

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

**Liberação das enzimas LDH e PepX e evolução da maturação de queijo Parmesão  
adicionado de culturas autolíticas de *Lactobacillus helveticus***

**ANALICE CLÁUDIA DE AZEVEDO**

**São José do Rio Preto-SP  
2009**

**ANALICE CLÁUDIA DE AZEVEDO**

**Liberação das enzimas LDH e PepX e evolução da maturação de queijo Parmesão adicionado de culturas autolíticas de *Lactobacillus helveticus***

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre 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  
São Paulo - Brasil  
2009**

Azevedo, Analice Cláudia de.

Liberção das enzimas LDH e PepX e evolução da maturação de queijo Parmesão adicionado de culturas autolíticas de *Lactobacillus helveticus* / Analice Cláudia de Azevedo. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

64 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

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

CDU - 637.354.64

**ANALICE CLÁUDIA DE AZEVEDO**

**Liberação das enzimas LDH e PepX e evolução da maturação de queijo Parmesão  
adicionado de culturas autolíticas de *Lactobacillus helveticus***

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre 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

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Barretto Penna  
Professor Assistente Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Susana Marta Isay Saad  
Professor Doutor  
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Roberto da Silva  
Professor Assistente Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 17 de fevereiro de  
2009

*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 Tecnologia de Alimentos (DETA - UNESP).*

*A análise de atividade da enzima PepX utilizando o espectrofluorímetro foi realizada no Laboratório de Físico-Química do Departamento de Química e Ciências Ambientais(UNESP).*

*A análise de microscopia de fluorescência no Laboratório de Microscopia e Microanálise (UNESP) sob a orientação do Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga.*

*“... a sabedoria que do alto é primeiramente pura, depois pacífica, moderada, tratável, cheia de misericórdia e de bons frutos, sem parcialidade e sem hipocrisia”*

*(Tiago 3:13-18).*

*“Transformai-vos pela renovação do vosso entendimento”*

*(Romanos 12:12).*

## **Dedico**

*A Deus e a meus pais, Jesus de Azevedo (in memoriam) e Maria da Conceição Azevedo*

*Mesmo distantes conseguimos manter a chama desse amor. O amor que nos une a cada dia, dando-nos força para superarmos as adversidades, pois, aonde quer que formos sabemos que jamais estaremos sozinhos.*

*Os caminhos são diferentes, mas quando precisamos ali estaremos nós, em qualquer situação, acolhendo uns aos outros, semeando o amor de Deus e o amor de nossos pais.*

## **Ofereço**

*Vovó Sinhana, Geraldo, Márcia, Marcos, Antônio, Mércia, Riza, Wander, Julio, Alessandro, Ana Paula, Aline, cunhados e sobrinhos.*

## **Agradecimentos**

*“O homem necessita buscar pessoas que transformem seu ambiente em um espaço agradável e o ajudem a plantar em seu meio sensações que o façam compreender que a coisa mais importante da vida é ser alegre e causar alegria aos outros”*

*(Demétrius, Lições para uma vida feliz)*

*Àqueles que me trouxeram muitas alegrias durante o mestrado,*

*Adrielle Oliveira, Aline De Grandi, Ana Carolina, Ana Helena, Ana Lúcia Barretto Penna, Ana Paula Maciel, Ângela, Catharina Callochi, Célia Landi Franco, Celso José de Moura, Cláudia Ribeiro, Conceição, Daise Aparecida Rossi, Débora, Denise Andreo, Denise Pinheiro, Denise Silva, a todos do Departamento de Engenharia de Alimentos (IBILCE/UNESP) e Departamento de Engenharia de Alimentos (UFG/Goiânia/GO), a todos do Grupo Doces Idosos, Dirce, Dona Joana, Seu Manoel e toda família Carvalho Barros, Edison Luis Pinceli, Elfa Nattes, Fernanda Seixas, Fernando Leite Hoffmann, Gilmar Toniolo, Ginaldo Vieira, Gisele De Dio, Gismar Vieira, Gleison Silva, Hélio Leonardo, Janaína Reis, João Cláudio Thoméo, João Jesuíno Demílio, Julyanna Andrade, Jupyracyara Carvalho Barros, a todos do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO/UFU), Laboratório de Microscopia e Microanálise (IBILCE/UNESP), Laticínio Sonata (Votuporanga/SP), Laticínio Tirolez (Arapuá/MG), Lidimara Caetano, Luciana, Luis Faleiros, Luiz, Marcel, Márcio, Márcio José Tiera, Marcos, Maurício, Boscolo, Michele, Mieko Kimura, Narciso Silva, Neuza Jorge, Newton Mayer, Pedro Romanneli, Pedro Silva, Priscila Ângelo, Raquel, Raquel Gutierrez, Roberto da Silva, Rosana Ferro, Rosemar Brena, Sabrina, Salvador Ribeiro, Sebastião Taboga, Seu João, Sílvia Kazama, Simara, Sueli Gonçalves, Tânia Gonçalves,, Thais, Thiago, Vanda, Vera, Vidiany Queiroz Santos, Wilson.*

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRAC.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>03</b>
2.1 Objetivo geral.....	03
2.2 Objetivos específicos.....	03
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>04</b>
3.1 Características físico-químicas, microbiológicas e dados estatísticos de produção do queijo Parmesão.....	04
3.2 Tecnologia de fabricação do queijo Parmesão.....	05
3.3 <i>Lactobacillus</i> .....	08
3.3.1 <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	10
3.4 Bioquímica da maturação.....	11
3.4.1 Glicólise.....	12
3.4.2 Lipólise.....	14
3.4.3 Proteólise.....	16
3.5 Autólise de <i>Lactobacillus helveticus</i> na maturação do queijo Parmesão.....	17
3.5.1 Lactato desidrogenase.....	18
3.5.2 Atividade da X-prolil-dipeptidil aminopeptidase.....	19
3.6 Atividade acidificante.....	21
3.7 Avaliação direta da viabilidade celular empregando a microscopia de fluorescência.....	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Origem e reativação das culturas autóctones.....	24
4.2 Viabilidade celular de <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	24
4.3 Preparo do sobrenadante livre de células para análise da atividade das enzimas LDH e PepX <i>in vitro</i> .....	25
4.4 Caracterização da atividade autolítica de <i>Lb. helveticus</i> pela liberação da LDH e PepX.....	25
4.5 Fabricação do queijo Parmesão experimental.....	26
4.5.1 Caracterização físico-química do queijo Parmesão maturado.....	28
4.5.2 Evolução da maturação do queijo Parmesão durante 180 dias.....	28

4.5.3 Viabilidade de lactobacilos termófilos no queijo Parmesão maturado.....	29
4.5.4 Preparo do sobrenadante livre de células para análise da atividade das enzimas LDH e PepX <i>in situ</i> .....	29
4.6 Análise estatística.....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
5.1 Viabilidade de <i>Lactobacillus helveticus in vitro</i> .....	31
5.2 Caracterização do desempenho autolítico <i>in vitro</i> pela liberação de enzimas intracelulares.....	34
5.3 Ensaio <i>in situ</i> .....	39
5.3.1 Viabilidade de lactobacilos termófilos no queijo Parmesão maturado.....	39
5.3.2 Caracterização físico-química das amostras de queijo Parmesão fabricado com <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	40
5.3.3 Evolução dos teores de acidez, tirosina, triptofano e índice de maturação.....	42
5.4 Atividade das enzimas LDH e PepX no queijo Parmesão maturado.....	45
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>
<b>8. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTES À DISSERTAÇÃO.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo simplificado de fabricação do queijo Parmigiano-Reggiano.....	06
Figura 2	Dendograma demonstrando a relação entre algumas bactérias lácticas starters. <i>C</i> - <i>Carnobacterium</i> ; <i>Ec</i> - <i>Escherichia</i> ; <i>Lb.</i> - <i>Lactobacillus</i> ; <i>Lc</i> - <i>Lactococcus</i> ; <i>Le</i> - <i>Leuconostoc</i> ; <i>S</i> - <i>Streptococcus</i> .....	09
Figura 3	Metabolismo da lactose por bactérias lácticas.....	13
Figura 4	Hidrólise dos triglicérides pelas lipases.....	15
Figura 5	Representação geral da estrutura peptidoglicana da parede celular de <i>Lactococcus</i> demonstrando a especificidade das hidrolases de peptidoglicanas.....	17
Figura 6	Resumo do sistema proteolítico de bactérias lácticas.....	20
Figura 7	Processo de fabricação do queijo Parmesão experimental.....	27
Figura 8	Viabilidade de <i>Lb. helveticus</i> cultivado em caldo MRS <sub>pH 5,4</sub> e incubado a 37 °C durante 48 horas (—●—: cultivo em profundidade; : Kit LIVE/DEAD; barra de desvio contínua: cultivo em profundidade; barra de desvio sombreada: Kit LIVE/DEAD).....	31
Figura 9	Fotomicrografias de fluorescência obtidas do cultivo de <i>Lb. helveticus</i> em caldo MRS <sub>pH 5,4</sub> e incubado a 37 °C durante 48 horas. Células íntegras: verde; Células lisadas: vermelho-alaranjado (a, e, i - cultura comercial Cc <sub>1</sub> após 8, 16 e 48 horas de cultivo; b, f, j - cultura autóctone A após 16, 24 e 48 horas de cultivo; c, g, l - cultura autóctone E <sub>5</sub> após 16, 24 e 48 horas de cultivo; d, h, m - cultura D <sub>1</sub> após 8, 24 e 48 horas de cultivo, 100µm.....	33
Figura 10	Atividade da LDH (■) e decréscimo do pH (▲) de <i>Lb. helveticus</i> cultivado em caldo MRS <sub>pH5,4</sub> e incubado a 37 °C durante 48 horas.....	35
Figura 11	Atividade da PepX (■) e decréscimo do pH (▲) de <i>Lb. helveticus</i> cultivado em caldo MRS <sub>pH5,4</sub> e incubado a 37 °C durante 48 horas.....	36
Figura 12	Viabilidade de lactobacilos termófilos em amostras de queijos Parmesão fabricados com as culturas A, Cc <sub>1</sub> , D <sub>1</sub> e E <sub>5</sub> , maturados a 18 °C durante 180 dias.....	39
Figura 13	Evolução da acidez titulável nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.....	42
Figura 14	Evolução do teor de tirosina nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.....	43
Figura 15	Evolução do teor de triptofano nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.....	44
Figura 16	Evolução do índice de maturação nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.....	45
Figura 17	Atividade da enzima LDH nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.....	46
Figura 18	Atividade da enzima PepX nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.....	46

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Coeficientes de correlação entre viabilidade celular e liberação das enzimas LDH e PepX de <i>Lb. helveticus</i> .....	38
Tabela 2	Caracterização físico-química das amostras de queijo Parmesão fabricados com culturas de <i>Lb. helveticus</i> A, Cc <sub>1</sub> , D <sub>1</sub> e E <sub>5</sub> , maturados a 18 °C aos 180 dias.....	41

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1	Produção brasileira em toneladas de queijo Parmesão em estabelecimentos com SIF (Serviço de Inspeção Federal).....	05
Quadro 2	Algumas características de bactérias ácido-láticas empregadas em derivados lácteos.....	08

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu_e$	velocidade específica
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrômetro
$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{mol}$	micromol
<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>
ABIQ	Associação Brasileira de Indústrias de Queijos
ADP	adenosina difosfato
AGL	Ácidos graxos livres
Ala	alanina
AMC	7 amino-4-metil coumarin
ANOVA	análise de variância
Arg	arginina
Asp	asparagina
ATP	adenosina trifosfato
$A_w$	atividade de água
<i>C.</i>	<i>Carnobacterium</i>
Ca	cálcio
$\text{CaCl}_2$	cloreto de cálcio
CDM	contagem direta por microscopia
cm	centímetro
CO	monóxido de carbono
$\text{CO}_2$	dióxido de carbono
CVNC	células viáveis não cultiváveis
DIC	delineamento inteiramente casualizado
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade óptica
DOP	denominação de Origem Protegida
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Enzyme Commission number</i>
<i>Ec.</i>	<i>Escherichia</i>
EST	extrato seco total
g	grama
G	gordura
GES	gordura no extrato seco
Glc-Nac	N-acetilglicosamina
Glu	glicina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	
IM	Índice de maturação
IP	iodeto de propídio
KDa	Kilo dalton
Kg	quilograma
L	litro
LAB	<i>Lactic Acid Bacteria</i>
lb	libra
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>

<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
LDH	lactato desidrogenase
LDR	leite desnatado reconstituído
<i>Le.</i>	<i>Leuconostoc</i>
Lis	lisina
Log	logaritmo
mg	miligrama
min.	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MRS	<i>De Man Rogosa Sharpe</i>
MurNac	N-acetilmurâmico
NaCl	cloreto de sódio
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
nm	nanômetro
nmol	nanomol
NMP	número mais provável
NSLAB	<i>Non Starter Lactic Acid Bacteria</i>
NS <sub>pH4,6</sub>	nitrogênio solúvel em pH 4,6
NS <sub>TCA12%</sub>	nitrogênio solúvel em ácido tricloracético 12%
NT	nitrogênio total
°C	graus Celsius
°D	graus Dornic
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
p	probabilidade
P	Grupo fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PepX	X-prolil dipeptidil aminopeptidase
pH	Potencial hidrogeniônico
pol	pol
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RNA	ácido ribonucléico
RNA <sub>r</sub>	ácido ribonucléico ribossomal
rpm	rotações por minuto
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
SANEST	Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores
SIF	Serviço de Inspeção Federal
sp	indica que a bactéria pertence a um gênero (que o nome precede essa abreviação), mas não a uma espécie identificada.
ST	sólidos totais
TCA	ácido Tricloracético
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
U	unidade de enzima
UFC	unidades formadoras de colônias
URA	umidade Relativa do Ar
v	volume

VNC  
βNA

viável não cultivável  
β nitroanilide

## RESUMO

O parmesão é um queijo típico italiano e possui como características peculiares o baixo teor de umidade, a textura granular e o sabor picante. Seu processamento é sempre lembrado pelo longo período de maturação e durante esta etapa ocorrem numerosas reações bioquímicas de degradação de seus componentes pelas enzimas oriundas do leite e do coalho e daquelas produzidas pelas bactérias, causando mudanças na textura e sabor desse produto. A autólise espontânea de microrganismos termófilos, como *Lactobacillus helveticus*, é uma característica tecnológica importante para a escolha de culturas com potencial de aplicação na fabricação de queijos de massa dura como o Parmesão. Desta forma o objetivo do presente trabalho é avaliar, durante a maturação do queijo Parmesão, o desempenho autolítico de culturas de *Lb. helveticus* autóctones, previamente isoladas de soro fermento. Foram utilizadas as culturas autóctones de *Lb. helveticus*, E<sub>5</sub> com perfil autolítico elevado e A e D<sub>1</sub> com perfil autolítico intermediário. A cultura comercial Cc<sub>1</sub> (Lh-B02, Chr. Hansen) com perfil autolítico elevado foi utilizada como controle. A atividade das enzimas intracelulares LDH e PepX, bem como a viabilidade foram realizadas durante 48 horas de crescimento das culturas. Após a elaboração dos queijos com as diferentes culturas, mensalmente, foi determinada a contagem de lactobacilos termófilos, a atividade das enzimas LDH e PepX, a evolução dos teores de acidez, tirosina, triptofano e índice de maturação no queijo Parmesão ao longo de 180 dias de maturação. A maior liberação das enzimas LDH e PepX *in vitro* foi observada na cultura comercial Cc<sub>1</sub> e autóctone E<sub>5</sub> e comportamento semelhante entre as análises de CDM e cultivo em placa foi observado apenas para a cultura autóctone A e cultivo comercial Cc<sub>1</sub>. A maior população de lactobacilos termófilos nos queijos experimentais foi observada aos 30 dias de maturação. Em todas as amostras de queijos foi observada atividade da LDH e PepX nos estágios finais de cura, sendo a maior atividade nos queijos fabricados com as culturas com caráter autolítico elevado. Houve aumento significativo nos teores de acidez, tirosina e triptofano e IM em todas as amostras de queijo Parmesão ao longo de 180 dias de maturação. As culturas D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> foram aquelas que apresentaram maiores aumentos nos teores dos aminoácidos e do índice de maturação sugerindo o emprego destas na fabricação do queijo Parmesão.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus helveticus*, autólise, contagem direta por microscopia, Parmesão, LDH e PepX.

## ABSTRACT

### **Release of LDH and PepX enzymes and development of ripening of Parmesan cheese added with cultures of *Lactobacillus helveticus* autolitics**

The Parmesan is a typical Italian cheese and has peculiar characteristics such as low moisture level, a granular texture and spicy flavor. Its processing involves long period of ripening and during this stage there are many biochemical reactions produced by enzymes from the raw milk, rennet and those produced by bacteria, resulting in changes in texture and taste of this product. The spontaneous autolysis of thermophilous microorganisms, such as *Lactobacillus helveticus*, is an important technological feature for the choice of cultures with potential application in the production of hard cheeses, such as Parmesan. The objective of this study was to assess the autolytic performance of cultures of autochthonous *Lb. helveticus*, previously isolated from natural whey starter during the ripening of Parmesan cheese. Autochthonous cultures of *Lb. helveticus*, E<sub>5</sub> with high autolytic profile and A and D<sub>1</sub> with intermediary autolytic profile were used. The commercial culture Cc<sub>1</sub> (Lh-B02, Chr. Hansen) with high autolytic profile was used as control. The activity of *in situ* intracellular enzymes LDH and PepX, and the cell viability after 48 hours of growth were determined. Every month during the 180 days of ripening the population of thermophilous lactobacilli, the activity of enzymes LDH and PepX, the acidity, tyrosine, tryptophan contents and the index of ripening on Parmesan cheese were determined. The highest release *in vitro* of the LDH and PepX enzymes was observed in the commercial culture Cc<sub>1</sub> and autochthonous E<sub>5</sub> and similar culture A and the commercial culture Cc<sub>1</sub>. The highest population of thermophilous lactobacilli in the experimental cheeses was observed at the 30 days of ripening. In all cheeses samples it was observed in the cheeses produced with cultures with higher autolytic profile. There was a significant increase in acidity, tyrosine and tryptophan contents and IR in all samples of Parmesan cheese during 180 days of ripening. The cultures D<sub>1</sub> and E<sub>5</sub> had been those that had presented greater increases in amino acids e IR suggesting the use of the cultures in the manufacture of the Parmesan cheese.

**Key words:** *Lactobacillus helveticus*, autolysis, direct counting by microscopy, Parmesan, LDH and PepX.

## 1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse dos consumidores por queijos duros, como o Parmesão, tem motivado o aumento da produção deste derivado lácteo pelas indústrias laticinistas brasileiras, sendo o quarto queijo mais produzido no Brasil. Os queijos duros necessitam de controle rigoroso durante todas as etapas de fabricação, principalmente na seleção da cultura ácido-láctica e o tempo de maturação empregado.

Diante da dificuldade de utilizar soro-fermento; ou seja, soro obtido de um processamento em que foi empregado leite *in natura* fermentado naturalmente; principalmente devido à contaminação e padronização do queijo Parmesão, no Brasil é comum na fabricação deste queijo o emprego de cultura mista exógena. Geralmente, a cultura é constituída por microrganismos termófilos, tais como *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*. Em contrapartida, a utilização de culturas ácido-láticas autóctones confere atributo sensorial singular, revelando, pelo sabor e aroma, aspectos associados às condições edafo-climáticas da região produtora do queijo Parmesão. Estas culturas formam-se sob o controle de fatores tecnológicos em um determinado ambiente, sem sofrer a influência de microrganismos de outra procedência trazidos pelo homem. Ainda, o emprego de culturas lácticas autóctones mantém a biodiversidade natural.

Na elaboração de cultivos lácticos destinados à fabricação de queijo Parmesão é comum selecionar bactérias ácido-láticas capazes de metabolizar completamente a lactose e galactose, produzir ácido láctico de forma controlada, resistir a choques osmóticos e térmicos e inibir microrganismos patogênicos e deteriorantes. Para esta variedade de queijo, outra característica importante é o caráter autolítico das culturas lácticas, como uma alternativa à aceleração do processo de maturação de queijos que requerem longo período de estocagem.

A maturação onera a produção do queijo Parmesão, uma vez que o produto deve ficar estocado durante seis meses de maturação, tempo mínimo exigido pela legislação vigente. Durante este período o queijo adquire textura granular e sabor levemente picante, características peculiares deste produto. No entanto, é possível encontrar no mercado brasileiro peças íntegras ou fracionadas, maturadas por período inferior a seis meses. Como alternativa para acelerar a maturação, a seleção de *Lactobacillus helveticus* com caráter autolítico representa um avanço à tecnologia de fabricação do queijo Parmesão.

A lise de *Lb. helveticus* promove o extravasamento do conteúdo citoplasmático, com conseqüente liberação das enzimas intracelulares, facilitando a interação das lipases e proteases com os substratos presentes na massa do queijo, promovendo as bioconversões que alteram a matriz caseínica. As enzimas de *Lb. helveticus*, principalmente as envolvidas na lipólise e proteólise secundária, promovem a liberação de peptídeos e ácidos graxos de baixo peso molecular, respectivamente, precursores dos compostos voláteis, tais como álcoois, ésteres, cetonas e aldeídos.

O complexo enzimático intracelular de *Lb. helveticus* também é constituído por enzimas glicolíticas e peptidolíticas, representadas comumente pela lactato desidrogenase (LDH) e a X-prolil-dipeptidil aminopeptidase (PepX), respectivamente. Estas são geralmente estudadas, *in vitro* e *in situ*, por demonstrarem no momento da lise das células de *Lb. helveticus* uma maior atividade destas enzimas no meio extracelular. O estudo do caráter autolítico de culturas ácido-láticas e a conseqüente liberação do seu complexo enzimático podem ser relacionados às mudanças nas características físico-químicas do queijo, como a acidez e a proteólise. Estas alterações na matriz caseínica resultam na formação da textura granular, bem como no desenvolvimento do aroma típico do queijo.

Neste contexto, estudos do desempenho de culturas de *Lactobacillus helveticus* autolíticos, isolados das indústrias de laticínios nacionais podem contribuir para o aperfeiçoamento do processo tecnológico de fabricação, bem como melhorar a qualidade do queijo Parmesão brasileiro.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho autolítico de culturas de *Lactobacillus helveticus* autóctones previamente isoladas de soro fermento durante a maturação do queijo Parmesão.

### 2.2 Objetivos específicos

- verificar, por microscopia de fluorescência e pela técnica de cultivo em profundidade, a viabilidade de *Lactobacillus helveticus* A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> cultivado em caldo *De Man Rogosa Sharp* (MRS) pH 5,4 durante 48 horas;
- analisar a atividade das enzimas intracelulares LDH e PepX durante as fases de crescimento de *Lactobacillus helveticus* A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> incubadas a 37 °C por 48 horas;
- produzir queijo Parmesão com culturas de *Lactobacillus helveticus* com diferentes perfis autolíticos, A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>;
- quantificar, mensalmente, a população de lactobacilos termófilos e a atividade enzimática da LDH e PepX no queijo Parmesão durante 180 dias;
- avaliar a evolução dos teores de acidez, tirosina, triptofano e índice de maturação durante 180 dias de maturação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Características físico-químicas, microbiológicas e dados estatísticos de produção do queijo Parmesão

O Parmesão é um queijo típico italiano que possui baixo teor de umidade e textura granular. Em algumas regiões da Itália recebe o nome de Grana (CONSONNI, CAGLIANI, 2008; FOX et al., 2000). As variedades Grana Padano, fabricada na Padania, e Parmigiano-Reggiano, produzidas nas regiões de Parma e Reggio Emília possuem Denominação de Origem Protegida (DOP), garantindo a originalidade a estes produtos (BELLESIA et al., 2003; CANDIOTI et al., 2002). Fatores genéticos, sazonalidade e a alimentação do gado são aspectos regulados pelos órgãos que fiscalizam a fabricação do queijo Parmigiano-Reggiano DOP, uma vez que podem afetar as características do produto final (MALACARNE et al., 2006). Os queijos italianos são obtidos pela fermentação do leite *in natura*, parcialmente desnatado, a partir do metabolismo das culturas ácido-láticas autóctones (COPPOLA et al., 2000), possuindo em média 30 % de umidade, 33 % de proteína e 28 % de gordura, sendo geralmente maturados por período não inferior a 12 meses (GARINI et al., 2007; MALACARNE et al., 2006).

No Brasil o queijo Parmesão apresenta consistência dura, textura compacta e granulosa, crosta espessa de 4 a 8 mm, lisa e cor amarelo-palha, forma cilíndrica e peso entre 5 e 10 Kg. A temperatura de maturação não deve exceder a 18 °C e deve ser maturado por no mínimo 6 meses (BRASIL, 1997). De acordo com Furtado (2005), o queijo Parmesão maturado apresenta 31-32 % de umidade, 32-33 % de proteínas, 27-28 % de gorduras, 1,3-1,5 % de sal e pH entre 5,4 e 5,6.

O queijo Parmesão pronto para o consumo, segundo a legislação brasileira, deve apresentar no máximo  $5 \times 10^2$  NMP.g<sup>-1</sup> de coliformes a 45 °C,  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> de *Staphylococcus* coagulase positiva e ausência de *Salmonella* sp em 25 gramas da amostra (BRASIL, 1996).

Pimentel et al. (2002) observaram que amostras de queijo Parmesão ralado demonstraram conformidade com a legislação para os bioindicadores de contaminação. Entretanto, Salvador et al. (2001) encontraram 40 % de amostras de queijo Parmesão ralado com população de *Staphylococcus* coagulase positiva superior a  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>, indicando divergência com a legislação.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo do Brasil (ABIQ), foram produzidas em 2006, 28.328 toneladas de queijo Parmesão, incluindo as formas íntegra, fracionada e ralada, com crescimento progressivo desde 1991 (Quadro 1). Essa estatística é atualizada uma vez por ano e está disponibilizada somente para os associados no site (<http://www.abiq.com.br/>) da ABIQ na área de acesso restrito.

Quadro 1. Produção brasileira em toneladas de queijo Parmesão em estabelecimentos com SIF (Serviço de Inspeção Federal).

Queijo/Tipo	1991	1995	2000	2005	2006
Parmesão/forma	6.738	8.096	11.000	13.300	14.630
Parmesão/fração	114	139	220	330	363
Parmesão/ralado	6.063	7.284	9.900	12.700	13.335
Total	12.915	15.519	21.120	26.330	28.328

Fonte: Associação Brasileira das Indústrias de Queijo do Brasil.

A popularização de queijos maturados no Brasil, como o Parmesão, foi lenta se comparada aos queijos Prato e Mussarela, por requererem extenso período de maturação em ambiente controlado e matéria-prima de alta qualidade. A indústria de queijos no país enfrenta a competição com os produtos importados, principalmente da Argentina e Europa, os quais possuem tradição na produção de queijos (REZENDE, 2004).

No Brasil o consumo *per capita* de queijos é de aproximadamente 3,0 Kg por ano, índice baixo em comparação a outros países do MERCOSUL, como a Argentina e Uruguai onde são consumidos cerca de 8,0 e 6,8 Kg, respectivamente (REZENDE, 2004). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2006), 32,04 % do total de queijo consumido no Brasil é de Mussarela, 9,61 % de Prato, 7,96 % de Minas e 5,64 % de Parmesão.

### 3.2 Tecnologia de fabricação do queijo Parmesão

Na Itália, o queijo Parmesão é classificado como queijo extra-duro, coagulado pela ação do coalho e maturado, internamente, por ação de bactérias ácido-láticas classificadas com *starters* (LAB) e não *starters* (NSLAB). A Figura 1 demonstra o fluxograma de fabricação do queijo Parmigiano-Reggiano.

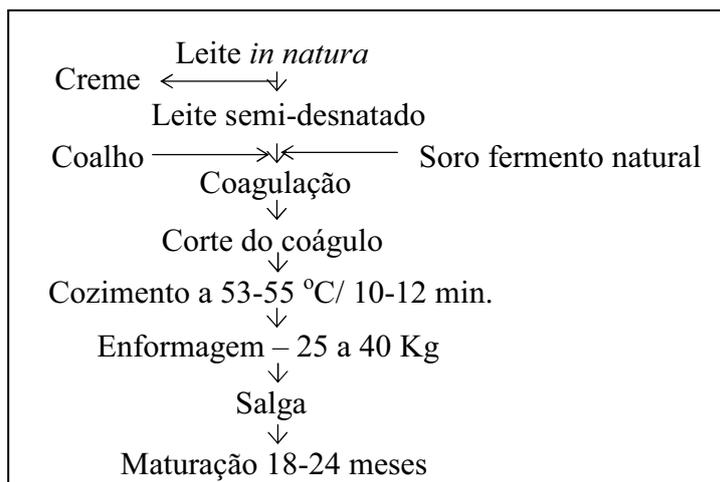


Figura 1. Processo simplificado de fabricação do queijo Parmigiano-Reggiano (FOX et al., 2000).

A padronização do leite utilizado nos processamentos tradicionais da Itália é realizada por sedimentação em tanques após repouso de 5 a 15 horas, sob temperatura entre 16 e 22 °C. Este procedimento é conhecido como *affioramento* (MALACARNE et al., 2006; FOX et al., 2000). Nesta etapa ocorre a depuração física aliada ao desnate natural, pois as aglutininas removem parte da microbiota presente, dentre os quais, microrganismos esporulados que podem induzir o estufamento tardio da massa do queijo durante a maturação (FURTADO, 2005).

As culturas *starters*, nos processamentos tradicionais da Itália, são obtidas da fermentação natural do soro resultante da fabricação do queijo e posteriormente adicionadas ao leite semi-desnatado. Este procedimento é realizado retirando o soro ao final da fabricação, deixando o mesmo em repouso de um dia para o outro, devendo o mesmo apresentar-se aromático e com acidez entre 100 e 120 °D (LINDNER, 2008; FURTADO, 2005).

No Brasil, o queijo Parmesão é fabricado com leite pasteurizado com teor de gordura padronizado para 2,5 %, acidez Dornic entre 16 e 18 °D, população de bactérias mesófilas não superior a  $8,0 \times 10^4$  NMP.mL<sup>-1</sup>,  $2,0 \times 10^0$  NMP.mL<sup>-1</sup> para coliformes termotolerantes, valor inferior a  $5,0 \times 10^0$  NMP.mL<sup>-1</sup> para coliformes totais e ausência de *Salmonella* sp em 25 mL da amostra. Também deve ser verificada a ausência de sabor e odor estranho, neutralizantes de acidez, reconstituintes de densidade e resíduos de antibióticos (BRASIL, 2002).

As enzimas coagulantes comumente empregadas na produção de queijos são aquelas obtidas do quarto estômago de bezerros em lactação, composto de 85 a 95 % de

quimosina e 5 a 15 % de pepsina. É possível encontrar no mercado coalho constituído de quimosina pura, produzido a partir da clonagem do gene que codifica a quimosina em *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Kluyveromyces lactics* e *Trichoderma reesei* (VASCONCELOS et al., 2004).

Os microrganismos termofílicos utilizados na fabricação do queijo Parmesão devem ser inoculados de 1 a 1,5 %, em uma temperatura que pode variar de 32 a 35 °C. A cultura pode ser mista, constituída por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* ou utilizar somente o *Lactobacillus helveticus* como cultura *starter* (PERRY, 2004). A coagulação pela ação do coalho deve ocorrer em no máximo 40 minutos em temperatura de 35 °C (VASCONCELOS et al., 2004; FURTADO, 2005).

Após o corte da coalhada a massa é cozida por aproximadamente 12 minutos em uma temperatura que varia de 53 a 55 °C. Esta temperatura é necessária para a obtenção de uma massa mais seca, e a mexedura que é realizada durante o cozimento proporciona uma redução no tamanho dos grãos, influenciando na formação de uma massa compacta no momento da prensagem. A dessoragem é realizada quando a acidez do soro for igual a 2/3 da acidez inicial do leite, ou seja, no leite com 18 °D o soro apresentará 12 °D (FOX et al., 2000).

A massa é transferida para formas redondas e a prensagem é realizada em prensa individual ou coletiva vertical, com peso ou ar comprimido. No Brasil, o queijo Parmesão é geralmente fabricado em formas de 4 a 5 Kg, diferente do observado na produção do original italiano que em média possui 35 Kg (FURTADO, 2005). Após, a salga é efetuada em salmoura contendo 20 % de cloreto de sódio (NaCl) a 12 °C em período proporcional ao peso do queijo. A secagem após a salga é conduzida em câmara a 10 a 12 °C durante 3 a 5 dias e a maturação em ambiente refrigerado a 12 a 18 °C, com umidade relativa do ar (URA) entre 80 a 85 % durante 6 a 12 meses (FURTADO, 1991).

O Parmigiano-Reggiano é maturado por um longo período, igual ou superior a 2 anos para a obtenção da textura dura e granular, que resulta do emprego de altas temperaturas no cozimento da massa e evaporação da umidade durante a maturação (FOX et al., 2000).

### 3.3 *Lactobacillus*

As bactérias ácido-láticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são microrganismos Gram positivos, não formadores de esporos, com morfologia que pode variar de cocos a bacilos, geralmente catalase negativo, ácido tolerantes, nutricionalmente fastidiosas e metabolismo fermentativo (DELLAGLIO; FELIS, 2005). São encontrados em diferentes ambientes com disponibilidade de carbono e nitrogênio, tais como produtos de panificação, cárneos e lácteos, vegetais e frutas (SILVA et al., 2007).

As bactérias ácido-láticas, de acordo com seus co-produtos metabólicos ou pela sua temperatura ótima de crescimento, podem ser classificadas em homofermentativas, quando o ácido láctico é o principal metabólito (70 a 90 %) e heterofermentativas quando produzem outros compostos, tais como ácido acético, CO<sub>2</sub> e etanol, simultaneamente à síntese de pelo menos 50 % de ácido láctico (Quadro 2). Bactérias ácido-láticas mesofílicas apresentam melhor desempenho fisiológico em temperaturas de 25 a 30 °C, e as termofílicas apresentam maior velocidade específica ( $\mu_e$ ) quando incubados entre 40 a 44 °C.

Quadro 2. Algumas características de bactérias ácido-láticas empregadas em derivados lácteos.

Gênero	Morfologia	Temperatura ótima	Espécie	Metabólito principal
<i>Streptococcus</i>	cocos	40 - 44 °C	<i>S. thermophilus</i>	ácido L(+) láctico
<i>Lactobacillus</i>	bacilos	40 - 44 °C	<i>Lb. bulgaricus</i>	ácido D(-) láctico
			<i>Lb. helveticus</i>	ácido DL láctico
		25 - 30 °C	<i>Lb. lactis</i>	ácido D(-) láctico
			<i>Lb. acidophilus</i>	ácido DL láctico
			<i>Lb. casei</i>	ácido L(+) láctico
<i>Lactococcus</i>	cocos	25 - 30 °C	<i>Lb. kefir</i>	ácido DL láctico
<i>Lactococcus</i>	cocos	25 - 30 °C	<i>Lc. lactis</i>	ácido L(+) láctico
			<i>Lc. cremoris</i>	ácido L(+) láctico
			<i>Lc. diacetylactis</i>	ácido L(+) láctico, acetaldeído, diacetil, acetoina, CO <sub>2</sub>
<i>Pediococcus</i>	cocos	25 - 30 °C	<i>P. acidilactici</i>	ácido DL láctico
<i>Leuconostoc</i>	ovóides	25 - 30 °C	<i>Ln. cremoris</i>	ácido D(-) láctico, acetoina, (ácido acético), diacetil, CO
			<i>Ln. dextranicum</i>	
			<i>Ln. lactis</i>	
<i>Bifidobacterium</i>	bacilos ou bífidos	35 - 38 °C	<i>B. breve</i>	ácido L(+) láctico, ácido acético
			<i>B. bifidum</i>	
			<i>B. longum</i>	

Fonte: Saloff-Coste (1994).

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (GARRITY et al., 2005), o gênero *Lactobacillus* inclui 106 espécies descritas, pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Lactobacillaceae*. A família *Lactobacillaceae* é um grupo monofilético, ou seja, composto por espécies que tem um único ancestral em comum, incluindo os gêneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e *Pediococcus*.

Técnicas de biologia molecular como o seqüenciamento do RNA ribossomal 16S e 23S (RNAr) são alternativas valiosas para a identificação das espécies ácido-láticas, uma vez que a seqüência genômica é conservada durante a evolução. Baseando-se em análises comparativas da seqüência do RNAr, o grupo das bactérias ácido-láticas inclui *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* e apresenta a filogenia demonstrada na Figura 2 (GIRAFFA; ROSSETTI; NEVIANI, 2000).

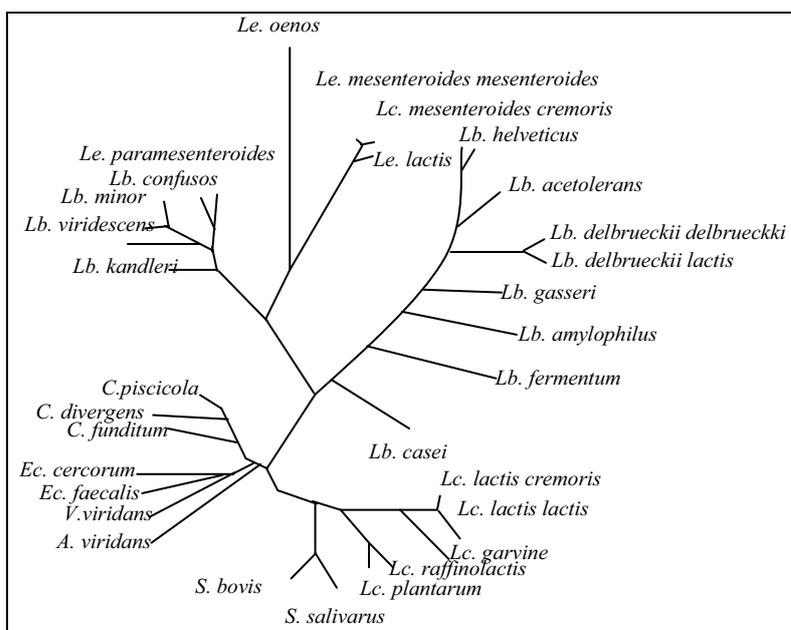


Figura 2. Dendograma demonstrando a relação entre algumas bactérias lácticas. C - *Carnobacterium*; Ec - *Escherichia*; Lb. - *Lactobacillus*; Lc - *Lactococcus*; Le - *Leuconostoc*; S - *Streptococcus* (GIRAFFA; ROSSETTI; NEVIANI, 2000).

O gênero *Lactobacillus* é dividido em três grupos principais com base no tipo de fermentação. No grupo I estão os lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos compostos pelas espécies *Lb. delbrueckii lactis*, *Lb. delbrueckii bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefiranoferens*, *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri* e *Lb. jugurti*. O grupo II é representado por lactobacilos heterofermentativos facultativos como *Lb. casei*, *Lb. paracasei paracasei*, *Lb. paracasei tolerans*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. plantarum* e o grupo III, refere-se aos

lactobacilos obrigatoriamente heterofermentativos que não possuem espécies LAB importantes, exceto àquelas empregadas para a produção de *Kefir* (BURITI; SAAD, 2007; ROBINSON, 2002).

Na homologia DNA/DNA, *Lactobacillus helveticus* forma um estreito grupo com as cepas antigamente denominadas de *Lactobacillus jugurti*, mas não próxima a cepas *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii lactis* e *Lactobacillus gasseri*. A filogenia relacionada entre *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus acidophilus* é indicada pela porcentagem de homologia de 20 a 30 % (GIRAFFA; ROSSETTI; NEVIANI, 2000).

### 3.3.1 *Lactobacillus helveticus*

Os *Lactobacillus helveticus* são microrganismos bacilares regulares Gram positivos, moderadamente termófilos e homofermentativos. São extensivamente utilizados como cultura LAB de queijos duros e semi-duros, tais como Grana Padano, Parmigiano-Reggiano e Suíço (GATTI et al., 2005; GATTI et al., 2004; GIRAFFA; ROSSETTI; NEVIANI, 2000). No queijo, os fatores que controlam o desenvolvimento deste microrganismo incluem a atividade de água ( $A_w$ ), concentração de sal, potencial de oxido-redução, pH, temperatura de maturação e presença de bacteriófagos (FOX et al., 2000).

A presença de diferentes biotipos tem sido demonstrada em estudos de identificação feitos com esta espécie (GATTI et al., 2004; GIRAFFA; ROSSETTI; NEVIANI, 2000). A diversidade fenotípica é determinada pelas características bioquímicas, ou seja, pelo perfil de fermentação e/ou atividade de peptidases e a diferenciação genotípica pode ser realizada pela técnica de *Randomly Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction* – RAPD - PCR (GATTI et al., 2004; GIRAFFA; ROSSETTI; NEVIANI, 2000).

Com relação ao perfil de fermentação de carboidratos, o *Lb. helveticus* pertence ao grupo I (COGAN; ACCOLAS, 1996), sendo incapaz de hidrolisar amígdalina, arabinose, celobiose, esculina, gluconato, manitol, melezitose, melibiose, rafinose, ribose, salicina, sacarose e xilose (ROSSI et al., 2002) e capazes de fermentar a galactose, glicose e lactose (TORRIANI; VESCOVO; SCOLAR, 1994). Cetonas, aldeídos e compostos sulfurados podem ser produzidos a partir do metabolismo de *Lactobacillus helveticus* (KLEIN et al., 2001).

Os *Lactobacillus helveticus* possuem como característica importante capacidade de produzir altas concentrações de ácido láctico em leite e de expressar um complexo sistema proteolítico (BORGO et al., 2007). A proteólise durante o crescimento de *Lactobacillus helveticus* é decorrente da ação de endopeptidases e exopeptidases que hidrolisam as proteínas do leite e liberam os aminoácidos livres necessários ao seu crescimento. Estas enzimas proteolíticas são importantes para a formação dos compostos de aroma e sabor no queijo Parmesão (PAN; TANOKURA, 2004).

### 3.4 Bioquímica da maturação

A maturação é um evento complexo que envolve sucessão da microbiota e conversões bioquímicas nos constituintes da massa, resultando nas características de textura, sabor e aroma dos queijos maturados (McSWEENEY, 2004; PEROTTI et al., 2005). Durante a maturação ocorre perda de umidade, fermentação da lactose, maior ou menor solubilização dos produtos de degradação da caseína, conversão da gordura em ácidos graxos livres e formação da casca do queijo (MALACARNE et al., 2006).

Os compostos de sabor e aroma produzidos durante a maturação bem com a textura adquirida pelo queijo são determinados pelo tipo de processamento empregado, composição da massa, tais como umidade e concentração de sal, cultura iniciadora utilizada e, em alguns casos, pela microbiota secundária (FOX et al., 2000).

O leite contém aproximadamente 60 enzimas endógenas, incluindo lipases e a plasmina, que podem ser termorresistentes quando associadas à micela de caseína (McSWEENEY, 2004; FOX et al., 2000; LAW, 1997). As reações de catálise da lactose envolvem as enzimas da via glicolítica, dentre elas a  $\beta$ -galactosidase e a lactato desidrogenase. A proteólise é catalisada pelas proteinases residuais do leite, do coalho e proteinases e peptidases das bactérias lácticas *starter* e não *starter*. A lipólise é catalisada pelas lipases residuais do leite, esterase do coalho, lipase e esterases das bactérias *starter* e não *starters* e lipases exógenas, adicionadas para acelerar a maturação de queijos (WILKINSON; KILCAWLEY, 2005). Em queijo Parmesão, normalmente é estudada a atividade das enzimas intracelulares lactato desidrogenase, glicose-6-fosfato-desidrogenase, prolina iminopeptidase, aminopetidase N, glutamil amino-peptidase e X-prolil-dipeptidil aminopetidase (GATTI et al., 1999; GATTI et al., 2008a; LINDNER et al., 2008).

### 3.4.1 Glicólise

No leite a lactose é o principal carboidrato compondo aproximadamente 38 % dos sólidos totais. É um dissacarídeo formado por um resíduo de glicose e um de galactose ligados por uma ligação glicosídica  $\beta$ -1,4 (NELSON; COX, 2007). Outros açúcares, como glicose, frutose, glicosamina, galactosamina e oligossacarídeos neutros e ácidos também são encontrados no leite em quantidades reduzidas (WALSTRA; GEURTS; WOUTERS, 2005; LAW, 1997; COGAN; ACCOLAS, 1996).

A lactose é transportada para o interior da célula bacteriana por dois mecanismos, no primeiro o dissacarídeo é fosforilado durante a passagem através da membrana e no segundo, proteínas específica, denominadas permeases, translocam a lactose sem modificação química. Na célula a lactose é então hidrolisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase em glicose e galactose que, posteriormente, são oxidadas a piruvato pela via Embden-Meyerhof-Parnas e Leloir, respectivamente (NELSON; COX, 2007; WALSTRA; GEURTS; WOUTERS, 2005).

O metabolismo dos carboidratos pelas bactérias ácido-láticas pode ser classificado como homofermentativo ou heterofermentativos (Figura 3). A fermentação homofermentativa ou glicólise, via Embden-Meyrhof-Parnas, fornece exclusivamente ácido láctico como produto final. Na fermentação heterofermentativa, via do fosfogluconato fornece ácido láctico, etanol (e/ou acetato) e  $\text{CO}_2$  em quantidades equimolares (WALSTRA; GEURTS; WOUTERS, 2005; LAW, 1997; COGAN; ACCOLAS, 1996).

A redução do piruvato a lactato é catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH) com oxidação do nucleotídeo de piridina NADH em  $\text{NAD}^+$ , sendo que as duas formas isoméricas D ou L-lactato são reduzidas por enzimas específicas para cada isômero (NELSON; COX, 2007).

As bactérias lácticas dependendo da espécie produzem um ou outro isômero. Assim, *Leuconostoc* sp e *Lactobacillus delbrueckii* produzem somente o D-lactato, *Lactococcus* sp e *Streptococcus thermophilus* produzem somente a forma L e *Lb. helveticus* sintetiza uma mistura dos dois isômeros. No entanto, produz principalmente a L-lactato desidrogenase. A racemização do lactato da forma L para a forma D pode levar a formação de cristais brancos, principalmente na superfície do queijo, já que o Ca-D-Lactato é menos solúvel que Ca-L-Lactato (LINDNER, 2008).

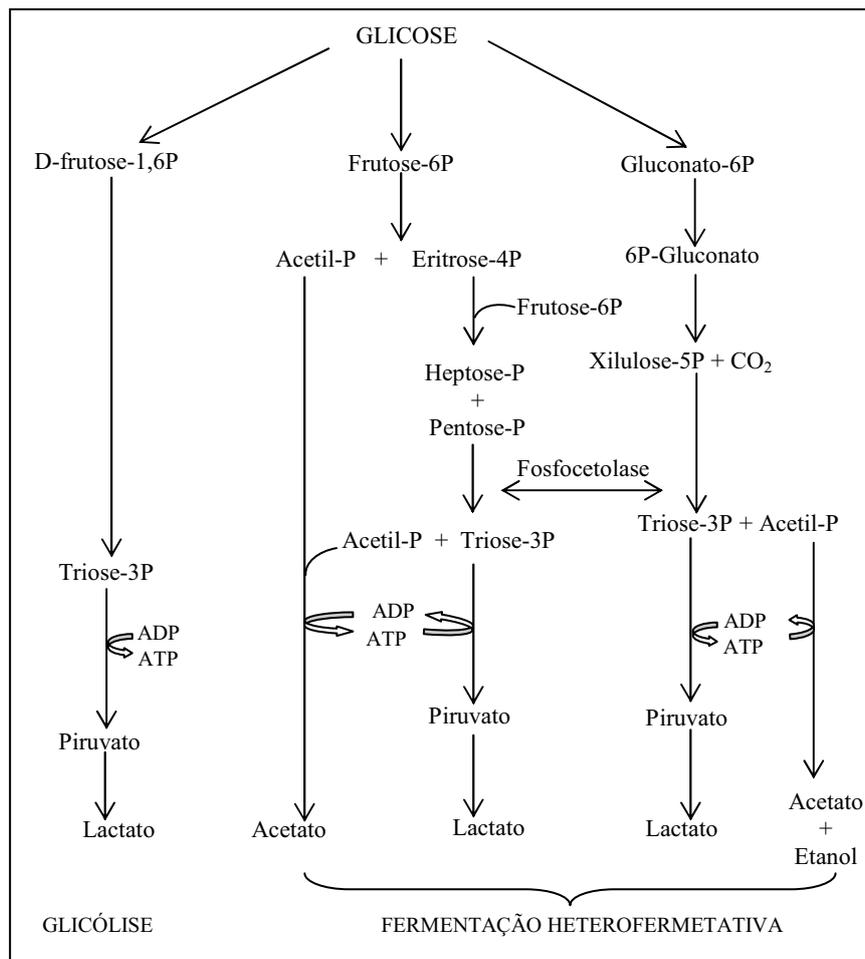


Figura 3. Metabolismo da lactose por bactérias lácticas (KANDLER, 1983).

A metabolização da lactose em ácido láctico é a função primária de qualquer cultura LAB na fabricação de queijos. Durante a fabricação, a acidificação do queijo permite a drenagem da massa e inibe o desenvolvimento da microbiota oportunista (NEVIANI et al., 1995). Segundo Lindner (2008), a catálise completa da lactose residual da massa impede a proliferação de bactérias indesejáveis, que são capazes de utilizar este carboidrato como fonte de energia. A concentração de lactose no leite influencia a característica da massa uma vez que afeta o pH final do queijo, a textura, a atividade enzimática e o desenvolvimento da microbiota secundária (McSWEENEY, 2004).

De acordo com Torriani, Vescovo e Scolari (1994), em queijos duros, a formação de melanoidinas, decorrente da catálise incompleta da galactose, pode ser evitada pela adição de bacilos galactose positivos, tal como o *Lb. helveticus*, pois esta espécie é apta em sintetizar a enzima galactose-1-fosfato uridil transferase (KLEIN et al., 2001; TORINO et al., 2001), impulsionando a oxidação completa deste substrato.

A extensão da acidificação influencia a textura inicial da massa por afetar a desmineralização, relatada como a solubilização do cálcio que ocorre devido à produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas. O ácido produzido reage com o cálcio ligado à caseína, formando o lactato de cálcio, substância solúvel e se perde no soro. A maior produção de ácido láctico induz remoção excessiva do cálcio do complexo da caseína, tornando-a menos coesa ou mais quebradiça (McSWEENEY, 2004). O metabolismo da lactose pela via heterofermentativa pela microbiota secundária forma lactato, etanol, acetato e CO<sub>2</sub>, promovendo a formação de olhaduras e trincas, bem como o desenvolvimento de odores indesejáveis no queijo Parmesão (McSWEENEY, 2004; FURTADO, 2005).

As bactérias ácido-láticas podem utilizar o citrato como fonte de carbono sintetizando succinato e diacetil. O succinato é um composto que se liga ao glutamato monossódio, melhorando as propriedades de aroma e sabor, sendo isolado de muitas variedades de queijos, principalmente o queijo Suíço e Cheddar (LINDNER, 2008). Em queijo Cheddar o succinato é produzido pelas bactérias não *starters* a partir do citrato pela via do ácido tricarbóxico. O diacetil ou butanodiona é outro importante derivado do citrato responsável pelo sabor e aroma de queijos como Cheddar e Cottage, manteiga e iogurtes. Bactérias ácido-láticas não *starter* como *Lactococcus lactis lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides cremoris* podem fermentar o ácido cítrico presente no leite ou no queijo, produzindo diacetil, um componente volátil e muito aromático pela via do ácido cítrico (FOX et al., 2000).

### 3.4.2 Lipólise

A hidrólise dos lipídios (Figura 4) é extensivamente discutida como essencial para a formação dos compostos voláteis característicos do Parmesão (DI CAGNO et al., 2006; MALACARNE et al., 2006; QIAN; REINECCIUS, 2002).

A ação das lipases microbianas contribui para a formação de ácidos graxos de cadeia curta que são liberados durante a maturação dos queijos (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003). Por outro lado, reações oxidativas observadas em ácidos graxos polinsaturados conferem ranço ao queijo (FOX et al., 2000).

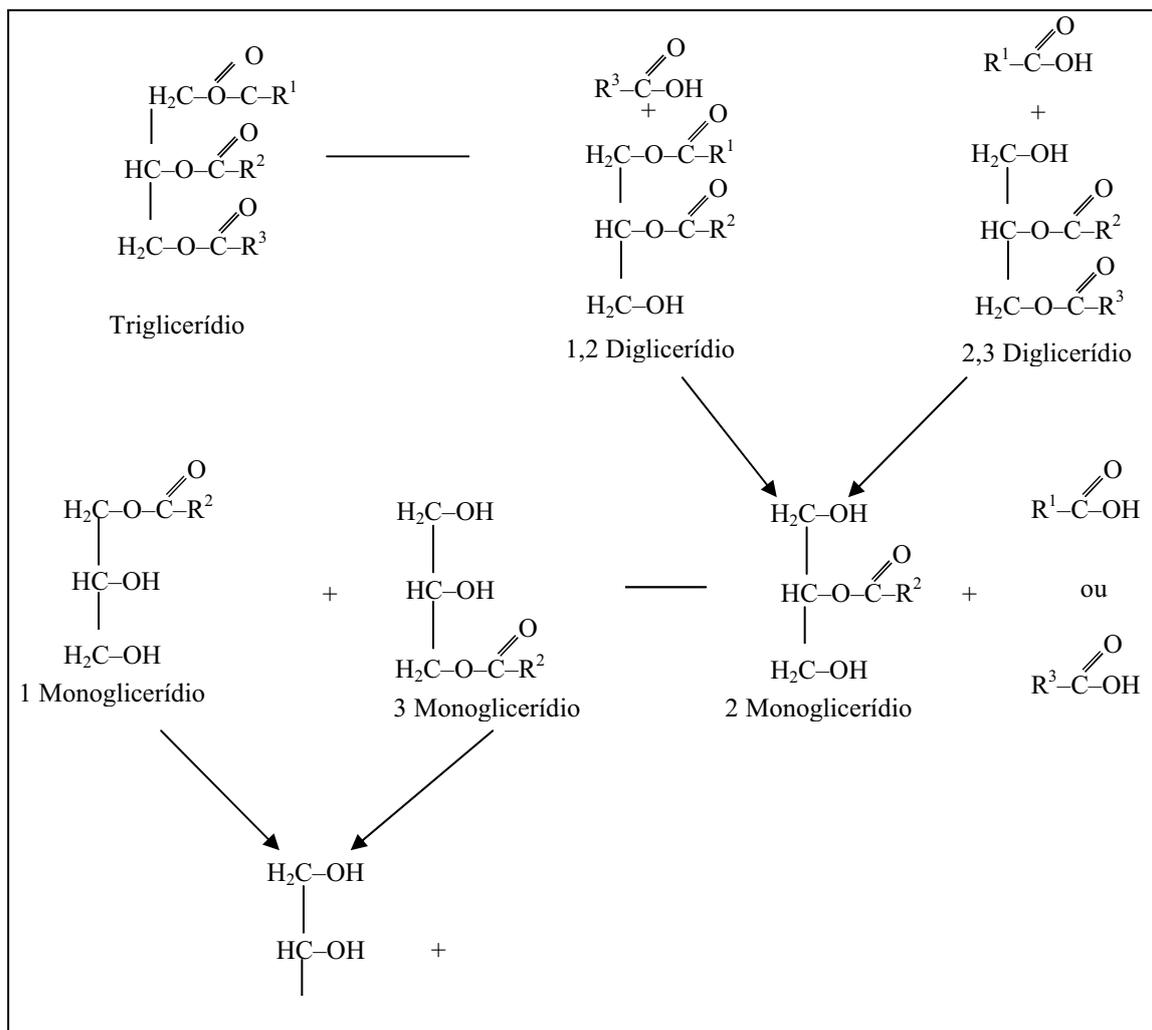


Figura 4. Hidrólise dos triglicerídeos pelas lipases (FOX et al., 2000).

Na lipólise, é comum a ação de lipases e esterases do próprio leite, do coalho e aquelas constituintes do complexo enzimático das culturas ácido-láticas (LINDNER et al., 2008; GATTI et al., 2008b). As lipases das bactérias ácido-láticas do gênero *Lactobacillus* possuem baixa atividade, entretanto, podem atuar sobre a porção lipídica liberando ácidos graxos de cadeia curta e ésteres suficientes para promover alterações no sabor em queijos que requerem longo período de maturação (BROADBENT; STEELE, 2005).

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

### 3.4.3 Proteólise

A proteólise em queijos é um processo enzimático influenciado pela umidade, pH, concentração de sal no queijo, bem como pela temperatura empregada durante a maturação (MALACARNE et al., 2006). A hidrólise das caseínas em regiões específicas promovida por proteinases do coalho é definida como proteólise primária (FOX; McSWEENEY; 1998), enquanto a proteólise secundária envolve a degradação de proteínas e peptídeos de alto peso molecular por proteinases e enzimas peptidolíticas extracelulares das bactérias ácido-láticas. A proteólise primária é observada em todos os queijos e a proteólise secundária é restrita a queijos maturados (WILKINSON; KILCAWLEY, 2004).

A quimosina é a principal enzima presente no coalho, a qual, inicialmente, hidrolisa a caseína intacta entre os resíduos Phe105-Met106 da  $\kappa$ -caseína. As proteinases e peptidases das bactérias ácido-láticas têm importante contribuição na liberação de aminoácidos e peptídeos solúveis em água (McSWEENEY, 2004).

As modificações que ocorrem nas frações protéicas modificando as características sensoriais do queijo Parmesão podem ser mensuradas a partir dos índices de maturação (FURTADO, 1991). A quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis em pH 4,6 é relacionado à ação das enzimas do coalho residual, sendo que as proteinases e peptidases, principalmente oriundas do complexo enzimáticas das bactérias láticas, atuam sobre os peptídios, produzindo compostos de baixo peso molecular, como oligopeptídeos, aminoácidos e aminas, aumentando o nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético - TCA 12 % (FARKEY; FOX, 1990; PEREIRA et al., 2008).

Candioti et al. (2002) em estudo realizado com queijo Reggianito Argentino elaborado com três diferentes cepas de *Lactobacillus helveticus* verificaram que os teores de nitrogênio solúvel em TCA 12 % diferiram ao longo de 180 dias de maturação e o queijo fabricado com *Lb. helveticus* SF209 apresentou maior atividade peptidolítica quando comparada aos outros tratamentos.

### 3.5 Autólise de bactérias láticas em queijo

A autólise espontânea é a desintegração da parede celular resultante da hidrólise das peptideoglicanas pelas autolisinas (KENNY et al., 2005). De acordo com a especificidade que apresentam as autolisinas, elas são divididas em  $\beta$ -N-acetilmuramidase,  $\beta$ -N-

acetilglucosaminidase, N-acetilmuramil-L-alanina amidase e peptidases (Figura 5). Este processo é comumente evidenciado quando as bactérias alcançam a fase estacionária de crescimento ou quando se encontram em condições fisiológicas desfavoráveis (CIBIK; CHAPOT-CHATIER, 2004; PILLIDGE et al., 2002).

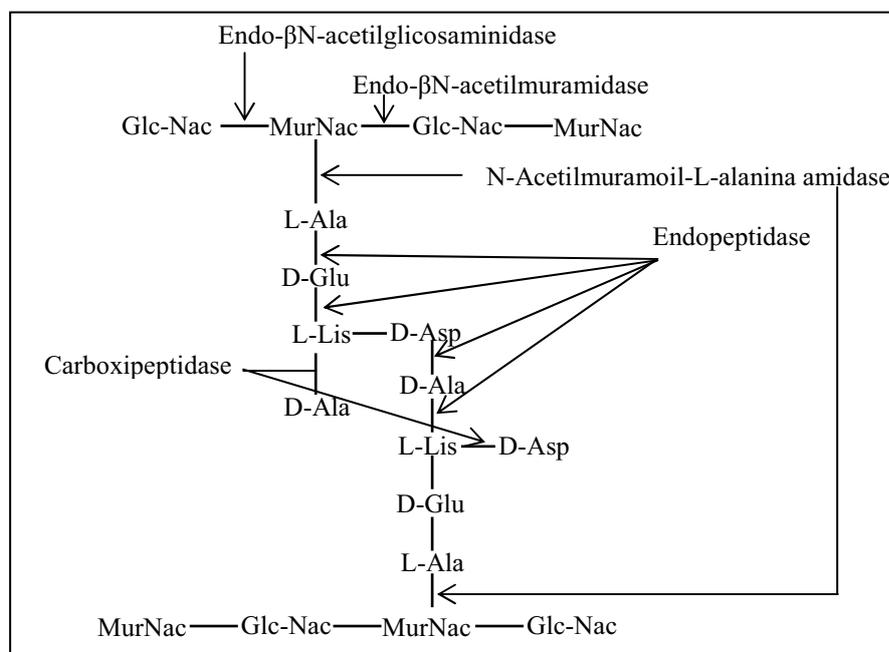


Figura 5. Representação geral da estrutura peptidoglicana da parede celular de *Lactococcus* demonstrando a especificidade das hidrolases de peptidoglicanas (PILLIDGE et al., 2002).

O monitoramento da lise em bactérias ácido-láticas é realizado pela atividade das enzimas intracelulares sobre os carboidratos, lipídeos e proteínas presentes na matriz do queijo (KENNY et al., 2005; KIERNAN et al., 2000).

Na tecnologia de fabricação de queijos duros é comum a indução da lise de culturas ácido-láticas por choques térmicos, osmóticos e emprego de altas pressões com intuito de acelerar a maturação de queijos (O'REILLY et al., 2002). No entanto, os tratamentos empregados para a obtenção de cultivos autolisados podem inativar biomoléculas responsáveis pelo sabor, aroma e conservação dos queijos (SÁNCHEZ-PONTE, 2003, STEPANIAK, 2004, LORTAL; CHAPOT-CHARTIER, 2005, NELSON; COX, 2007).

As análises turbidimétricas podem ser aplicadas para o monitoramento *in vitro* da lise celular, assim como a liberação de componentes intracelulares como ácidos desoxirribonucléico (DNA), ribonucléico (RNA) e enzimas intracelulares (ROSSI, 2001; WILKINSON; KILCAWLEY, 2005; HANNON et al., 2006). Entretanto, o emprego de

técnicas biomoleculares em queijos é limitado, pois no queijo os ácidos nucleicos são rapidamente degradados, dificultando a análise (LORTAL; CHAPOT-CHARTIER, 2005). Desta forma, a cinética de enzimas intracelulares, como a lactato desidrogenase - LDH (EC 1.1.1.27) e X-prolil dipeptidil aminopetidase - PepX (EC 3.4.14.5) tem sido empregada com êxito, como marcador de lise celular (BARROS, 2008a).

Kenny et al. (2006) estudaram a autólise de culturas adjuntas de *Lactobacillus helveticus* durante a maturação de queijo Cheddar, e verificaram que houve uma redução no número de células bacterianas e progressivo aumento da atividade da enzima LDH e das aminopetidases capazes de hidrolisar as ligações dos aminoácidos metionina, lisina e leucina com o composto sintético 7-amino metilcoumarin (AMC). As culturas adjuntas de *Lb. helveticus* autolíticas DPC 5364 e DPC 4571 demonstraram aumento na proteólise e melhores características de aroma e sabor detectados em análise sensorial descritiva.

### 3.5.1 Lactato desidrogenase

Na última etapa da glicólise, o piruvato é reduzido a lactato com contribuição dos elétrons doados nas etapas anteriores. Estes elétrons são transportados pelo NADH e a reação é catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH, EC.1.1.27), sendo o maior produto do metabolismo homofermentativo. O lactato, produto final da sequência glicolítica em condições anaeróbicas, difunde-se através da membrana celular para o meio circundante, como excreção (NELSON; COX, 2007).



Fenelon et al. (2000) estudaram a liberação de lactato desidrogenase em extrato de queijo durante a maturação e verificaram a tendência do aumento dessa enzima com a redução do número de células viáveis.

A autólise de *Lactobacillus* pode ser determinada a partir da redução do NAD<sup>+</sup> a NADH, detectável a 340 nm, predizendo a atividade da enzima LDH no meio. Os resultados geralmente são expressos em unidade da enzima, valor que representa 1 μM de NADH liberado por minuto por mililitro da amostra (U.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) a 37 °C (KENNY et al., 2006; KENNY et al., 2005; COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003; HANNON et al., 2006).

Kenny et al. (2006) estudaram a atividade da LDH em queijos Cheddar empregando *Lactococcus lactis* como cultura *starter* e diferentes cepas de *Lb. helveticus* como culturas adjuntas. Nos processamento em que foram empregados *Lb. helveticus* DPC 4751, *Lb. helveticus* DPC 5353 e *Lb. helveticus* DPC 5364 foram observados maior expressão dessa enzima, com valores médios de 1,14 U.mL<sup>-1</sup>; 0,18 U.mL<sup>-1</sup> e 0,84 U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O queijo fabricado com *Lb. helveticus* DPC 5364 demonstrou melhor característica de sabor e aroma quando comparado à cultura que apresentou a melhor atividade autolítica, indicando que outros fatores, como a atividade das peptidases e o metabolismo dos aminoácidos devem estar associados às alterações sensoriais no queijo.

### 3.5.2 Atividade da X-prolil-dipeptidil aminopeptidase

As bactérias ácido-láticas possuem um sistema proteolítico que as torna capazes de assimilar os aminoácidos constituintes da caseína. Fox e McSweeney (1998) detalharam o sistema proteolítico das bactérias ácido-láticas (Figura 6), explicando que as proteinases estão associadas à membrana celular (CEP, lactocepinas e PrtP), as oligoendopeptidases (PepO e PepF), aminopeptidases (PepN, PepC, PepG), glutamil aminopeptidase (PepA), leucil aminopeptidase (PepL) e X-prolildipeptidil aminopeptidase (PepX) são enzimas intracelulares liberadas durante a lise celular.

O processo de maturação de queijos é influenciado pela atividade das enzimas proteolíticas que promovem a liberação de aminoácidos livres precursores de compostos aromáticos (McSWEENEY; SOUZA, 2000; KENNY et al., 2003; GATTI et al., 2004; GALLO et al., 2005). A alteração na textura proveniente da proteólise ocorre com o enfraquecimento da rede de caseínas. O queijo fresco apresenta uma característica similar à borracha, ao passo que os queijos maturados possuem uma textura firme e friável após a maturação (FOX et al., 2000). Desta forma, as peptidases intracelulares das culturas ácido-láticas utilizadas na fabricação destes queijos estão diretamente relacionadas com as características sensoriais de queijos maturados, como o Parmesão.

No Parmigiano-Reggiano é observada extensa proteólise, sendo 25 % do nitrogênio total constituídos por aminoácidos livres solúveis em água, decorrente do longo período de maturação ao qual esse queijo é submetido e da ação das proteinases e peptidases intracelulares de *Lactobacillus* (SOUSA; ARDO; McSWEENEY, 2001). Broome, Krause e Hickey (1991) consideram que muitas linhagens de *Lactobacillus* apresentam atividade

proteolítica mais intensa que aquela observada para *Streptococcus*, liberando mais rapidamente os aminoácidos, justificando o emprego de *Lb. helveticus* na fabricação do queijo Parmesão.

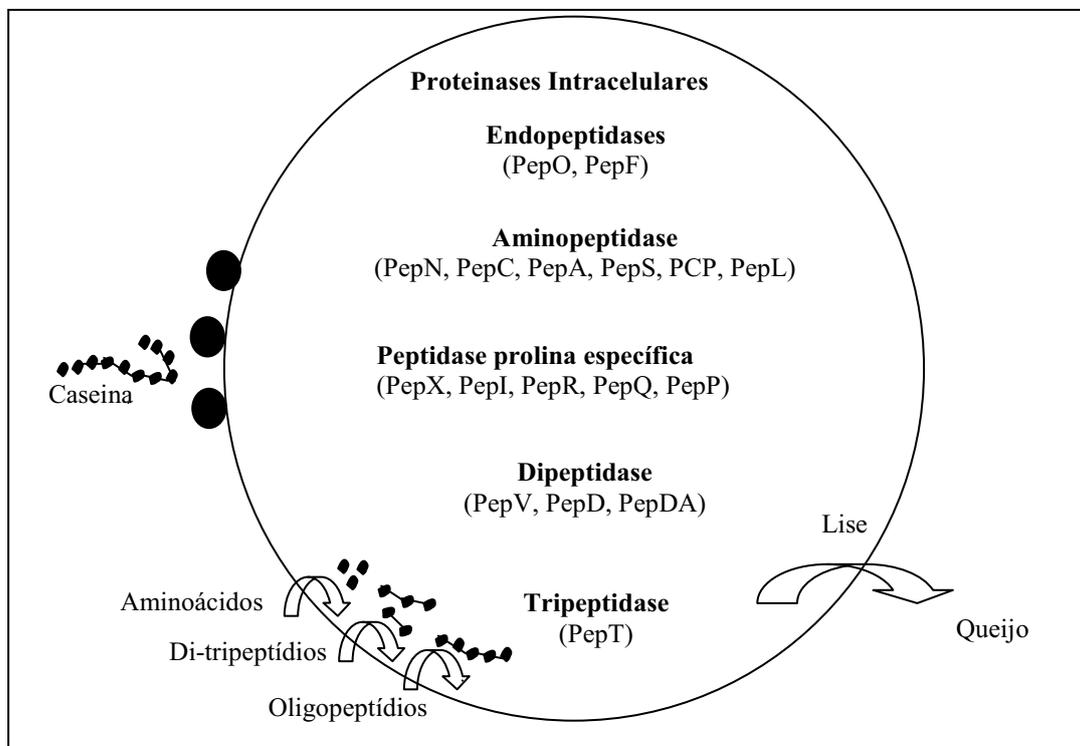
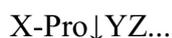


Figura 6. Resumo do sistema proteolítico de bactérias lácticas (McSWEENEY, 2004).

Os *Lb. helveticus* são considerados organismos auxotróficos por desenvolverem a necessidade nutricional de alguns aminoácidos, em decorrência de mutações (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Os aminoácidos metionina, ácido glutâmico, valina, isoleucina, leucina e histina são essenciais para o desenvolvimento de *Lb. helveticus*, obtidos a partir da degradação da matriz protéica e importantes precursores dos compostos de aroma e sabor de queijos (KLEIN et al., 2001; KENNY et al., 2003; LEROY; VUYST, 2004; McSWEENEY, 2004).

A cepa de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 é auxotrófica para 14 aminoácidos, sendo dependente do bom funcionamento do seu complexo sistema proteolítico, do qual faz parte as dipeptidases e aminopeptidases, que são caracterizadas por remover dipeptídeos e aminoácidos, respectivamente. A clivagem com conseqüente liberação de compostos nitrogenados utilizados no desenvolvimento do *Lactobacillus helveticus* ocorre a partir da porção N-terminal dos peptídeos (CHRISTENSEN; STEELE, 2003).

A X-prolil dipeptidil aminopeptidase ou dipeptidil peptidase IV (PepX) é uma enzima homodimérica com peso molecular de 170 kDa, considerada a peptidase prolina específica mais estudada em bactérias lácticas (GALLO et al., 2005). A enzima cliva peptídeos na penúltima ligação na posição N-terminal que contenham resíduos de prolina, liberando dessa forma os dipeptídeos, sendo a atividade dependente do aminoácido terminal e do aminoácido terciário (CHRISTENSEN; STEELE, 2003).



Uma maior atividade desta enzima tem sido relatada frente a substratos sintéticos que contenham aminoácidos neutros (Ala-; Gly-) ou básicos (Arg-) associado à prolina. A clivagem realizada pela PepX liberando Xaa-Pro geralmente ocorre em substratos que contenham de três a sete resíduos de aminoácidos (CHRISTENSEN et al., 1999).

A liberação da peptidase PepX em queijos está relacionada com a característica autolítica das culturas ácido-láticas empregadas no processamento (O'DONOVAN et al., 1996; GATTI et al., 1999; SHEEHAN et al., 2005; KENNY et al., 2006; LINDNER et al., 2008). Sheehan et al. (2005) estudaram a autólise de culturas de *Lactococcus lactis* durante a maturação de queijo Cheddar pela liberação da PepX utilizando o substrato Gly-Pro-AMC. A cultura autolítica *L. lactis* AM2 apresentou atividade da PepX superior àquela demonstrada pela cultura *L. lactis* HP durante todo o período de maturação analisado, sendo aos 42 dias registrados os valores  $9,97 \text{ nmol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$  e  $3,19 \text{ nmol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , respectivamente.

### 3.6 Atividade acidificante

As bactérias ácido-láticas apesar de tolerarem pequenas concentrações de  $\text{O}_2$ , são incapazes de metabolizar os açúcares por meio da respiração, pois não possuem o complexo enzimático do ciclo do ácido tricarboxílico de Krebs. Assim, sintetizam ATP a partir do mecanismo anaeróbico, conhecido como fermentação. Alguns lactobacilos conseguem gerar poucas quantidades de ATP pela fermentação da arginina, metabolismo do citrato ou do aproveitamento da energia gerada pelo efluxo de prótons e outros metabólitos através da membrana. No entanto, esses microrganismos não conseguem

desenvolver-se em ambiente com ausência total de açúcares fermentáveis (McSWEENEY, 2004).

A importância comercial de *Lactobacillus helveticus* se deve principalmente ao seu alto poder acidificante. Os *Lactobacillus helveticus* são homofermentativos e fortes produtores de ácido láctico, com produção superior a 2,0 % (ROSSI, 2001). Cepas desta espécie sintetizam diferentes concentrações máximas de ácido láctico, sendo esta característica recomendada para a seleção de culturas com possível interesse tecnológico.

Em estudo realizado por Barros (2005) monitorando a capacidade acidificante de cepas de *Lactobacillus helveticus* comercial e autóctones em caldo MRS acidificado até pH 5,4, sob diferentes condições de temperatura, foi demonstrado o melhor desempenho quando as culturas foram incubadas a 37 °C. Os microrganismos apresentaram comportamento diferenciado, sendo a máxima atividade acidificante observada para as culturas D<sub>1</sub> e E<sub>4</sub>, que registraram valores de pH igual a 3,51 e 3,23, respectivamente, após 48 horas de incubação. No entanto, a cultura E<sub>5</sub> demonstrou aumento gradativo e ordenado da capacidade acidificante, sugerindo a aplicabilidade deste cultivo na fabricação do queijo Parmesão.

### **3.7 Avaliação direta da viabilidade celular empregando a microscopia de fluorescência**

No estudo da viabilidade de bactérias lácticas em produtos lácteos fermentados, convencionalmente, emprega-se a técnica de contagem em placa, que possui como desvantagens o longo período de incubação e a incapacidade de mensurar as bactérias metabolicamente ativas, mas que não são capazes de se desenvolver no meio, subestimando a concentração microbiana (GATTI et al., 2006; MESA et al., 2003; BUNTHOF; ABEE, 2002). Populações de células viáveis inferiores ao real, obtidas pela contagem em placa se deve a alguns erros dessa análise, tais como: (i) o desenvolvimento de colônias muito pequenas podem ser omitidas durante a enumeração, (ii) duas ou mais células podem se desenvolver sobrepostas e (iii) a diferença de velocidade de crescimento das colônias durante o tempo de incubação (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A contagem em placa não contempla as bactérias lácticas em estágios fisiológicos intermediários, entre o metabolicamente ativo e o de morte da célula, tais como as células permeabilizadas ou protoplasto (NIVEN; MUHOLLAND, 1998; BUNTHOF; ABEE,

2002). A forma de protoplasto é um estágio que antecede a lise completa da célula, a membrana apresenta permeabilidade aos substratos, facilitando o seu acesso às enzimas intracelulares. É possível encontrar essa estrutura celular em queijos, já que a fragilidade do protoplasto é mantida pelo efeito tamponante encontrado na matriz do queijo (BUNTHOF et al., 2001; GIRAFFA, 2004).

A contagem microscópica direta geralmente revela um número maior de organismos do que aquele obtido na contagem em placa, quando utilizada na avaliação em amostras naturais como solo, água e produtos alimentícios (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). A microscopia de fluorescência apresenta como vantagem permitir uma avaliação rápida e direta de células bacterianas viáveis (AUTY et al., 2001).

O Kit LIVE/DEAD® *BacLight*<sup>TM</sup> utiliza uma combinação de dois fluorocromos SYTO® 9, com fluorescência verde, e iodeto de propídio (IP), com fluorescência vermelha, diferindo na habilidade de penetrar as células bacterianas saudáveis. Quando utilizado em separado, o corante SYTO® 9 penetra nas células vivas e mortas. O IP penetra somente nas células com membranas rompidas reduzindo a fluorescência do SYTO®. Assim, células com membranas intactas revelam fluorescência verde e células lisadas vermelha (MOLECULAR PROBES, 2004).

Mesa et al. (2003) estudaram a viabilidade de bactérias do gênero *Acetobacter* e demonstraram que a contagem direta pela microscopia de fluorescência, utilizando o Kit LIVE/DEAD® *BacLight*<sup>TM</sup> apresentou uma relação direta com a contagem em placa quando utilizado cepas de referência. No entanto, a contagem em placa no produto fermentado apresentou um valor quatro ciclos log menor quando comparado com a microscopia de fluorescência.

Gatti et al. (2006) estudaram a eficiência do Kit LIVE/DEAD® *BacLight*<sup>TM</sup> para avaliar a população microbiana em soro fermento natural empregado na fabricação de queijo Grana Padano. Como esperado, a viabilidade das vinte três amostras investigadas foi maior, quando comparado com o número de células cultiváveis em ágar MRS acidificado até pH 5,4. A maior diferença foi detectada em uma amostra onde o valor encontrado pela técnica do cultivo em placa foi de  $7,20 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> e de  $1,35 \times 10^9$  células.mL<sup>-1</sup> para a utilização do kit.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem e reativação das culturas autóctones

As culturas autóctones de *Lactobacillus helveticus*, A, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>, utilizadas neste trabalho, foram isoladas e identificadas por Rossi et al. (2002), a partir de soro fermento de laticínios que não utilizavam cultura láctica comercial para a fabricação dos queijos Parmesão, Mussarela e Provolone. Posteriormente, Barros (2005) caracterizou as culturas ácido-láticas quanto ao perfil autolítico em elevado: E<sub>5</sub> e perfil autolítico intermediário: A e D<sub>1</sub>. A cultura comercial Cc<sub>1</sub> - Lh-B02 (Chr. Hansen<sup>®</sup> Inc., Milwaukee, EUA) com perfil autolítico elevado foi utilizada como controle.

Os cultivos foram mantidos congelados a -18 °C em meio *De Man Rogosa Sharp* (MRS) suplementado com glicerol 15 % (v/v). A reativação das culturas foi realizada por três repiques sucessivos em caldo MRS acidificado até pH 5,4 (MRS<sub>pH 5,4</sub>) e foi feita a incubação a 37 °C por 24 horas para garantir a estabilidade da cultura (JORGE et al., 1990). Posteriormente, 1 % (v/v) da cultura foi inoculado em 500 mL do mesmo meio, seguida da incubação nas mesmas condições para a avaliação da viabilidade e estudo da atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e X-prolil-dipeptidil aminopeptidase (PepX).

### 4.2 Viabilidade celular de *Lactobacillus helveticus*

A viabilidade celular de *Lb. helveticus* foi avaliada nas culturas incubadas por 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas. Para a enumeração de *Lb. helveticus* foi utilizado a técnica de cultivo em placa. Transferindo 1 mL da cultura em 9 mL de água peptonada 1% estéril, constituindo-se a diluição 10<sup>-1</sup>. A partir desta foram realizadas diluições seriadas até 10<sup>-10</sup>. Posteriormente, 1 mL de cada diluição selecionada foi inoculado, pela técnica de profundidade em placas estéreis, utilizando 15 mL de ágar MRS 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<sup>-1</sup>).

A estimativa de células viáveis de *Lb. helveticus* foi determinada utilizando o Kit LIVE/DEAD<sup>®</sup> *BacLight*<sup>™</sup> (Molecular Probes, Eugene, EUA) constituído por dois marcadores de ácidos nucleicos, SYTO<sup>®</sup> 9, que confere fluorescência verde em células viáveis e iodeto de propídio - IP, que confere fluorescência vermelha em células não viáveis (BUNTHOF et al., 2001). Todas as análises foram realizadas em triplicata para as culturas incubadas a 37 °C durante 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas.

Foi utilizado 1 mL da cultura, obtida conforme descrito no item 4.1, adicionada de 3 µL da mistura de SYTO<sup>®</sup> 9 e IP (1:1) para obtenção da suspensão bacteriana. A mistura foi mantida em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente, sob ausência de luz (MOLECULAR PROBES, 2004). Para a análise microscópica, 5 µL da suspensão bacteriana e 0,1 mL de glicerina foram colocadas sobre lâminas de microscopia com dimensões de 26x76 mm e cobertas com lamínula de 30x10 mm. A estimativa de células viáveis foi determinada em duplicata empregando o microscópio de fluorescência *Olympus BX 60* (Olympus, Hamburg, Alemanha) adotando o aumento de 220x. Foram selecionados 10 campos aleatórios, as médias das células viáveis foram calculadas e os resultados expressos por mililitro da amostra (DEKLERK; COFFEY, 1978).

#### **4.3 Preparo do sobrenadante livre de células para análise da atividade das enzimas LDH e PepX *in vitro***

As culturas de *Lb. helveticus* foram incubadas a 37 °C em caldo MRS<sub>pH 5,4</sub> durante 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas para a caracterização da atividade das enzimas LDH e PepX. Após estes períodos, as culturas de *Lb. helveticus* foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em sistema Millipore<sup>®</sup> (Millipore Corporation, Bedford, EUA) equipado com filtro de 0,45 µm de porosidade (VALENCE et al., 2000). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.4 Caracterização da atividade autolítica de *Lactobacillus helveticus* pela liberação da LDH e PepX**

Para o monitoramento da autólise de *Lb. helveticus* pela liberação da enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH), o sobrenadante livre de células foi submetido à

leitura espectrofotométrica ( $DO_{340nm}$ ) utilizando o Kit LDH Liquiform<sup>®</sup> (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil). A atividade enzimática foi expressa em unidades por mL do sobrenadante, em que, 1 unidade foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de  $1 \mu\text{M NADH}\cdot\text{min}^{-1}$  (adaptado de HANNON et al., 2006). Foi realizada a curva de calibração conforme proposto pelo fabricante do kit.

A atividade da enzima PepX foi determinada misturando 0,1 mL do sobrenadante livre de células a 0,05 mL do substrato Gly-Pro-AMC 16,4 mM (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint Louis, EUA) e 2,85 mL de tampão Tris-HCl 50 mM. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C e a reação cessada com adição de 0,5 mL de ácido acético 30 % (v/v). A leitura foi realizada em espectrofluorímetro Hitachi F4500 (Hitachi, Tóquio, Japão) usando excitação de 370 nm e emissão de 440 nm. A atividade da enzima foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de AMC por min.mL (EL SODA; DESMAZEAUD, 1982). A extensão da liberação do 7-amino-4-metilcoumarin - AMC (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint Louis, EUA) foi determinada tendo como referência uma curva padrão construída com a concentração de AMC e a fluorescência emitida.

Simultaneamente à determinação da atividade enzimática, nos mesmos períodos foi monitorado o decréscimo do pH com auxílio do potenciômetro digital PM 608 (Analion<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, Brasil), previamente calibrado.

#### **4.5 Fabricação do queijo Parmesão experimental**

Foram utilizadas culturas de *Lb. helveticus* com perfil autolítico elevado: E<sub>5</sub> e perfil autolítico intermediário: A e D<sub>1</sub>. A cultura comercial Cc<sub>1</sub> - Lh-B02 (Chr. Hansen<sup>®</sup> Inc., Milwaukee, EUA) com perfil autolítico elevado foi utilizada como controle.

Após a reativação, 1,5 % das culturas foram inoculados em leite desnatado reconstituído a 12 % (LDR<sub>12%</sub>) previamente aquecido a 42 °C e, posteriormente, incubado na mesma temperatura por 24 h. As cultura foram resfriadas a 5 °C e utilizadas no momento da fabricação dos queijos (Figura 7).

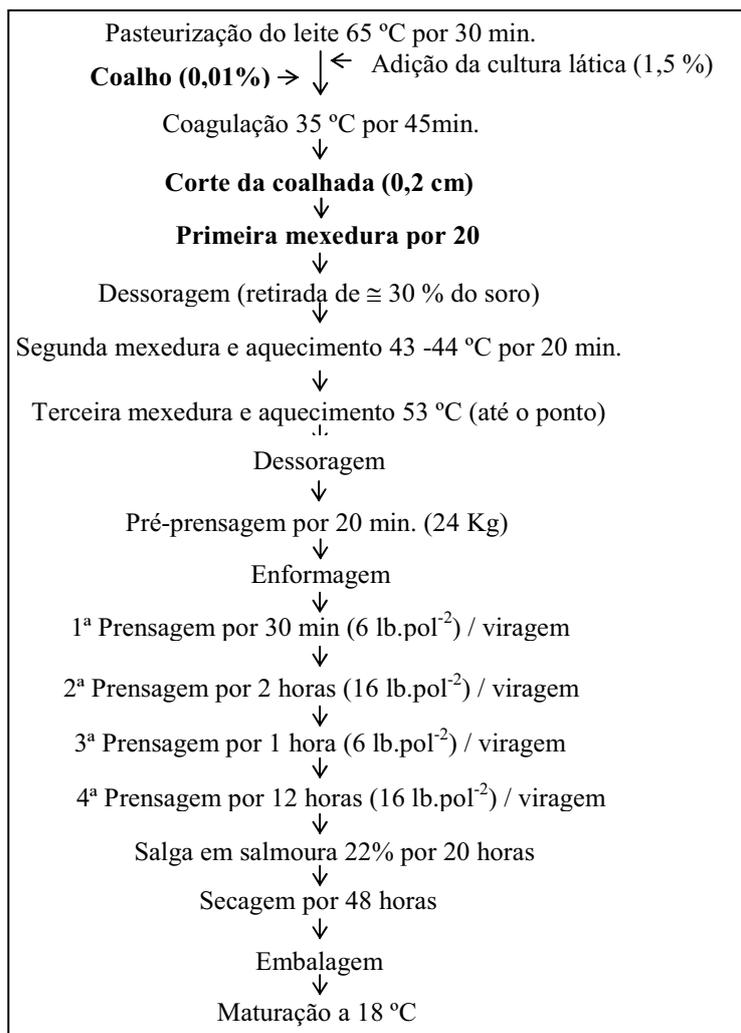


Figura 7. Processo de fabricação do queijo Parmesão experimental.

Para a produção dos queijos experimentais o leite *in natura* foi pasteurizado a 65 °C por 30 minutos. Após o resfriamento do leite a 35 °C, foi adicionado 0,01% do coalho Chy-Max Extra (Chr. Hansen<sup>®</sup> Inc., Milwaukee, EUA ) e 1,5 % da cultura láctica. Foram realizados dois processamentos para cada cultura. Em cada processamento foram utilizados 120 L de leite integral isento de resíduos de antibióticos, perfazendo um total de 960 L de leite e resultando na fabricação de 18 peças de cerca de 1,5 kg para cada cultura. Os queijos fabricados com as culturas A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> foram estocados a 18 °C por 180 dias de maturação.

#### 4.5.1 Caracterização físico-química do queijo Parmesão maturado

Nas amostras de queijo Parmesão maturado por 180 dias foram realizadas as análises para determinação da atividade de água, cinzas, gordura total, gordura no extrato seco, extrato seco total, proteínas e. sal.

A atividade de água ( $A_w$ ) foi determinada pelo método proposto por Van Dender et al. (1995) e a concentração de cinzas por incineração em mufla a 550 °C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O teor de gordura (G) foi determinado pelo método de *Gerber - Van Gulik* (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O teor do extrato seco total (EST) foi determinado pela secagem em estufa a vácuo por 24 horas a 70 °C, conforme recomendado pela *American Public Health Association* (CASE; BRADLEY JR.; WILLIAMS, 1985). O teor de gordura no extrato seco (GES) foi calculado pela equação:

$$\%GES = \frac{G}{EST} \times 100 \quad (1)$$

O teor de nitrogênio total (NT) foi obtido pelo método de *micro-Kjeldahl*. O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o valor do NT por 6,38 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1997) e o teor de sal foi determinado pelo método de dosagem nas cinzas de acordo com Silva et al. (1997).

#### 4.5.2 Evolução da maturação do queijo Parmesão durante 180 dias

Nas amostras de queijo Parmesão, a cada 30 dias, foram realizadas análises para determinação dos teores de acidez, tirosina e triptofano e índice de maturação. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A acidez titulável foi determinada conforme metodologia proposta por Silva et al. (1997). Para a determinação do nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% ( $NS_{TCA12\%}$ ) foi empregada a dosagem do NT no filtrado obtido após precipitação das caseínas (SILVA et al., 1997). O índice de maturação (IM) foi mensurado pela equação:

$$\%IM = \frac{NS_{TCA12\%}}{NT} \times 100 \quad (2)$$

Os teores de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) foram determinados a partir da fração obtida do nitrogênio solúvel em pH 4,6 ( $NS_{pH4,6}$ ), por leitura espectrofotométrica, conforme recomendado por Vakaleris e Price (1959), empregando os comprimentos de

onda 270 e 290 nm, respectivamente. As concentrações de Tyr e Trp foram determinadas usando as equações:

$$Tyr(mM.L^{-1}) = (0,95 \times A_{270} - 1,31 \times A_{290}) \times 2 \quad (3)$$

$$Tyr(mg.100g^{-1}queijo) = mM.L^{-1} \times 453 \quad (4)$$

$$Trp(mM.L^{-1}) = (0,307 \times A_{290} - 0,020 \times A_{270}) \times 2 \quad (5)$$

$$Trp(mg.100g^{-1}queijo) = mM.L^{-1} \times 510,5 \quad (6)$$

#### 4.5.3 Viabilidade de lactobacilos termófilos no queijo Parmesão maturado

A viabilidade de lactobacilos termófilos foi avaliada nas amostras do queijo Parmesão maturado por 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, empregando a técnica de cultivo por profundidade, utilizando como meio de cultura o ágar MRS<sub>pH 5,4</sub>, seguida de incubação a 37 °C em condições de anaerobiose durante 48 horas (adaptação de SILVA et al., 2007). Para isto, 10 g de queijo Parmesão previamente triturado foram adicionados a 90 mL de citrato de sódio 2% estéril, constituindo-se a diluição 10<sup>-1</sup>. A partir desta, foram realizadas diluições seriadas até 10<sup>-10</sup> utilizando 9 mL de citrato de sódio 2% como diluente. Posteriormente, 1 mL de cada diluição selecionada foi inoculado, pela técnica de profundidade em placas estéreis, utilizando 15 mL de ágar MRS como meio de cultura. Após a 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<sup>-1</sup>). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.5.4 Preparo do sobrenadante livre de células para análise da atividade das enzimas LDH e PepX *in situ*

A atividade das enzimas LDH e PepX foi monitorada, nos queijos maturados por 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Em 25 mL de água destilada estéril, foi adicionada 5 g da

amostra, previamente triturada. Após homogeneização manual por 2 min., o homogenato foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos a 4 °C. O homogenato foi filtrado em sistema Millipore® (Millipore Corporation, Bedford, EUA) equipado com filtro de 0,45 µm de porosidade. O sobrenadante foi utilizado para a caracterização da atividade das enzimas. A liberação da LDH e PepX *in situ* foi realizada utilizando o mesmo protocolo empregado no item 4.4.1.

#### **4.6 Análise estatística**

A análise de variância (ANOVA) dos resultados foi realizada a partir de um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x7 (tratamento x período de incubação) para os testes *in vitro* e 4x6 (tratamento x tempos de maturação) para os ensaios *in situ*. Foi aplicado teste de Tukey para comparação das médias das amostras, considerando um nível de significância  $p < 0,05$ , utilizando o programa computacional Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores - SANEST (ZONTA; MACHADO, 1996).

## 5. RESULTADOS E DISCUSÃO

### 5.1 Viabilidade de *Lactobacillus helveticus* in vitro

A população de *Lactobacillus helveticus* nas culturas A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> cultivadas em caldo *De Man Rogosa Sharp* pH 5,4 (MRS<sub>pH 5,4</sub>) apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) nos diferentes períodos de incubação (Figura 8).

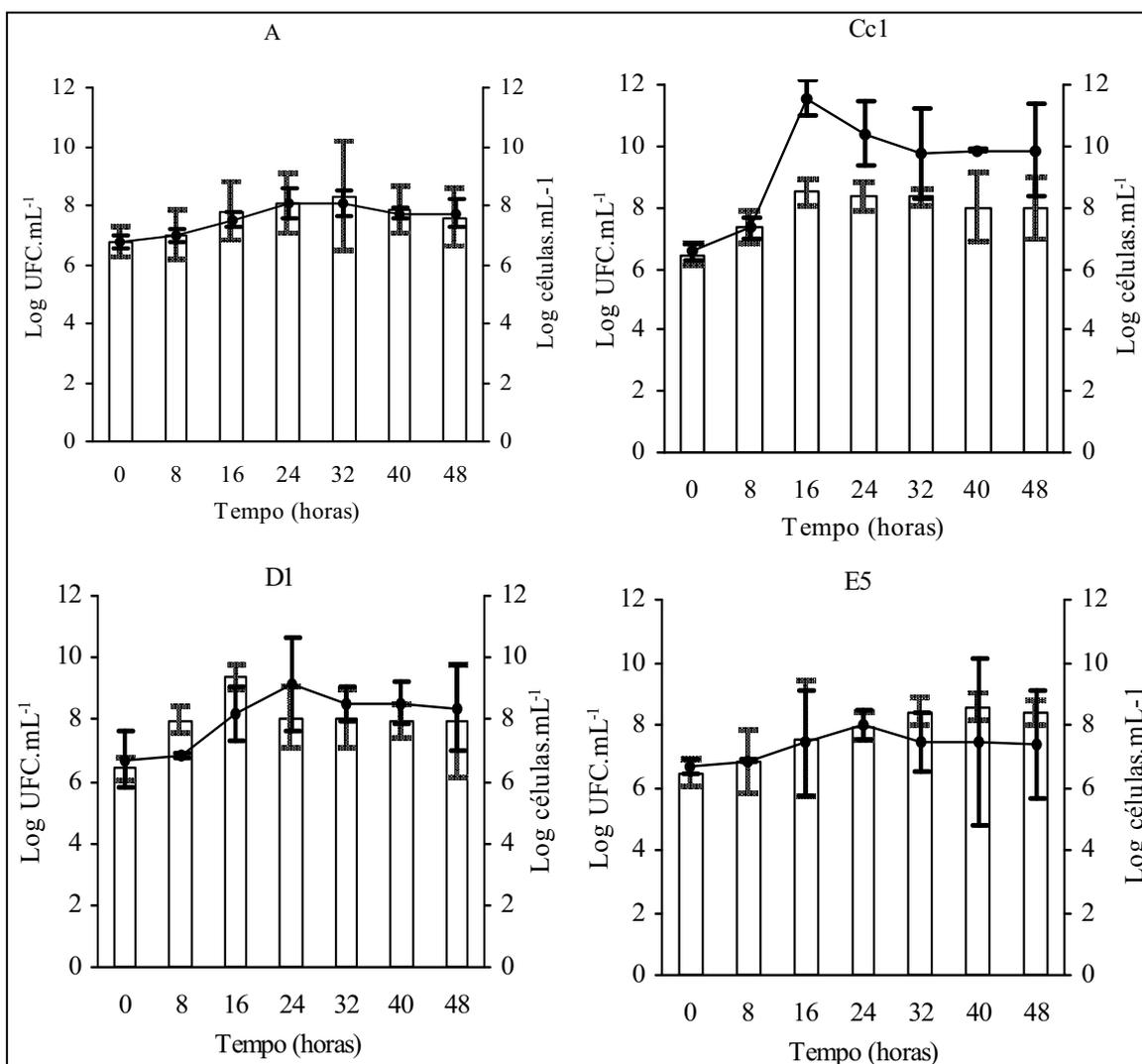


Figura 8. Viabilidade de *Lb. helveticus* cultivado em caldo MRS<sub>pH 5,4</sub> e incubado a 37 °C durante 48 horas (linha: cultivo em profundidade; barra: Kit LIVE/DEAD; barra de desvio contínua: cultivo em profundidade; barra de desvio sombreada: Kit LIVE/DEAD).

No tempo 0 os resultados médios da contagem em placa das culturas A e D<sub>1</sub> não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ). No período de 6 horas não houve

diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) para as culturas  $D_1$  e  $E_5$ . Nos demais períodos analisados houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as quatro culturas no mesmo período de incubação. Os resultados médios da contagem direta por microscopia (CDM) não demonstrou diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre as culturas  $Cc_1$ ,  $D_1$  e  $E_5$  no tempo 0; A e  $D_1$  no período de 24 horas, A e  $Cc_1$  em 32 horas,  $Cc_1$  e  $D_1$  após 40 e 48 horas de incubação.

O melhor desempenho foi observado após 16 horas para a cultura comercial  $Cc_1$  apresentando população de  $11,57 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ , seguida da cultura autóctone  $D_1$  com  $9,11 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  após 24 horas de crescimento ( $p < 0,05$ ). O desempenho metabólico das culturas durante os períodos analisados demonstrou que, mesmo após o congelamento e repiques sucessivos, as culturas apresentaram comportamento semelhante àqueles registrados por Barros (2005). A viabilidade máxima foi de aproximadamente  $5,5 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  para a cultura  $Cc_1$  e  $3,5 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  para a cultura  $D_1$  após 16 horas e 24 horas de desenvolvimento, respectivamente.

A presença da fase exponencial, seguida da redução abrupta da viabilidade celular na curva de crescimento caracteriza as culturas  $Cc_1$  e  $E_5$  com perfil autolítico elevado (ROSSI, 2001; HANNON et al., 2003; BARROS, 2005). Rossi (2001) verificou, a partir de fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão, que as células ao atingirem a fase de declínio tornavam-se menos densas e apresentavam interrupções na parede celular.

De modo geral, nos períodos que antecedem as 16 horas de incubação, os resultados médios obtidos pela contagem direta por microscopia (CDM) foram superiores quando comparados àqueles obtidos pela técnica de cultivo por profundidade. Os dados da CDM dos cultivos autóctones A e  $E_5$  e cultivo comercial  $Cc_1$  foram semelhantes aos obtidos pela técnica tradicional de cultivo em placa ( $p > 0,05$ ). O maior valor observado para *Lb. helveticus* na cultura A foi igual a  $8,32 \text{ Log células viáveis.mL}^{-1}$  no tempo de 32 horas, na cultura  $Cc_1$   $8,49 \text{ Log células viáveis.mL}^{-1}$  (Figura 8) após 16 horas e na cultura  $E_5$   $8,57 \text{ Log células viáveis.mL}^{-1}$  no tempo de 40 horas.

Gatti et al. (2006), ao avaliarem a população de bactérias ácido-láticas isoladas de soro fermento utilizado na fabricação do queijo Grana Padano, observaram em um mesmo período população igual a  $7,86 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  e  $9,13 \text{ Log células viáveis.mL}^{-1}$  para CDM.

Com o aumento do período de incubação foi possível observar maior permeabilidade de *Lb. helveticus* ao fluorocromo iodeto de propídeo - IP (fluorescência

vermelha). Possivelmente, a exaustão nutricional aliada aos metabólitos microbianos, tais como ácidos orgânicos dissolvidos no meio, pode ter induzido o decréscimo da viabilidade de *Lactobacillus helveticus* (Figura 9).

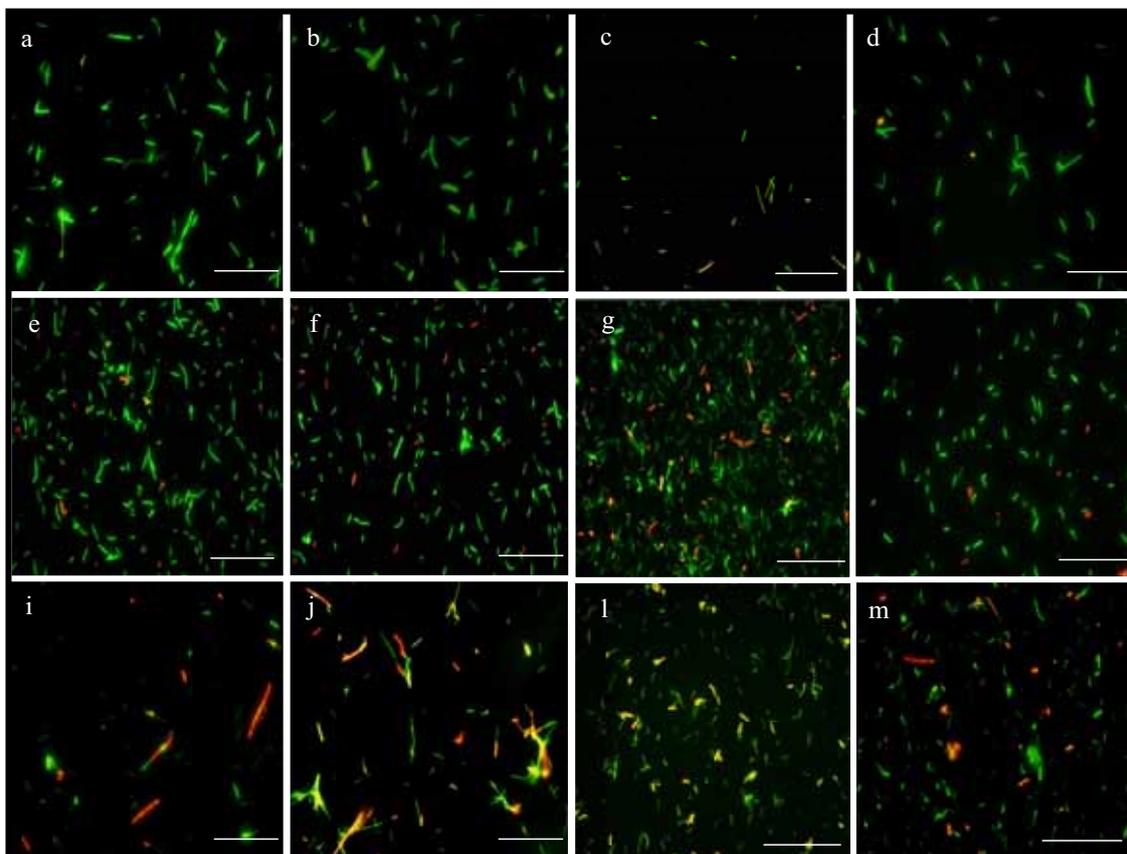


Figura 9. Fotomicrografias de fluorescência obtidas do cultivo de *Lb. helveticus* em caldo  $MRS_{pH\ 5,4}$  e incubado a  $37\ ^\circ C$  durante 48 horas. Células íntegras: verde; Células lisadas: vermelho-alaranjado (a, e, i - cultura comercial  $Cc_1$  após 8, 16 e 48 horas de cultivo; b, f, j - cultura autóctone A após 16, 24 e 48 horas de cultivo; c, g, l - cultura autóctone  $E_5$  após 16, 24 e 48 horas de cultivo; d, h, m - cultura  $D_1$  após 8, 24 e 48 horas de cultivo,  $100\ \mu m$ ).

A viabilidade de bactérias ácido-láticas em leite fermentado foi estudada por Auty et al. (2001) empregando a técnica tradicional e o kit LIVE/DEAD, sendo o maior valor registrado igual a  $8,36\ \text{Log UFC.mL}^{-1}$  na contagem em placa e  $8,50\ \text{Log células viáveis.mL}^{-1}$  para CDM. Maukonen et al. (2006), comparando diferentes técnicas *in vitro* para contagem da população de bactérias do gênero *Lactobacillus*, verificaram que o número de células viáveis encontrado na CDM e citometria de fluxo foram similares ao obtido na técnica de cultivo em placa.

A contagem em placa, geralmente apresenta valores inferiores aos resultados da CDM, pois a mesma é restrita aos microrganismos que podem se desenvolver, formar

colônias e serem detectados em meio sólido (GATTI et al., 2006). Por outro lado, a técnica de CDM inclui as bactérias em estágios fisiológicos intermediários, entre o metabolicamente ativo e o de morte celular, denominadas células viáveis não cultiváveis - CVNC (GATTI et al., 2006, GIRAFFA, 2004, BUNTHOF, ABEE, 2002). Em queijos que requerem longo período de maturação as bactérias ácido-láticas podem ser encontradas em estado de CVNC, devido às condições favoráveis neste ambiente, tais como o efeito tamponante (SALÄUN; MIETTON; GAUCHERON, 2005) e a interação desta microbiota aos substratos do queijo.

## **5.2 Caracterização do desempenho autolítico *in vitro* pela liberação de enzimas intracelulares**

A atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) e X-prolil-dipeptidil aminopeptidase (PepX) para todas as culturas apresentou diferença estatística significativa nos períodos estudados ( $p < 0,05$ ). Para a enzima LDH quando as médias das quatro culturas foram comparadas nos períodos 0 e 8 horas não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ). Nos períodos subsequentes todas as culturas apresentaram resultados com diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) comparando as quatro culturas em um mesmo período de incubação.

Os resultados médios da atividade da enzima PepX demonstraram diferença estatística significativa em todos os tempos estudados ( $p < 0,05$ ) entre as culturas em um mesmo período, exceto entre as culturas Cc<sub>1</sub> e D<sub>1</sub> após 0 e 48 horas de incubação.

O comportamento da cultura autóctone A em caldo MRS<sub>pH 5,4</sub> demonstrou máxima atividade para a enzima LDH (Figura 10) e PepX (Figura 11) com valores iguais a  $1,32 \pm 0,21 \text{ U.mL}^{-1}$  (40 horas) e  $5,39 \pm 0,61 \text{ } \mu\text{mol de AMC.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$  (24 horas), respectivamente.

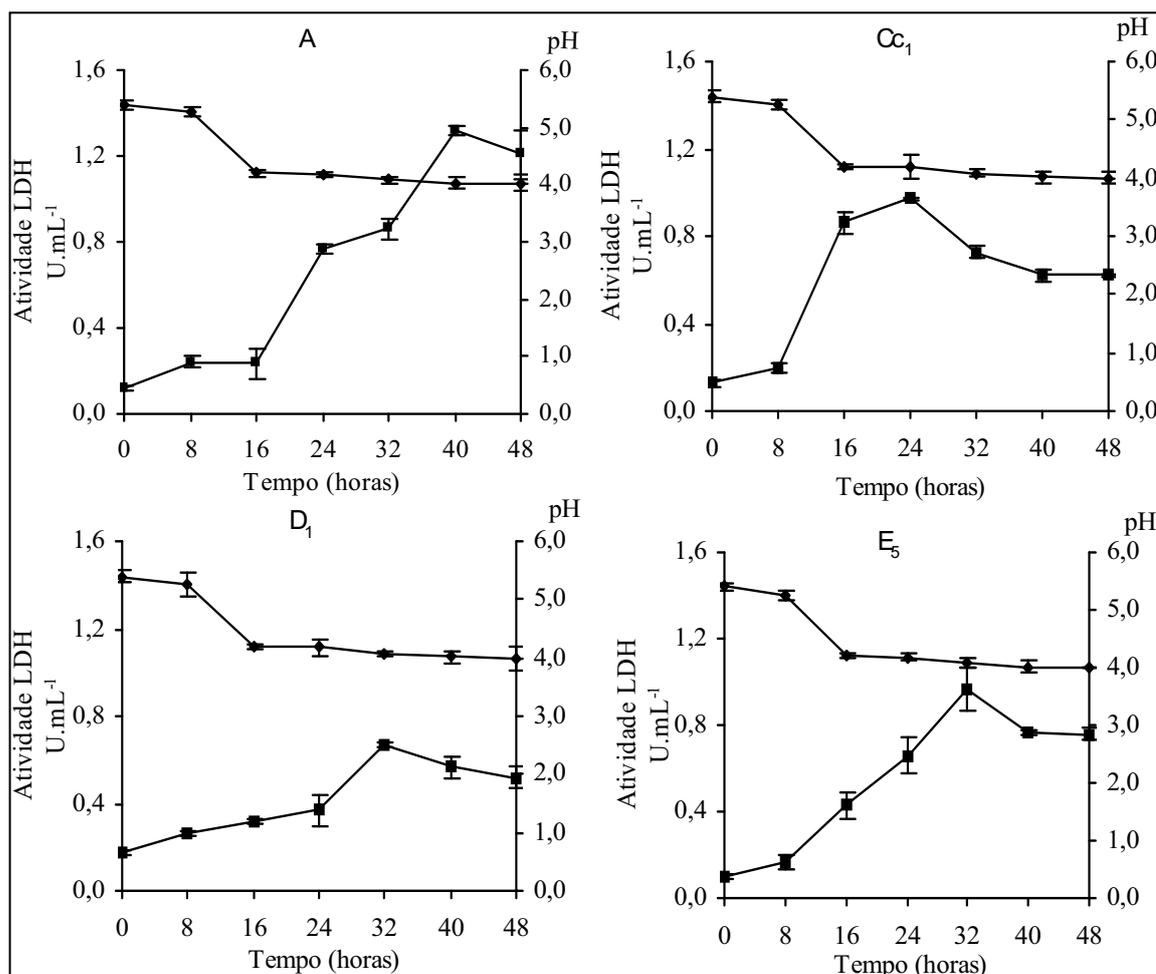


Figura 10. Atividade da LDH (■) e decréscimo do pH (▲) de *Lb. helveticus* cultivado em caldo MRS<sub>pH 5,4</sub> e incubado a 37 °C durante 48 horas.

Para a cultura autóctone A o decréscimo da atividade da PepX após 24 horas não era esperado, pois neste mesmo período os microrganismos encontravam-se na fase estacionária da curva de crescimento, observada pelo cultivo em placa, com população de 8,08 Log UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 8). Possivelmente, a cultura autóctone A tenha sido capaz em induzir o abaixamento do pH intracelular simultaneamente à redução do pH extracelular, impedindo o choque osmótico (VOROB'EVA, 2004), permanecendo em fase estacionária entre 24 e 32 horas. Entretanto, a enzima PepX liberada a partir de 24 horas, provavelmente demonstrou sensibilidade ao pH do meio ( $4,18 \pm 0,20$ ), uma vez que as peptidases de *Lb. helveticus* podem ser afetadas em  $\text{pH} \leq 4,5$  (SALAÜN; MIETTON; GAUCHERON, 2005), justificando a redução acentuada após 24 horas.

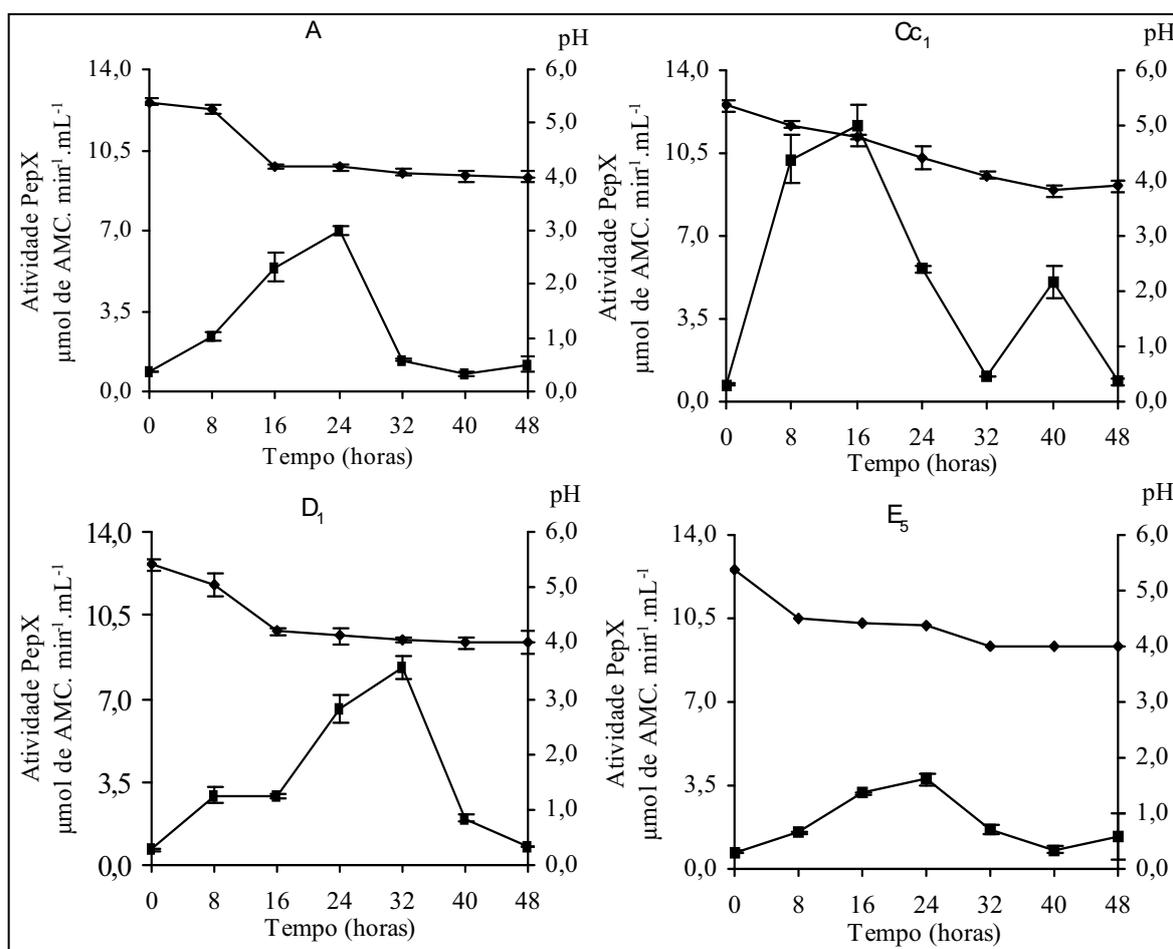


Figura 11. Atividade da PepX (■) e decréscimo do pH (▲) de *Lb. helveticus* cultivado em caldo MRS<sub>pH5,4</sub> e incubado a 37 °C durante 48 horas.

O maior aumento da atividade da enzima LDH pelo *Lb. helveticus* na cultura comercial Cc<sub>1</sub> foi observado entre 8 ( $0,20 \pm 0,02 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e 16 horas ( $0,87 \pm 0,10 \text{ U.mL}^{-1}$ ), sendo registrado a atividade máxima igual a  $0,97 \pm 0,10 \text{ U.mL}^{-1}$  em 24 horas, e partir deste período foi observado um decréscimo gradativo da atividade desta enzima ( $p < 0,05$ ). Os valores da atividade da LDH são coerentes com àqueles obtidos pela técnica CDM e plaqueamento, em que esta espécie iniciou a fase exponencial a partir de 8 horas, com redução de células viáveis a partir de 16 horas (Figura 8).

Durante os períodos estudados a LDH obtida do filtrado livre de células da cultura autóctone D<sub>1</sub> demonstrou comportamento semelhante àquele registrado para a cultura ácido-lática A, apresentando máxima atividade, entre 32 e 40 horas, com valores médios iguais  $0,67 \pm 0,01 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $0,57 \pm 0,10 \text{ U.mL}^{-1}$ , respectivamente, com diferença estatística

significativa ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, a maior atividade da PepX para a cultura D<sub>1</sub> foi observada em 32 horas ( $8,31 \pm 1,50 \mu\text{mol de AMC} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), seguido do decréscimo em 40 horas com valor médio de  $1,97 \pm 0,12 \mu\text{mol de AMC} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Figura 11). Em 24 horas do desenvolvimento desta cultura, o valor de pH era igual a  $4,12 \pm 0,10$ , o que pode ter afetado a atividade das peptidases, pois as aminopeptidases de *Lb. helveticus* tem a sua atividade afetada em valor de pH inferior a 4,5 (PAN; TANOKURA, 2004).

A presença da fase estacionária na curva de crescimento dos microrganismos autóctones A e D<sub>1</sub>, os classificam como culturas com caráter autolítico intermediário quando comparadas à cultura comercial Cc<sub>1</sub> (controle), a qual apresenta a fase de declínio imediatamente após a fase exponencial (Figura 8). Kenny et al. (2005) avaliaram e classificaram o caráter autolítico *in vitro* de diferentes culturas de *Lb. helveticus* com potencial para utilização na fabricação de queijo Cheddar. Dentre os 41 isolados, 4 culturas foram consideradas com caráter autolítico elevado, uma vez que apresentaram índices superiores a  $0,2 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$  e  $0,6 \text{ nmol de AMC} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  para LDH e PepX, respectivamente após 24 horas de incubação. Os resultados da atividade das enzimas LDH e PepX das 4 culturas empregadas neste trabalho foram superiores aos encontrados por estes autores.

O rápido decréscimo do pH promovido pelo metabolismo das culturas autóctones A e D<sub>1</sub> pode dificultar a tecnologia de fabricação de queijos que requerem longo período de maturação, pois a elevada produção de ácido láctico pode causar trincas na superfície dos queijos e aumentar a friabilidade destes produtos (McSWEENEY, 2004; FURTADO, 2005).

O ensaio realizado com a cultura de *Lb. helveticus* autóctone E<sub>5</sub> demonstrou que as enzimas LDH e PepX apresentaram máxima atividade em 24 horas, com valores médios iguais a  $0,97 \pm 0,01 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  e  $3,77 \pm 0,23 \mu\text{mol de AMC} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectivamente (Figuras 10 e 11). Durante os períodos que antecedem este intervalo, a atividade da LDH demonstrou aumento linear, com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Este comportamento foi similar ao da cultura comercial Cc<sub>1</sub>, que também apresentou máxima atividade das duas enzimas em período de incubação menor ou igual a 24 horas. As culturas autóctones A e D<sub>1</sub> apresentaram máxima atividade das enzimas depois de 32 horas, sugerindo a possível aplicação das culturas comercial Cc<sub>1</sub> e autóctone E<sub>5</sub>.

Rossi (2001) observou em fotomicrografias obtidas por microscópio eletrônico de transmissão a lise da cultura Cc<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> a partir de 24 horas, e Barros (2005) verificou a

intensa atividade da  $\beta$ -galactosidase, indicando o momento da morte celular destas culturas ácido-láticas.

No momento de declínio da atividade das enzimas LDH e PepX para as culturas Cc<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>, o pH do meio era igual  $4,01 \pm 0,03$  e  $4,10 \pm 0,10$ , respectivamente. Possivelmente, assim como observado nas culturas ácido-láticas autóctones A e D<sub>1</sub>, a presença de metabólitos pode influenciado na atividade destas enzimas. Por outro lado, é possível que estas culturas, por apresentarem caráter autolítico elevado, tenham se desenvolvido rapidamente, hidrolisando a glicose e os peptídeos contendo o aminoácido prolina em menor tempo e cessado sua atividade por esgotamento do substrato (NELSON; COX, 2007).

Houve correlação entre a viabilidade celular das culturas de *Lb. helveticus in vitro* obtida por contagem direta por microscopia (CDM) e contagem em placa somente para as culturas A e Cc<sub>1</sub> (Tabela 1).

Tabela 1. Coeficientes de correlação ( $r^2$ ) entre viabilidade celular e liberação das enzimas LDH e PepX de *Lb. helveticus*.

Culturas	Correlação CDM e UFC	Correlação CDM e LDH	Correlação CDM e PepX	Correlação UFC e LDH	Correlação UFC e PepX
A	0,97	0,59	0,35	0,70	0,35
Cc <sub>1</sub>	0,94	0,93	0,28	0,94	0,28
D <sub>1</sub>	0,50	0,27	0,28	0,68	0,28
E <sub>5</sub>	0,74	0,97	0,11	0,73	0,70

CDM: contagem direta por microscopia de fluorescência; UFC: unidade formadora de colônias em agar MRS incubado por 48 horas; LDH: lactato desidrogenase ; PepX: X-prolil dipeptidil aminopeptidase.

A liberação das enzimas intracelulares LDH e PepX quando correlacionada com a viabilidade pelas duas técnicas demonstrou que os maiores coeficientes de correlação foram obtidos para a enzima LDH, sendo o máximo de 0,97 para a cultura E<sub>5</sub> empregando a contagem direta por microscopia.

De modo geral, as culturas comercial Cc<sub>1</sub> e autóctone E<sub>5</sub> foram as que apresentaram melhor desempenho autolítico, podendo ser empregadas na produção de queijo Parmesão e de outras variedades de queijo de massa dura.

### 5.3 Ensaio *in situ*

#### 5.3.1 Viabilidade de lactobacilos termófilos no queijo Parmesão maturado

Para todas as culturas testadas, houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade de lactobacilos termófilos em queijos Parmesão com o aumento do período de maturação (Figura 12).

As amostras elaboradas com as culturas A e D<sub>1</sub> nos períodos de 30, 60 e 90 dias apresentaram resultados médios semelhantes ( $p > 0,05$ ) de viabilidade de lactobacilos termófilos. Nos períodos subsequentes as amostras de queijos fabricados com as culturas Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), mas apresentaram menor população do que aquela encontrada quando foi utilizada a cultura A.

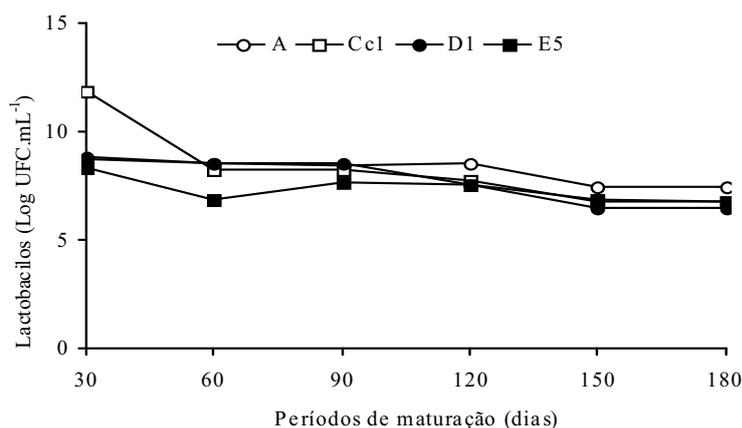


Figura 12. Viabilidade de lactobacilos termófilos em amostras de queijos Parmesão fabricados com as culturas A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>, maturados a 18 °C durante 180 dias.

Em 30 dias de maturação foram encontrados os maiores valores da população de lactobacilos termófilos com valores médios de 8,60 Log UFC.g<sup>-1</sup>, 11,85 Log UFC.g<sup>-1</sup>, 8,78 Log UFC.g<sup>-1</sup> e 8,32 Log UFC.g<sup>-1</sup> para os queijos fabricados com as culturas A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>, respectivamente, com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )

Nos queijos fabricados com a cultura E<sub>5</sub> o menor valor (6,84 Log UFC.g<sup>-1</sup>) foi encontrado aos 60 dias, seguido de um aumento aos 90 dias (7,58 Log UFC.g<sup>-1</sup>). Gatti et al. (2008) também observaram um decréscimo na população de lactobacilos termófilos após 60 dias de maturação (6,77 Log UFC.g<sup>-1</sup>) seguido de aumento aos 90 dias (7,29 Log UFC.g<sup>-1</sup>), e após este período de maturação houve decréscimo para 2,30 Log UFC.g<sup>-1</sup> aos

24 meses. Possivelmente esta oscilação esteja associada à liberação de aminoácidos ou peptídios pela ação das enzimas proteolíticas e peptidolíticas do leite e/ou do coalho e das bactérias lácticas não *starters*, favorecendo o desenvolvimento do microrganismo durante a estocagem.

Os menores valores encontrados aos 180 dias de maturação foram de 7,42 Log UFC.g<sup>-1</sup> para o queijo fabricado com a cultura ácido-láctica A, 6,73 Log UFC.g<sup>-1</sup> para Cc<sub>1</sub>, 6,40 Log UFC.g<sup>-1</sup> para D<sub>1</sub> e 6,75 Log UFC.g<sup>-1</sup> para E<sub>5</sub> (p<0,05). Estudo realizado por Coppola et al. (2000) detectou em queijo Reggiano Argentino um decréscimo nas contagens de lactobacilos de 6,88 Log UFC.g<sup>-1</sup> para 6,44 Log UFC.g<sup>-1</sup> entre 30 dias e 150 dias de estocagem. Candiotti et al. (2002) verificaram contagens médias iguais a 10<sup>8</sup> e 10<sup>6</sup> células viáveis em queijo Reggiano Argentino maturado por 30 e 180 dias, respectivamente.

Durante o período de estocagem de queijo Parmesão comercial, Barros et al. (2008b) verificaram um decréscimo da população de lactobacilos termófilos entre 90 dias e 180 dias, com valores de aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup> e 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os microrganismos da espécie *Lb. helveticus* desenvolvem-se melhor em valores de pH 5,5 a 6,5 (SALAÜN; MIETTON; GAUCHERON, 2005), no entanto, eles são hábeis em induzir o abaixamento do pH intracelular mantendo equivalência com o baixo pH do meio extracelular (VOROB'EVA, 2004), impedindo o choque osmótico, que provavelmente não tenha ocorrido nos estágios finais de maturação. Outro fator que possivelmente tenha contribuído para manter a homeostasia das bactérias ácido-láticas foi o efeito tamponante proveniente da ação das peptidases, com conseqüente liberação de aminoácidos hidrofóbicos, favorecendo o caráter auxotrófico dos lactobacilos (McSWEENEY, 2004), os quais podem ter assimilado os aminoácidos livres como fontes energéticas adicionais (LEROY; VUYST, 2004; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

### **5.3.2 Caracterização físico-química das amostras de queijo Parmesão fabricado com *Lactobacillus helveticus***

Os valores médios encontrados para Aw em todas as amostras de queijo investigadas foram superiores aos obtidos por Coppola et al. (2000) em Parmigiano-Reggiano, os quais observaram valores médios de 0,950 aos 150 dias de maturação. Neste

estudo, a maior Aw pode ser justificada pela embalagem das amostras de queijo, após a secagem por 2 dias, a fim de evitar trincas na superfície dos queijos (Tabela 2).

O teor de gordura no extrato seco (GES) variou de  $43,6 \pm 0,4$  % a  $51,2 \pm 0,1$  %, decorrentes do emprego de leite integral nos diferentes dias dos processamentos experimentais, sendo superiores aos observados em amostras comerciais de queijo Parmesão ( $41,3 \pm 0,4$  %) avaliadas por Barros et al. (2008). O leite utilizado para a fabricação dos queijos possuía aproximadamente 3,7 % de gordura, enquanto as amostras comerciais foram produzidas com leite padronizado com 2,5 % de gordura.

As amostras experimentais podem ser classificadas em queijos semi-gordo, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (BRASIL, 1996). Candiotti et al. (2002) observaram em 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. Em estudos realizados com queijos maturados sem embalagens, foi observado que o teor de lipídeos alterava durante a maturação, devido à perda de umidade. Malacarne et al. (2006) verificaram em queijo Parmigiano-Reggiano isento de embalagens e maturados durante 96 meses, a variação do teor lipídico de 27,45 % para 32,47 %.

Tabela 2. Caracterização físico-química das amostras de queijo Parmesão fabricados com culturas de *Lb. helveticus* A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>, maturados a 18 °C aos 180 dias.

Análises	A	Cc <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	E <sub>5</sub>
Aw	$0,979 \pm 0,01^a$	$0,978 \pm 0,01^a$	$0,978 \pm 0,01^a$	$0,979 \pm 0,01^a$
Cinzas/ST (%)	$6,02 \pm 0,10^d$	$6,40 \pm 0,61^b$	$6,45 \pm 0,43^a$	$6,38 \pm 0,29^c$
Gordura/ST (%)	$51,2 \pm 0,1^a$	$45,2 \pm 0,1^c$	$43,6 \pm 0,4^d$	$50,8 \pm 0,4^b$
Proteína total/ST (%)	$42,34 \pm 0,70^d$	$44,95 \pm 0,08^b$	$45,61 \pm 1,17^a$	$43,67 \pm 0,86^c$
Sal (%)	$1,68 \pm 0,03^a$	$1,48 \pm 0,07^b$	$1,14 \pm 0,15^d$	$1,26 \pm 0,19^c$
Umidade (%)	$32,35 \pm 0,35^c$	$34,96 \pm 0,70^b$	$35,25 \pm 0,09^a$	$35,71 \pm 0,57^a$

<sup>a</sup>Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

<sup>a, b, c, d</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

AW: atividade de água; ST: sólidos totais

O maior teor médio de proteína no extrato seco aos 180 dias de maturação foi observado para as amostras de queijos fabricados com a cultura D<sub>1</sub> ( $45,61 \pm 1,17$  %) e menor para àqueles fabricados com a cultura A ( $42,34 \pm 1,17$  %). Malacarne et al. (2006) observaram que após 96 meses de maturação o teor médio protéico encontrado em queijos

Parmigiano-Reggiano foi igual 54,63 %, superior aos detectados nas amostras experimentais.

### 5.3.3 Evolução dos teores de acidez, tirosina, triptofano e índice de maturação

Houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) do teor de acidez na matriz do queijo durante os 180 dias de maturação. Até 120 dias de estocagem, as amostras de queijo fabricadas com a cultura autóctone A e comercial Cc<sub>1</sub> apresentaram acidez semelhante ( $p > 0,05$ ) (Figura 13). Durante os dois primeiros meses, os maiores teores de acidez foram observados nos queijos fabricados com a cultura A, o que possivelmente, contribuiu para a maior friabilidade observada nestes queijos, uma vez que quanto mais ácido o queijo mais friável ele se apresenta (FURTADO, 2005). As culturas A e D<sub>1</sub> aos 120 dias não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) nos teores de acidez sendo que a segunda apresentou resultado semelhante estatisticamente ( $p > 0,05$ ) à cultura E<sub>5</sub> no período de 150 dias. Os resultados médios de todos os tratamentos não demonstraram diferença estatística significativa aos 180 dias de maturação ( $p > 0,05$ ).

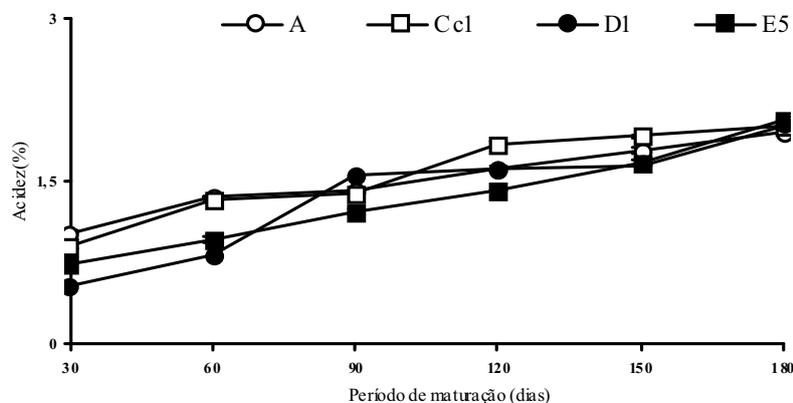


Figura 13. Evolução da acidez titulável nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.

A evolução da acidez observada nos queijos fabricados com a cultura E<sub>5</sub> demonstrou um comportamento linear durante os períodos estudados, sendo o maior valor ( $2,06 \pm 0,01$  %) observado aos 6 meses de estocagem. Este comportamento pode ser comparado àquele obtido por Barros (2005) em estudo *in vitro* realizado com a cultura E<sub>5</sub>, sugerindo a aplicação desta cultura como alternativa para acelerar o processo de maturação do queijo Parmesão, uma vez que contribui para a padronização desta variedade.

A cultura D<sub>1</sub>, 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 cura, tal como o queijo Montanhês.

Em amostras comerciais de queijo Parmesão foram registradas oscilações nos teores de acidez durante a maturação (BARROS et al., 2008b), com menores teores médios ( $1,77 \pm 0,01$  %) que os encontrados neste estudo aos 180 dias de estocagem. Os processos fermentativos e a liberação de peptídeos e aminoácidos com grupos ionizados livres, comumente observados durante a proteólise de queijos maturados, são responsáveis pelas oscilações nos teores de acidez (McSWEENEY, 2004; SALÄUN; MIETTON; GAUCHERON, 2005).

A liberação dos aminoácidos tirosina e triptofano em todas as amostras de queijos foi efetiva, com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) durante a estocagem (Figuras 14 e 15). As amostras de queijos fabricados com as culturas D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> não apresentaram diferença estatística significativa nos teores de tirosina aos 30 dias de maturação e as culturas A e Cc<sub>1</sub> apresentaram teores de aminoácidos semelhantes ( $p > 0,05$ ) após 120, 150 e 180 dias de maturação.

Os teores médios de triptofano não foram estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ) no período de 30 dias para as culturas A, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>. Aos 60 dias, estas culturas apresentaram teores médios de aminoácidos semelhantes àqueles encontrados no queijo fabricado com a cultura comercial. Aos 150 dias de maturação, os teores médios de triptofano não diferiram estatisticamente entre os quatro tratamentos ( $p > 0,05$ ). No período de 180 dias as três culturas autóctones obtiveram resultados médios semelhantes ( $p > 0,05$ ).

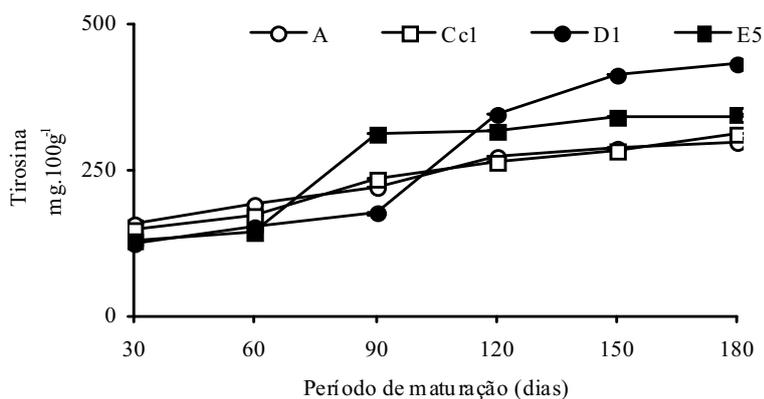


Figura 14. Evolução do teor de tirosina nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.

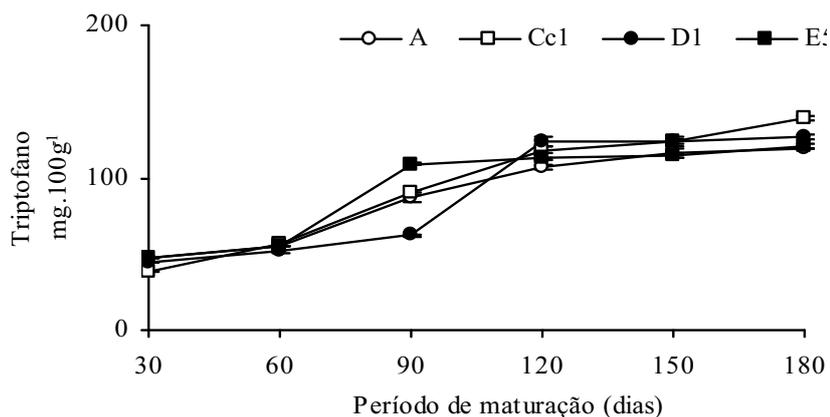


Figura 15. Evolução do teor de triptofano nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.

As culturas autóctones D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> foram aquelas que apresentaram maiores aumentos nos teores dos aminoácidos durante o tempo de maturação estudado. A concentração de tirosina nas amostras do queijo D<sub>1</sub> variou de 122,53±1,98 mg.100g<sup>-1</sup> para 429,27±0,50 mg.100g<sup>-1</sup> no final da maturação e para o aminoácido triptofano os valores oscilaram entre 44,55±0,25 mg.100g<sup>-1</sup> e 127,03±0,50 mg.100g<sup>-1</sup>. Para as amostras de queijo fabricado com a cultura E<sub>5</sub> foi observado 126,05±0,12 mg.100g<sup>-1</sup> de tirosina aos 30 dias de estocagem e 342,02±1,11 mg.100g<sup>-1</sup> aos 180 dias de maturação. Para esta mesma cultura foram encontrados os valores médios iguais a 47,52±0,04 mg.100g<sup>-1</sup> e 120,23±1,24mg.100g<sup>-1</sup> de triptofano, aos 30 e 180 dias de maturação, respectivamente.

Os teores médios de tirosina aos 180 dias de maturação foram de 297,24±0,25 mg.100g<sup>-1</sup> para a amostra do queijo fabricado com a cultura A e 310,44±0,53 mg.100g<sup>-1</sup> o queijo produzido com a cultura Cc<sub>1</sub> e os teores de triptofano foram de 119,08±0,29 mg.100g<sup>-1</sup> para a amostra do queijo A e 138,80±0,46 mg.100g<sup>-1</sup> para a do queijo Cc<sub>1</sub>. Estes valores demonstram que a proteólise se processou de forma menos intensa nos queijos fabricados com a cultura autóctone A e a cultura comercial Cc<sub>1</sub> quando comparadas aos queijos fabricados com as culturas autóctones E<sub>5</sub> e D<sub>1</sub>, provavelmente pela menor efetividade do sistema proteolítico destes microrganismos.

Segundo Perotti et al. (2005), o teor do aminoácido triptofano normalmente apresenta a mesma tendência do índice de maturação (Figura 16).

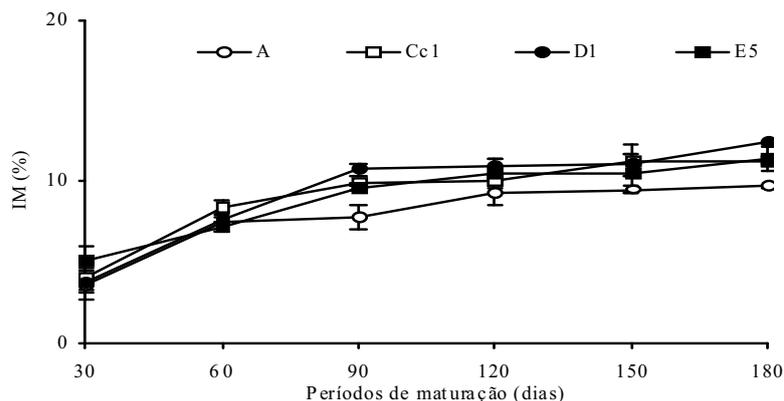


Figura 16. Evolução do índice de maturação nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.

Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos valores de IM para todas as amostras ao longo do período de maturação. Comparando os valores médios dos valores de IM entre as culturas utilizadas em cada período, houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). O menor IM foi igual a  $3,62 \pm 0,88$  % observado na amostra A aos 30 dias, e o maior valor na amostra D<sub>1</sub> ( $12,39 \pm 0,06$  %) após 180 dias de maturação. A quantidade de nitrogênio solúvel em TCA 12 % expressa pequenos peptídeos, aminoácidos livres e pequenos compostos nitrogenados sugerindo maior atividade peptidolítica das culturas empregadas na fabricação do queijo (PEREIRA et al., 2008), contribuindo diretamente nos atributos de aroma e sabor do produto final (FURTADO, 2005; PEREIRA et al., 2008). Este comportamento sugere a possível aplicação do cultivo D<sub>1</sub> para a obtenção da cultura lática a ser empregada na fabricação industrial de queijos Parmesão. A cultura E<sub>5</sub> apresentou comportamento similar à cultura comercial Cc<sub>1</sub>.

#### 5.4 Atividade das enzimas LDH e PepX no queijo Parmesão maturado

Os resultados médios obtidos da análise da lactato desidrogenase (LDH) e x-prolil-dipeptidil aminopeptidase (PepX) revelaram diferenças estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo do período de maturação para todos os tratamentos (Figuras 17 e 18).

Os resultados médios da atividade da LDH aos 60 dias de maturação para os queijos fabricados com as culturas Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ). Aos 90 dias, apenas as culturas Cc<sub>1</sub> e D<sub>1</sub> não apresentaram diferença estatística significativa. As culturas A e E<sub>5</sub> aos 120 dias apresentaram resultados semelhantes ( $p > 0,05$ ). No período de 150 dias de maturação as culturas A e Cc<sub>1</sub> não

apresentaram diferença estatística significativa entre si, bem como as culturas D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>. Aos 180 dias somente as culturas A e E<sub>5</sub> apresentaram valores médios semelhantes ( $p>0,05$ ).

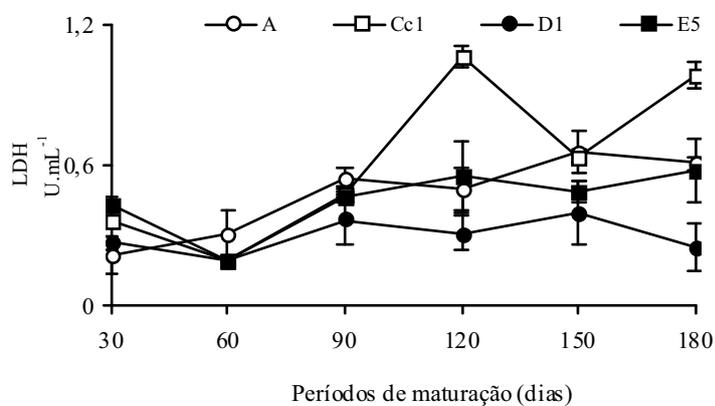


Figura 17. Atividade da enzima LDH nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.

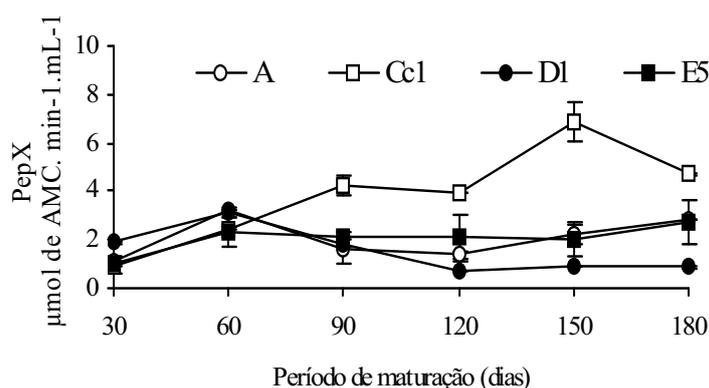


Figura 18. Atividade da enzima PepX nas amostras de queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 180 dias.

Não houve diferença estatística significativa na atividade da enzima PepX ( $p>0,05$ ) aos 30 dias de maturação entre as culturas A, Cc<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>. Aos 60 dias, os valores médios da atividade da PepX das culturas A e D<sub>1</sub> quando comparados entre si não foram estatisticamente diferentes ( $p>0,05$ ), bem como das culturas Cc<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>. Após 150 e 180 dias de maturação a atividade PepX encontrada para as amostras fabricadas com as culturas A e E<sub>5</sub> foram estatisticamente semelhantes ( $p>0,05$ ).

Nos processamentos em que foi empregada a cultura autolítica comercial Cc<sub>1</sub> foi registrado no queijo a máxima atividade das enzimas LDH ( $1,07\pm 0,75$  U.mL<sup>-1</sup>) aos 120 dias e PepX ( $6,87\pm 0,83$  μmol de AMC.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>) aos 150 dias. Dentre as autóctones, a cultura E<sub>5</sub> que *in vitro* demonstrou perfil autolítico elevado e a cultura A com perfil

autolítico intermediário, apresentaram maior atividade das duas enzimas intracelulares quando comparado com a cultura D<sub>1</sub>.

O queijo fabricado com a cultura A apresentou atividade progressiva de LDH até 3 meses, com valores médios de  $0,22 \pm 0,08 \text{ U.mL}^{-1}$ ,  $0,31 \pm 0,10 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $0,55 \pm 0,04 \text{ U.mL}^{-1}$  em 30, 60 e 90 dias, respectivamente, superiores aos valores observados nos queijos D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> (Figura 17). Para a mesma cultura a máxima atividade da PepX ( $3,19 \pm 0,01 \text{ } \mu\text{mol de AMC.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ) foi registrada aos 60 dias de maturação, no entanto ainda aos 180 dias foi detectada atividade de  $2,83 \pm 0,01 \text{ } \mu\text{mol de AMC.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ , superior ao valor encontrado no mesmo período para as culturas autóctones D<sub>1</sub> ( $0,89 \pm 0,04 \text{ } \mu\text{mol de AMC.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ) e E<sub>5</sub> ( $2,72 \pm 0,94 \text{ } \mu\text{mol de AMC.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ), porém inferior ao observado na cultura comercial.

Kenny et al. (2006) verificaram em queijo Cheddar maior atividade autolítica ( $1,14 \text{ U.mL}^{-1}$ ) para a cultura de *Lactobacillus helveticus* associada à cultura adjunta DPC 4571, que pode favorecer o sabor e aroma no queijo Cheddar durante a maturação. Lindner et al. (2008) estudando a atividade de aminopeptidases e correlacionando com a viabilidade de bactérias ácido-láticas durante a maturação de queijo Parmigiano Reggiano, verificaram um aumento gradativo da PepX concomitante com a redução da viabilidade das bactérias ácido-láticas. Os autores utilizaram como substrato gli-pro- $\beta$  nitroanilide (gli-pro- $\beta$ NA), sendo a atividade máxima observada aos 8 meses de maturação com valor aproximado de  $25 \text{ } \mu\text{mol de } \beta\text{NA.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ , após este período houve um decréscimo da atividade da enzima.

A correlação entre a viabilidade das bactérias lácticas em ágar MRS e a atividade de enzimas intracelulares permite prever o momento de lise. Todavia, o decréscimo da LDH aos 60 dias de maturação não foi usual, pois, neste estágio houve redução da população de bactérias ácido-láticas nas amostras dos queijos Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> (BARROS et al., 2008a), ou seja, com a morte celular haveria liberação do conteúdo celular e aumento da atividade enzimática. Barros et al. (2007) verificaram que em amostras comerciais de queijos Parmesão fabricados com *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus* maturados a  $12 \text{ }^\circ\text{C}$  por 180 dias, a máxima atividade da enzima LDH foi observada aos 90 dias de maturação com  $1,20 \text{ U.mL}^{-1}$  ( $8,17 \times 10^6 \text{ UFC.g}^{-1}$ ), sendo associada ao decréscimo da população de lactobacilos quando comparado àquela presente aos 60 dias ( $3,20 \times 10^7 \text{ UFC.g}^{-1}$ ).

Nas amostras experimentais de queijo Parmesão o decréscimo da atividade da LDH nos intervalos em que foram registradas reduções da população de lactobacilos termófilos pode ser consequência do estado viável não cultivável (VNC) apresentado por estas células. Estes, embora apresentem fragilidade osmótica, permanecem nos queijos devido às condições favoráveis neste ambiente, tal como o efeito tamponante (SALÄUN; MIETTON; GAUCHERON, 2005) e a interação desta microbiota aos substratos do queijo. Em alguns casos, as bactérias apresentam-se envolvidas por glóbulos de gordura, como observado por Barros et al. (2008b).

Em 3 meses de maturação, provavelmente pelo avanço da proteólise e conseqüente 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 acentuado da atividade da LDH para  $1,07 \pm 0,75 \text{ U.mL}^{-1}$  no queijo Cc<sub>1</sub> maturado por 120 dias e o progressivo aumento da atividade da PepX, que alcançou máxima atividade aos 150 dias de estocagem ( $6,87 \pm 0,83 \text{ } \mu\text{mol de AMC.min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Apesar da maior liberação das enzimas LDH e PepX pela cultura comercial Cc<sub>1</sub> na matriz do queijo durante os 180 dias de maturação, a cultura que apresentou maior índice de maturação foi a cultura D<sub>1</sub>, seguida da cultura E<sub>5</sub>.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos do monitoramento *in vitro* e *in situ* das enzimas intracelulares LDH e PepX permitiram incluir que:

- a maior liberação das enzimas LDH e PepX *in vitro* foi observada na cultura comercial Cc<sub>1</sub> e autóctone E<sub>5</sub>, as quais foram classificadas com elevada atividade autolítica, sugerindo sua utilização como aceleradores da maturação de queijo Parmesão e de outras variedades de massa dura;
- houve correlação entre as análises de CDM e cultivo em placa apenas para a cultura autóctone A e cultivo comercial Cc<sub>1</sub>;
- a maior população de lactobacilos termófilos nos queijos experimentais foi observada aos 30 dias de maturação;
- em todas as amostras de queijos foi observada atividade da LDH e PepX nos estágios finais de cura, sendo a maior atividade nos queijos fabricados com as culturas com caráter autolítico elevado;
- houve aumento significativo nos teores de acidez, tirosina e triptofano e IM em todas as amostras de queijo Parmesão ao longo de 180 dias de maturação;
- as culturas autóctones D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> foram aquelas que apresentaram maiores aumentos nos teores dos aminoácidos e do índice de maturação sugerindo o emprego destas na fabricação do queijo Parmesão.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AUTY, M. A. E.; GARDINER, G. E.; McBREARTY, S. J.; O'SULLIVAN, E. O.; MULVIHILL, D. M.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C.; ROSS, R. P. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 420-425, 2001.

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

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. 2008a.

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 (enviado)**, 2008b.

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

BORGIO, F.; RICCI, G.; MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G. Multilocus restriction typing: A tool for studying molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* of dairy origin. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 4, p. 336-342, 2007.

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.

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.

BROADBENT, J. R.; STEELE, J. L. Cheese flavor and the genomics of lactic bacteria. **American Society for Microbiology**, Washington, v.71, n. 3, p. 121-128, 2005.

BROOME, M. C; KRAUSE, D. A. HICKEY, M. W. The use of proteinase negative starter and lactobacillus in Cheddar cheese manufacture, **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 46, n. 1, p. 6-11, 1991.

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.

BUNTHOF, C. J.; ABEE, T. Development of 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.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 57, n. 4, p. 373-380, 2007.

CANDIOTI, M.C.; HYNES, E.; QUIBERONI, A.; PALMA, S.B.; SABBAG, N.; ZALAZAR, C.A. Reggianito 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.

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

CHRISTENSEN, J. E.; DUDLEY, E. G.; PEDERSON, J. A.; STEELE, J. L. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Chicago, v.76, n. 1/4, p.217-246, 1999.

CHRISTENSEN, J. E.; STEELE, J. L. Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 11, p. 3297–3306, 2003.

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.

COGAN, T. M.; ACCOLAS, J. P. **Dairy Starter Cultures**. New York: Wiley-VCH Publishers, 1996. 277p.

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.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R. Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, **Talanta**, London, v. 76, n. 1, p. 200-205, 2008.

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.

DEKLERK, D. P.; COFFEY, D. S. Quantitative determination of prostatic epithelial and stromal hyperplasia by a new technique biomorphometrics. **Investigative Urology**, Baltimore, v. 16, n. 3, p. 240-245, 1978.

DELLAGLIO F.; FELIS G. E. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In: **Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects**. Norfolk: Caister Academic Press, 2005. p. 50.

DI CAGNO, R.; BANKS, J.; SHEEHAN, L.; FOX, P. F.; BRECHANY, A. L. C.; GOBBETTI, M. Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewe's milk cheeses. **International Dairy Journal**, Barking, v. 89, n. 11, p. 961-972, 2006.

EL SODA, M.; LIM, L.; OLSON, N. Autolytic properties of several *Lactobacillus casei* strains. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 130-138, 1993.

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, p. 2173-2183, n. 10, 2000.

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

FOX, P. F.; LAW, J. Enzimology of cheese ripening. **Food Biotechnology**, New York, v. 5, n. 3, p. 239-262, 1991.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. 1. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

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.

GALLO, G.; DE ANGELIS, M.; MCSWEENEY, P. L. H.; CORBO, M. R.; GOBBETTI, M. Partial purification and characterization of an X-proly dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CBl. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 3 , p.535-544, 2005.

GARINE, L.; VERDUCI, E.; SCAGLIONI, S.; BERNASCONI, S. **Quaderni del Parmigiano Reggiano**, Reggio Emilia: Consorzio del Formaggio Parmigiano-Reggiano 2007. 73p

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. The Revised Road Map to the Manual. In: Brenner, Krieg, Staley and Garrity (ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed., vol. 2, The Proteobacteria, Part A, Introductory Essays. New York: Springer, 2005. p. 159–220.

GATTI, M.; LINDNER, J. D.; LORENTIIS, A.; BOTTARI, B.; SANTARELLI, M.; BERNINI, V.; NEVIANI, E. A model to assess lactic acid bacteria aminopeptidase activities in Parmigiano Reggiano cheese during ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 1-9, 2008a.

GATTI, M.; LINDNER, J. D.; LORENTIIS, A.; BOTTARI, B.; SANTARELLI, M.; BERNINI, V.; NEVIANI, E. Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano-Reggiano cheese production and ripening. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 19, p. 2934-2942, 2008b.

GATTI, M.; BERNINI, V.; LAZZI, C.; NEVIANI, E. Fluorescence microscopy for studying the viability of micro-organisms in natural whey starters. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 338-343, 2006.

GATTI, M.; ROSSETTI, L.; LAZZI, C.; GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. Heterogeneity of Putative Surface Layer Proteins in *Lactobacillus helveticus*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 7582-7588, 2005.

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.

GATTI, M.; CONTARIN, G. I.; NEVIANI, E. Effectiveness of Chemometric Techniques in Discrimination of *Lactobacillus helveticus* Biotypes from Natural Dairy Starter Cultures on the Basis of Phenotypic Characteristics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1450-1454, 1999.

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

GIRAFFA, G.; ROSSETTI, L.; NEVIANI, E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 175–184, 2000.

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**, Oxford, 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.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa Industrial**, Rio de Janeiro: IBGE, v. 25, n. 2, 2006, 188p.

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.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 209-224, 1983.

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.

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.

KIERNAN, R. C.; BERESFORD, T. P.; O'CUINN, G.; JORDAN, K. N. Autolysis of lactobacilli during Cheddar cheese ripening. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, Dublin, v. 39, n. 1, p. 95-16, 2000.

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.

LAW, B. A. **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 365p.

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.

LINDNER, J. D.; BERNINI, V.; LORENTIIS, A.; PECORARI, A.; NEVIANI, E. GATTI, M. Parmigiano Reggiano cheese: evolution of lactic microflora and peptidase activities during production and ripening, **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, Article in press, 2008.

LINDNER, J. D. **Tradicional and innovative approaches to evaluate microbial contribution in long ripened fermented foods: the case of Parmigiano Reggiano cheese**. Parma: USP, 2008. Ph. D. Dissertation, Università degli Studi di Parma, 2008.

LORTAL, S.; CHAPOT-CHARTIER, M. P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 1-15, 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 della Facoltà di Medicina Veterinaria**, Parma, v. 26, n.1, p. 145-164, 2006.

MAUKONEN, J.; ALAKOMI, H. L.; NOHYNEK, L.; HALLAMAA, K.; LEPPÄMÄKI, S.; MÄTTÖ, J.; SAARELA, M. Suitability of the fluorescent techniques for the enumeration of probiotic bacteria in commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products. **Food Research International**, Barking, v. 39, n. 1, p. 22-32, 2006.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, 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 Latte**, Les Ulis, v. 80, n. 3, p. 293–324, 2000.

MESA, M. M.; MACÍAS, M.; CANTERO, D.; BARJA, F. Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. **Journal of Fluorescence**, Maryland, v. 13, n. 3, p. 261-265, 2003.

MOLECULAR PROBES, LIVE/DEAD<sup>®</sup> *BacLight*<sup>™</sup> Bacterial Viability Kits, Product Information, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 839p.

NEVIANI, E.; DIVIZIA, R.; ABBIATI, E.; GATTI, M. Acidification Activity of Thermophilic Lactobacilli Under the Temperature Gradient of Grana Cheese Making. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 1, p.1 248-1252, 1995.

NIVEN, G. W.; MUHOLLAND, D. F. Cell membrane integrity and lysis in *Lactococcus lactis*: the detection of a population of permeable cells in post-logarithmic phase cultures. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 1, p. 90-96, 1998.

O'DONOVAN, C. M.; Wilkinson, M. G.; Guinea, T. P.; Fox, P. F. An investigation of the autolytic properties of three lactococcal strains during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 6, n.11-12, p. 114-116, 1996.

O'REILLY, C. E.; O'CONNOR, P. M.; MURPHY, P. M.; KELLY, A. L.; BERESFORD, T. Effects of high-pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria and proteolysis in Cheddar cheese **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 915-922, 2002.

PAN, D.; TANOKURA, M. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* JCM 1004. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 4, p. 511–516, 2004.

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**, London, v. 108, n. 3, p. 862–868, 2008.

PEROTTI, M. C., BERNAL, S. M., MEINARD, C. A., ZALAZAR. Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 15, n. 11, p. 1150-1155, 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**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 45-51, 2004.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, 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**, Oxford, v. 12, n. 2-3, p. 133-140, 2002.

PIMENTEL, E. F.; DIAS, R. S.; RIBEIRO-CUNHA, M.; GLÓRIA, M. B. A. Avaliação da rotulagem e da qualidade físico-química e microbiológica de queijo ralado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 289-294, 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.

REZENDE, D. C. **Estratégias de coordenação e qualidade na cadeia dos queijos finos**. 2004. 216p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Agricultura e Sociedade) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, 2004.

ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology Handbook**. 3. ed. New York: Wiley-Interscience, 2002. 765p.

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.

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

SALOFF-COSTE, C. J. Health benefits of lactic acid bacteria. **Danone World Newsletter**, local, v. 15, n .6, p. 1-8, 1994.

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

SALVADOR, M.; CAMASSOLA, M.; MOSCHEN, E. S.; ZANROSSO, A. V. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo prato e parmesão ralado. **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 66-74, 2001.

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

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.

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.

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.

SOUSA, M.; J.; ARDO, Y.; McSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4, p. 327-345, 2001.

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.

VASCONCELOS, M. P.; ARAÚJO, K. G. L.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Efeito do pH de coagulação do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 4, p. 499-502, 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.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; WOUTERS, J. T. M. **Dairy Science and Technology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2005. 824p.

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