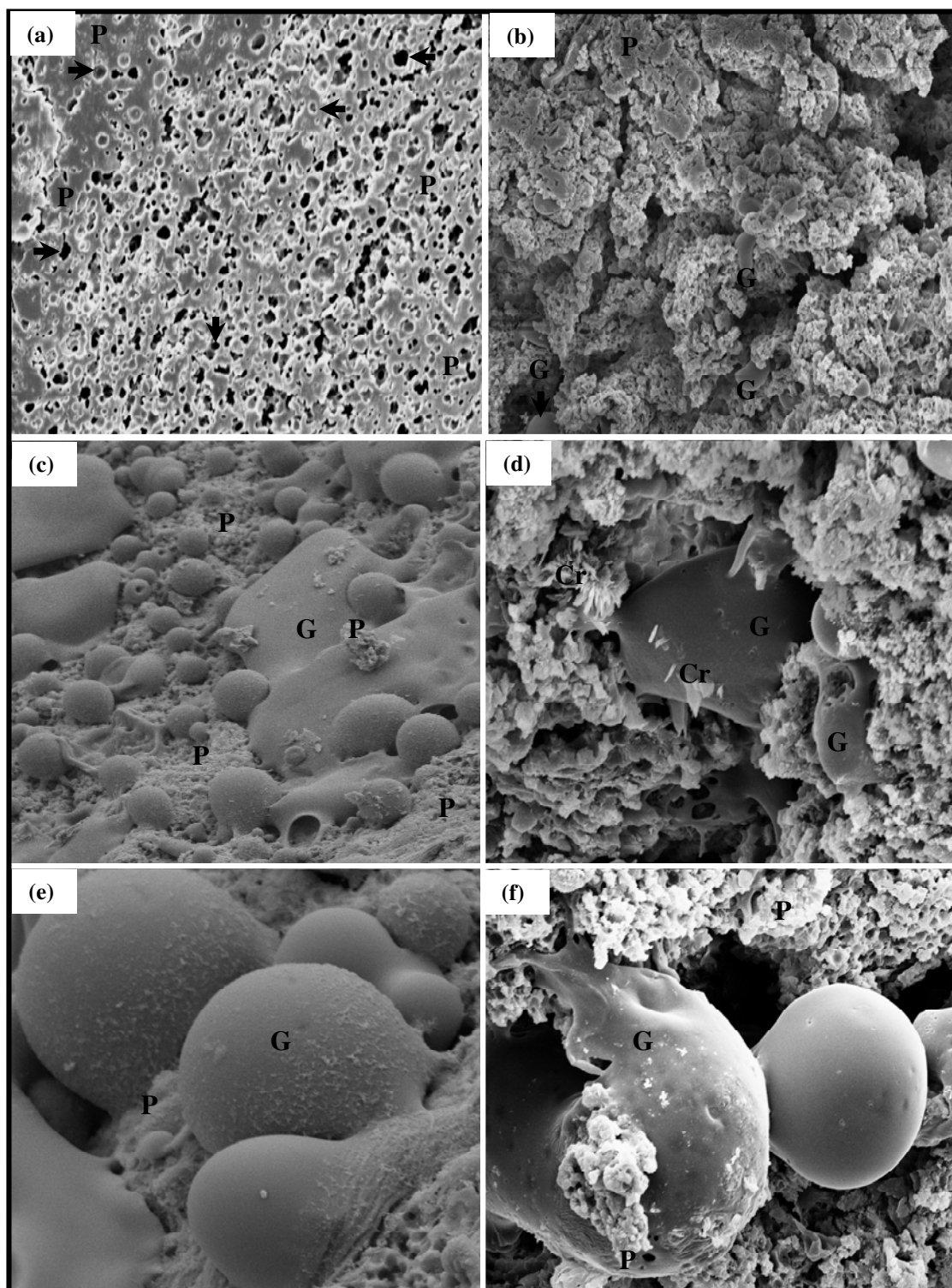


Figura 6 - Microestrutura do queijo Parmesão fabricado com a cultura autóctone E_5 e maturado a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a - 30 dias 641x, setas: pontos de inserção dos glóbulos de gordura; b - 30 dias 370x; c: 60 dias 648x; d - 60 dias 1.390x; e - 60 dias 1.090x; f - 60 dias 779x; Cr: cristais; G: glóbulos de gordura; P: matriz protéica).

As fotomicrografias demonstram deformações no glóbulo de gordura (Figuras 5c, 5d e 5f), possivelmente como consequência dos tratamentos empregados no leite destinado

à fabricação do queijo (LOPEZ; CAMIER; GASSI, 2007; YE et al., 2004). Também é possível observar variação na dimensão e no formato dos glóbulos.

A visão panorâmica da rede protéica do queijo maturado por 30 dias (Figura 6a) demonstra os pontos de inserção (indicados por setas) dos glóbulos de gordura, formando uma estrutura semelhante à colméia (MONTESINOS-HERRERO et al., 2006).

Na amostra do queijo Parmesão maturado durante 60 dias observa-se os glóbulos de gordura inseridos na matriz protéica do queijo (Figuras 6b e 6d). Na Figura 6c os glóbulos de gordura estão distribuídos em toda extensão da rede protéica. Inclusões cristalinas também foram detectadas (Figura 6d). Estes arranjos cristalinos também foram observados no MET, no entanto, por apresentarem característica perfuro-cortante, estes romperam as secções ultrafinas sobre as telas impossibilitando a análise por imagem do material. Barros et al. (2008c) registraram em queijo Parmesão comercial maturado por 90 dias a partir da análise em MET, a incidência de inclusões cristalinas com morfotipo oval, com o núcleo desorganizado e o córtex radial laminar.

4. Conclusões

Os queijos fabricados com as culturas autóctones A₁, D₁ e E₅ e cultura comercial Cc₁ não apresentaram um perfil aromático e sensorial claramente definido. Houve oscilações na presença dos compostos aromáticos e dos atributos sensoriais durante o período de estudo. Na rede protéica das amostras de queijos investigadas houve presença de glóbulos de gordura dispostos isoladamente e em interação com matriz protéica.

5. Referências bibliográficas

AWAD, R. A.; ABDEL-HAMID, L. B.; EL-SHABRAWY, S. A. Texture and microstructure of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. *Lebensmittel-Wissenschaft Und - Technologie - Food Science*, London, v. 35, n. 1, p. 54-61, 2002.

BARBIERI, G.; BOLZONI, L.; CARERI, M.; MANGIA, A.; PAROLARE, G.; SPAGNOLI, S.; VIRGILI, R. Study of the volatile fraction of Parmesan cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 5, p. 1170-1176, 1994.

BARROS, J. J. C. **Aptidões tecnológicas de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro - fermento natural - perspectivas à manufatura do Parmesão**. 2005. 43 p. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; BÓSCOLO, M.; PENNA, A. L. B. Identificação de compostos voláteis por Gc-Fid/Head-Space em queijo Parmesão maturado. In: **BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOOD AND BEVERAGES (BMCFB)**, 7, p. 248, 2008a.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A., MOURA, C. J. PENNA, A. L. B. Aspecto sanitário e microbiota láctica durante a maturação do queijo Parmesão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 364, 2008b.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; FALEIROS JR., L. R.; TABOGA, S. R.; PENNA, A. L. B. Microestrutura e evolução dos componentes químicos na matriz do queijo Parmesão durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (submetido à publicação), 2008c.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A.; MOURA, C. J.; PENNA, A. L. B. Efeito de *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos sobre a evolução dos componentes químicos no queijo Parmesão maturado. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** (submetido à publicação), 2009.

BELLESIA, F.; PINETTI, A.; PAGNONI, U. M.; RINALDI, R.; ZUCCHI, C.; CAGLIOTI, L.; PALYI, G. Volatile components of Grana and Parmigiano-Reggiano type hard cheese. **Food Chemistry**, London, v. 83, n. 1, p. 55-61, 2003.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. J. S.; GUIMARÃES, A. C. L.; RODRIGUES, M. D. C. P. Estudo bioquímico e sensorial do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 193-208, 2000.

BOZZETTI, V. Los sellos de Etana, en la origen de las actividades lácteas. **IEL Industrias Lacteas Españolas**, p. 10-11, 2000.

CHAVES, J. B. P. **Análise sensorial**. Viçosa: UFV, 1998. 28 p.

COLLINS, Y. F.; McSWEENEY, P. L. H.; WILKINSON, M. G. Evidence for a relationship between autolysis of starter bacteria and lypolysis in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 70, n. 1, p. 105-113, 2003.

CURIONI, P. M.; BOSSET, J. O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 12, p. 959-984, 2002.

DABOUR, N.; LAPOINTE, G.; BENHAMOU, N.; FLISS, I.; KHEADR, E. E. Application of ruthenium red and colloidal gold-labeled lectin for the visualization of bacterial exopolysaccharides in Cheddar cheese matrix using transmission electron microscopy. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 4, p. 1-12, 2005.

DE DEA LINDNER, J. **Traditional and innovative approaches to evaluate microbial contribution in long ripened fermented foods: the case of Parmigiano Reggiano cheese**. 2008. 129f. Ph. D. in Food Science and Technology - Faculty of Agriculture, Università degli Studi di Parma, Parma, 2008.

DEAN, M. R.; BERRIDGE, N. J.; MABBITT, L. A. Microscopical observations on Cheddar cheese and curd. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 26, n. 1, p. 77-82, 1959.

DI CAGNO, R.; BANKS, J.; SHEEHAN, L.; FOX, P. F.; BRECHANY, E. Y.; CORSETTI, A.; GOBBETTI, M. Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 12, p. 961-972, 2003.

FARKYE, N. Y.; FOX, P. F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science e Technology**, Cambridge, v. 1, n. 3, p. 37-40, 1990.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 587 p.

FRAU, M.; MULET, A.; SIMAL, S.; MASSANET, J.; ROSSELLÓ, C. Microscopic crystalline inclusions in Mahón cheese. **Food Science and Technology International**, London, v. 3, n. 1, p. 23-47, 1997.

GIOMO, A. Tasting the cheese and sensory analysis. In: SYMPOSIUM "CHEESE IN

ALL THEIR ASPECTS" ANALYTICAL WEEK IDF/ISO/AOAC, de 13-18 de Maio de 2001. **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels, n. 369, p. 30-33, 2001.

HANNON, J. A.; WILKINSON, M. G.; DELAHUNTY, C. M.; WALLACE J. M.; MORRISEY, P. A.; BERESFORD, T. P. Application of descriptive sensory analysis and key chemical indices to assess the impact of elevated ripening temperatures on the acceleration of Cheddar cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 3, p. 263-273, 2005.

LAVANCHY, P.; BÉRODIER, F.; ZANNONI, M.; NOËL, Y.; ADAMO, C.; SQUELLA, J.; HERRERO, L. **A guide to the sensory evaluation of texture of hard and semi-hard cheeses**. Paris: INRA, 1994. não paginado.

LAWRENCE, R. C.; GILLES, J.; CREAMER I. K. The relationship between cheese texture and flavour. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 18, n. 3, p. 175-190, 1983.

LOPEZ, C. Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 45, n. 4, p. 497-511, 2005.

LOPEZ, C.; CAMIER, B. GASSI, J. Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. **International Dairy Journal**, Huntingdon, v. 17, n. 3, p. 235-247, 2007.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, M. L.; SOARES, F. M.; PEREIRA JÚNIOR, F. N. P. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 516-521, 2004.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 4, p. 127-144, 2004.

MONTESINOS-HERRERO, C.; COTTELL, D. C.; O'RIORDAN, D. E.; O'SULLIVAN, M. Partial replacement of fat by functional fiber in imitation cheese: effects on rheology and microstructure. **International Dairy Journal**, Huntingdon, v. 16, n. 8, p. 910-919, 2006.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1983, 79 p.

PARKER, M. L.; GUNNING, P. A.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X.; BROCKLEHURST, T. F. The microstructure and distribution of microorganisms within mature Serra cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 4, p. 523-530, 1998.

PENNA, A. L. B.; HOFFMANN, F. L.; BOZZETTI, V. Avaliação sensorial de queijos usando o modelo Etana. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 17-26, 2002.

PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; MEINARDI, C. A.; CANDIOTI, M. C.; ZALAZAR, C. A. Substitution of natural whey starter by mixed strains of *Lactobacillus helveticus* in the production of Reggianito Argentino cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 1, p. 45-51, 2004.

PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; MEINARDI, C. A.; ZALAZAR, C. A. Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 11, p. 1150-1155, 2005.

QIAN, M.; REINECCIUS, G. Identification of aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 6, p. 1362-1369, 2002.

QIAN, M.; REINECCIUS, G. Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese by a dynamic headspace (Purge-Trap) method. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 18, n. 8, p. 252-259, 2003.

QIAN, M.; REINECCIUS, G. Static headspace and aroma extract dilution analysis of Parmigiano Reggiano cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 3, p. 794-798, 2006.

ROSSI, D. A.; ABREU, L. R.; CARVALHO, A. F.; DUARTE, G. C.; BARROS, J. J. C.; SILVA, V. A. Utilização de provas bioquímicas e do perfil de hidrolases de peptideoglicanas para identificação de *Lactobacillus helveticus* e outros lactobacilos termófilos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 392, p. 3-11, 2002.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 591-610, 2005.

STEPANIAK, L. Dairy enzymology. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 2/3, p. 153-171, 2004.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; DAMÁSIO, M. H. Análise descritiva de perfil livre em queijo mozzarella de leite de búfala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 536-542, 2004.

WHETSTINE, C. M. E.; CADWALLADER, K. R.; DRAKE, M. Characterization of aroma compounds responsible for the rosy/floral flavor in Cheddar cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 8, p. 3126-3132, 2005.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: UFPEL, 1996. 109p.

YE, A.; SINGH, H.; TAYLOR, M. W.; ANEMA, S. Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. **Le Lait**, Les Ulis, v. 84, n. 3, 269-283, 2004.

CONCLUSÃO GERAL

Todas as amostras de queijo Parmesão maturadas atenderam aos requisitos da legislação brasileira. Não foi detectada *Escherichia coli* e *Staphylococcus coagulase* positiva e houve decréscimo da população de lactobacilos termófilos a partir de 90 dias.

Em todos os tratamentos foi observada a evolução da acidez e dos índices de maturação durante os 180 dias. Houve maior liberação de tirosina no queijo D₁ e triptofano no queijo Cc₁, após 120 e 180 dias, respectivamente. Em todo o estudo a maior atividade da enzima LDH foi observada no queijo Cc₁ nos períodos de 120 e 180 dias. A maior hidrólise da caseína e liberação dos aminoácidos tirosina e triptofano foi obtida quando se utilizou as culturas D₁ e E₅, sendo também observada a atividade da LDH até o final da maturação.

Os diferentes tratamentos demonstraram comportamento específico, resultando na microheterogeneidade nas frações de caseína. Em todos os tratamentos foi evidenciada a degradação da α_{s1} em α_{s1-I} e α_{s1-II} , sendo identificada também a degradação da β -CN em γ_1 , γ_2 e γ_3 .

Os queijos fabricados com as culturas autóctones A₁, D₁ e E₅ e cultura comercial Cc₁ não apresentaram um perfil aromático e sensorial claramente definido, sendo os queijos fabricados com as culturas Cc₁ e E₅ os que obtiveram as maiores notas para os atributos sensoriais. Foi observada em MET interação das culturas com os lipídios distribuídos na matriz do queijo e em MEV foi observada a deformação dos glóbulos de gordura presentes no queijo.

As culturas de *Lactobacillus helveticus* autóctones utilizadas para fabricação do queijo Parmesão, de modo geral, apresentaram características distintas entre si ao longo do período de maturação. A cultura D₁, embora apresente caráter autolítico intermediário, devido à evolução gradativa observada no queijo aos 90 dias de maturação poderia ser aplicada na fabricação de queijos duros que requerem breve período de maturação, tal como o queijo Montanhês. A combinação dos cultivos autóctones com a cultura comercial poderia ser uma alternativa na elaboração de cultura destinada à fabricação de queijos de massa dura.

PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTES À TESE

1. Introdução

Diversas atividades foram desenvolvidas desde 2005 até o presente momento. Buscando a familiarização com os protocolos experimentais a serem utilizados na pesquisa, no segundo semestre de 2005, foram adquiridas amostras de queijo Parmesão de diferentes origens e o resultado das análises físico-químicas foram divulgadas em evento científico. Em 2006, foi estabelecida uma parceria com o Laticínio Tirolez (Arapuá/MG), o qual cedeu peças de queijos Parmesão que foram analisadas ao longo de seis meses. Em março de 2007 foram efetuados os processamentos dos queijos utilizando-se as culturas autóctones e comercial, com diferente perfil autolítico. Os dados adquiridos foram utilizados para elaboração de resumos que foram submetidos a congressos em âmbito nacional e internacional. Os resultados também foram organizados em artigos para publicação em periódicos.

2. Trabalho aceito para publicação em periódico

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A., MOURA, C. J. PENNA, A. L. B. Aspecto sanitário e microbiota láctica durante a maturação do queijo Parmesão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 364, 2008.

3. Trabalhos submetidos à publicação em periódicos

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; FALEIROS JR., L. R.; TABOGA, S. R.; PENNA, A. L. B. Microestrutura e evolução dos componentes químicos na matriz do queijo Parmesão durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2008.

BARROS, J. J. C.; PENNA, A. L. B. Aspectos tecnológicos e bioquímicos envolvidos na fabricação do queijo Parmesão. **Revista SEMINA**, Londrina, 2009.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A.; MOURA, C. J.; PENNA, A. L. B. Efeito de *Lactobacillus helveticus* autóctones com diferentes perfis autolíticos sobre a evolução dos componentes químicos no queijo Parmesão maturado. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, 2009.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; PENNA, A. L.; IZIDORO, L. F. M.; SILVA, G. V.; ROSSI, D. A.; Proteólise da caseína como marcador da maturação do queijo Parmesão. **Química Nova**, São Paulo, 2009.

4. Trabalhos apresentados em eventos científicos e publicados em anais

BARROS, J. J. C., AZEVEDO, A. C., BOSCOLO, M., PENNA, A. L. B. Identificação de compostos voláteis por GC-FID/head-space em queijo Parmesão maturado (aceito) In: VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB), 2008, Lorena. **Anais do VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB)**, 2008.

BARROS, J. J. C., IZIDORO, L. F. M., AZEVEDO, A. C., VIEIRA, G. S., PENNA, A. L. B. Perfil eletroforético da caseína durante a maturação de queijo Parmesão (aceito) In: VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB), 2008, Lorena. **Anais do VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB)**, 2008.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A.; MOURA, C. J. D; PENNA, A. L. B. Biochemical and Sensorial Changes in Parmesan Cheese Manufactured with Autochthonous Starters of *Lactobacillus helveticus*. In: 5th IDF Symposium On Cheese Ripening, 2008, Bern - Suíça. **Anais do 5th IDF Symposium on Cheese Ripening**, 2008.

BARROS, J. J. C.; FALEIROS JUNIOR, L. R.; TABOGA, S. R.; PENNA, A. L. B. Aplicação do método histoquímico de *von Kossa* na análise de cristais de cálcio em queijos maturados. In: 7^o Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2007, Campinas. **Anais do 7^o Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 2007.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; SANTOS, V. A. Q.; PENNA, A. L. B. Aspecto higiênico-sanitário do Parmesão submetido a diferentes períodos de estocagem. In: XXIV

Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. **Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2007.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; PENNA, A. L. B. Evolução dos componentes químicos na matriz do queijo Parmesão durante a vida-de-prateleira. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária - CONBRAVET, 2007, Santos. **Anais do XXXIV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária - CONBRAVET**, 2007.

BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; PENNA, A. L. B. Lactato desidrogenase como marcador da lise de culturas lácticas durante o período de estocagem do queijo Parmesão. In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007. **Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia**.

BARROS, J. J. C.; SILVA, C. R. B.; TAGLIARI, F. E.; AZEVEDO, A. C.; PENNA, A. L. B. Physico-chemical characteristics of parmesan cheese from different origins.. In: VI Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (VI BMCFB), 2006, São José do Rio Preto. **Anais do VI Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (VI BMCFB)**, 2006.

5. Resultados experimentais para futuras publicações

Os dados obtidos das análises de perfil de ácidos graxos e compostos voláteis das peças de queijos cedidas pela empresa Tirolez e das amostras experimentais foram submetidos à análise estatística e a redação do artigo está sendo realizada para posterior publicação. Ainda, os resultados do perfil eletroforético e análise de cor/textura do queijo Parmesão comercial também serão formatados na forma de um artigo científico e enviados para publicação. Os dados sobre a análise da microestrutura do queijo Parmesão experimental (parte do capítulo IV) também serão enviados para divulgação em periódicos.