

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Efeito da autólise de culturas lácticas na proteólise do queijo Prato

Izildinha Moreno

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Maria Teresa Destro

São Paulo
2003

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005415

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Moreno, Izildinha
M843e Efeito da autólise de culturas lácticas na proteólise do
queijo prato / Izildinha Moreno. -- São Paulo, 2003.
180p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos
e Nutrição Experimental.

Orientador: Destro, Maria Teresa

1. Ciência dos alimentos 2. Microbiologia de alimentos
3. Cultura láctica : Queijo : Laticínios I. T. II. Destro,
Maria Teresa, orientador.

641 CDD

Izildinha Moreno

Efeito da autólise de culturas lácticas na proteólise do queijo Prato

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Bernadette Dora G. Melo Franco
presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico

Aos meus pais Angelin e Branca e
demais familiares

Ofereço

Ao meu companheiro Walmor

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria Teresa Destro pela orientação, amizade e confiança na realização desta pesquisa;

Ao Dr. Aírton Vialta, diretor do Centro de Tecnologia de Laticínios ITAL durante a realização desta pesquisa, pelo apoio e amizade;

Aos pesquisadores do Instituto de Tecnologia de Alimentos ITAL pelo auxílio técnico, especialmente, Ariene G. F. Van Dender, Emília E. M. Mori, José L. E. do Valle, Katumi Yotsuyanagi, Valéria D. de Almeida Anjos e Vera L. S. Baldini.

À Ana Maria Rauen do Centro de Química e Nutrição Aplicada e Margarida Kikuta Barbieri do Laboratório de Análise Sensorial do ITAL, pelo apoio e carinho;

Aos diretores do Laboratoire de Recherches de Technologie Laitières, INRA, Dr. Jean Louis-Maubois e Dra. Sylvie Lortal, pela acolhida em seu laboratório, orientação e amizade;

Ao pessoal do Laboratoire de Recherches de Technologie Laitières, INRA, pelo auxílio técnico e acolhida, especialmente Marie-No Madec, Stéphane Guenezec e Marie-B. Maillard.

Aos meus colegas, funcionários do Centro de Tecnologia de Laticínios do ITAL, Alda, Fabiana, Juliana, Maria José, Raimundo e Rose pelo apoio, e amizade;

Às minhas amigas Adriana T. Silva, Vera L. S. Baldini e Shirley Berbari, que sempre pude contar com o apoio e compreensão em todos os momentos difíceis;

À todos os estagiários que passaram e os que ainda se encontram no Centro de Tecnologia de Laticínios ITAL durante a realização desta pesquisa, especialmente, Fernanda, Gisele e Vânia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro no desenvolvimento experimental desta pesquisa;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela bolsa de estudos;

À Banca Examinadora pelo convite aceito na participação da mesma, e pelo tempo dedicado na avaliação desta pesquisa;

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização desta tese;

meu muito obrigada.

"Eu sustento que a única finalidade da ciência reside em aliviar a miséria da existência humana. E, se os cientistas intimidados pela prepotência dos poderosos acham que basta amontoar sabedoria, pelo amor da sabedoria, a ciência pode ser transformada num aleijão, e as vossas máquinas serão novas aflições, nada mais."

A vida de Galileu, B. Brecht

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE QUADROS	iv
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Queijo Prato.....	7
1.2 Microbiota envolvida no processamento do queijo.....	9
1.2.1 Fermentos lácticos.....	12
1.2.2 "Non starter lactic acid bactéria" (NSLAB).....	14
1.3 Contribuição da microbiota láctica no processamento de queijos.....	18
1.3.1 Acidificação.....	19
1.3.2 Fermentação do citrato.....	21
1.3.3 Lipólise.....	22
1.3.4 Proteólise.....	23
1.3.5 Formação de "flavour".....	25
1.4 Autólise de bactérias lácticas.....	27
1.4.1 Avaliação da autólise por diferentes métodos.....	30
1.4.1.1 Decréscimo da população durante a multiplicação celular.....	31
1.4.1.2 Atividade de componentes intracelulares.....	32
1.4.1.3 Observações microscópicas.....	34
1.4.1.4 Formação de halos de lise em ágar.....	35
1.4.1.5 Zimogramas	35
1.4.1.6 Detecção imunológica de marcadores da lise por "Immunoblotting" ..	37
1.4.2 Fatores que influenciam a autólise.....	39
1.4.3 Efeito da autólise na proteólise de queijos.....	42
1.4.4 Controle da atividade das autolisinas.....	45
2 OBJETIVOS.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 Material.....	48

3.2 Métodos.....	48
3.2.1 Procedimentos de maturação e de amostragem.....	48
3.2.2 Evolução quantitativa da microbiota durante a maturação.....	48
3.2.3 Determinação dos gêneros envolvidos na maturação dos queijos.....	49
3.2.3.1 Isolamento e manutenção das culturas.....	49
3.2.3.2 Caracterização morfológica e produção de catalase.....	50
3.2.3.3 Determinações das características fenotípicas.....	50
3.2.4 Determinação da lise celular durante a maturação.....	53
3.2.4.1 Obtenção do extrato aquoso do queijo.....	53
3.2.4.2 Determinação da atividade de aminopeptidases.....	53
3.2.4.3 Detecção da atividade de autolisinas por zimogramas.....	54
3.2.4.4 Detecção de marcadores de lise por "Immunoblotting".....	55
3.2.5 Determinação das propriedades físico-químicas dos queijos.....	57
3.2.6. Evolução da proteólise durante a maturação.....	58
3.2.6.1 Determinação dos índices de maturação.....	58
3.2.6.2 Determinação do teor de tirosina.....	59
3.2.7 Avaliação da hidrólise das caseínas por eletroforese de proteínas em gel de policrilamida URÉIA-PAGE.....	60
3.2.8 Determinação do teor de aminoácidos livres.....	60
3.2.9 Determinação de compostos voláteis neutros de aroma ("headspace-GC-MS").....	61
3.2.10 Determinação instrumental de textura.....	61
3.2.11 Análise sensorial.....	62
3.2.12 Análise estatística dos resultados.....	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1 Evolução da microbiota durante a maturação dos queijos.....	66
4.1.1 Gêneros envolvidos na maturação dos queijos.....	78
4.2 Determinação da autólise da microbiota durante a maturação.....	84
4.2.1 Atividade de aminopeptidases e dipeptidil-aminopeptidases.....	84
4.2.2 Detecção de autolisinas livres por zimogramas.....	91
4.2.3 Detecção imunológica de marcadores de lise por "Immunoblotting".....	94
4.3 Características físico-químicas dos queijos.....	100

4.4 Evolução da proteólise durante a maturação.....	106
4.4.1 Índices da maturação.....	107
4.4.2 Teor de tirosina.....	109
4.5 Avaliação da hidrólise das caseínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE).....	113
4.6 Quantificação de aminoácidos livres.....	117
4.7 Determinação de compostos voláteis de aroma.....	123
4.8 Perfil de textura dos queijos maturados.....	127
4.9 Análise sensorial dos queijos maturados.....	133
5 CONCLUSÕES.....	140
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142

LISTA DE FIGURAS

1	Fluxograma de processamento de queijo Prato.....	11
2	Principais vias bioquímicas da maturação: proteólise, lipólise, metabolismo da lactose e do citrato.....	20
3	Principais vias do catabolismo de aminoácidos.....	28
4	Estrutura do peptideoglicano de <i>Lac. lactis</i> sp. e os sítios ativos de clivagem das autolisinas.....	30
5	Montagem do sistema de "Western-Blotting" para a transferência de Proteína para as membranas de nitrocelulose.....	56
6	Ilustração esquemática da reação imunológica para a visualização de proteínas específicas.....	57
7	Corte das fatias (A) e dos cilindros externos e internos (B) nos queijos A, B, C e D.....	64
8	Modelo da ficha de avaliação da análise sensorial de queijo Prato.....	65
9	Perfil microbiológico dos queijos A, B, C e D no início da estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	69
10	Evolução da população de lactococos nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	71
11	Evolução da população de leuconostoc nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	71
12	Evolução da população de enterococos nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	72
13	Evolução da população de estreptococos nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	72
14	Evolução da população de lactobacilos mesofílicos nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	73
15	Evolução da população de lactobacilos termofílicos nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	73
16	Evolução da população de fermentadores de citrato nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	74
17	Evolução da população de fermentadores de lactato nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	73
18	Perfil microbiológico dos queijos no final da estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	77

19	Distribuição das culturas lácticas isoladas dos queijos A, B, C e D durante a estocagem a 12±2°C.....	80
20	Variação da atividade específica de aminopeptidases (AP) e dipeptidil aminopeptidases (DA) nos queijos A e B durante a estocagem a 12±2°C.....	87
21	Variação da atividade específica de aminopeptidases (AP) e dipeptidil aminopeptidases (DAP) nos queijos C e D durante a estocagem a 12±2°C.....	88
22	Perfil de aminopeptidases e dipeptidil aminopeptidases do queijo Prato A, B, C e D durante a estocagem a 12±2°C.....	90
23	Perfil de autolisinas a pH 7,4 e 44°C nos queijos C e D	92
24	Perfil de autolisinas a pH 6,8 e 42 °C nos queijos C e D.....	93
25	Intensidade de autólise de <i>Lac. lactis</i> sp. nos queijos A, B, C e D durante estocagem a 12±2°C.....	96
26	Intensidade de autólise de <i>Lb. helveticus</i> nos queijos A, B, C e D durante estocagem a 12±2°C.....	98
27	Evolução dos índices de extensão e de profundidade e teor de tirosina nos A, B, C e D durante a estocagem a 12±2°C.....	110
28	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) dos queijos B e A durante a estocagem a 12±2°C.....	115
29	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) dos queijos D e C durante a estocagem a 12±2°C	116
30	Teor de aminoácidos totais nos queijos A, B, C e D durante a estocagem a 12±2°C.....	118
31	Perfil de aminoácidos livres individuais nos queijos A, B, C e D após 45 dias de maturação a 12±2°C.....	120
32	Compostos voláteis identificados nos queijos A, B, C e D com 45 dias de estocagem a 12±2°C.....	129
33	Atributos de firmeza, adesividade, elasticidade e coesividade nos queijos A, B, C e D com 45 dias de estocagem a 12 ±2°C.....	132
34	Análise de componentes principais dos atributos de aparência, textura, aroma e sabor dos queijos.....	137

LISTA DE TABELAS

1	Evolução da microbiota láctica nos queijos A, B, C e D durante Estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	67
2	Caracterização morfológica das culturas isoladas a partir dos queijos A, B, C, D durante a estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	79
3	Atividade de aminopeptidases nos queijos A, B, C e D durante a estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	86
4	Valores médios de pH e atividade de água (Aa) dos queijos A, B, C e D durante o período de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	102
5	Valores médios das análises de composição química dos queijos A, B, C e D durante o período de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	105
6	Valores médios das análises de nitrogênio total (NT), NS-pH 4,6 e NNP dos queijos A, B, C e D durante a estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	111
7	Composição de aminoácidos livres individuais nos queijos A, B, C e D durante o período de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	122
8	Compostos voláteis identificados nos queijos A, B, C e D com 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	128
9	Parâmetros de textura dos queijos Prato A, B, C e D com 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	130
10	Valores médios para os atributos sensoriais dos queijos A, B, C e D com 45 dias de maturação a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$	135

LISTA DE QUADROS

1	Tipos e composição dos fermentos lácticos mesofílicos e termofílicos e os produtos a que se destinam.....	13
2	Meios e condições de cultivos utilizados para isolamento de bactérias lácticas.....	50
3	Substratos cromogênicos utilizados para avaliação da atividade de aminopeptidases.....	54

RESUMO

Nesta pesquisa, estudaram-se as variações ocorridas na relação entre autólise de culturas lácticas e o desenvolvimento da proteólise de queijo Prato produzido em quatro regiões brasileiras: Santa Catarina (Queijo A), Goiás (Queijo B), São Paulo (Queijo C) e Minas Gerais (Queijo D). A análise quantitativa da população de bactérias lácticas durante a maturação mostrou perfis microbiológicos similares para todas as amostras de queijos examinadas. Após 5 dias de maturação, lactococos e estreptococos estavam presentes em números mais elevados do que lactobacilos mesofílicos e termofílicos, leuconostoc e fermentadores de lactato. Contudo, essas populações aumentaram consideravelmente no final do processo de maturação. Enterococos e fermentadores de citrato permaneceram em números relativamente reduzidos ao longo da maturação. A análise qualitativa mostrou a predominância de "non starter lactic acid bacteria" (NSLAB) nos queijos das quatro origens, principalmente de *Lactobacillus* sp. Outros gêneros foram identificados em menor proporção: *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Aerococcus* sp., *Tetragenococcus* sp. e *Streptococcus* sp. O queijo C diferiu dos demais por não apresentar *Pediococcus* sp. e *Streptococcus* sp. As culturas lácticas adicionadas *Lactococcus lactis* sp. e *Leuconostoc* sp. estavam presentes em populações menores. A autólise foi estudada pela determinação da atividade de aminopeptidases e detecção de autolisinas por zimogramas e de enzimas intracelulares por "imunoblotting". Uma maior liberação de aminopeptidases ocorreu no queijo D, seguido dos queijos C, B e A. Não foram detectadas bandas de atividade lítica nos zimogramas dos queijos A e B em todas as condições avaliadas. Nos zimogramas, detectou-se uma banda de 30 KDa nos queijos C e D a pH 7,4 e 44°C, e uma outra de 40 KDa, exclusiva no queijo D, ambas de fraca intensidade. A pH 6,8 e 42°C, detectou-se bandas de 40KDa de fraca intensidade no queijo C e forte no D, além de mais duas de fraca intensidade de 90KDa e 110KDa no queijo D. Na análise em "imunoblotting" com o antisoro anti-Lc, foi observado apenas sinais fracos de reação positiva e em números inferiores àsquelas reveladas com o citoplasma bruto de *Lac. lactis* subsp. *lactis* (controle positivo), indicando que a autólise foi praticamente inexistente. Com o antisoro anti-D-LDH, também não se detectou sinais de reação positiva nos queijos A e B, enquanto nos queijos C e D, verificou-se sinais positivos de 37KDa, de forte intensidade e correspondentes à proteína D-LDH, indicando a lise de *Lab. helveticus*. A evolução da proteólise foi determinada quantitativamente durante a maturação e avaliada com base nos índices: NS-pH4,6/NT% e NNP/NT%, teor de tirosina, eletroforese (Uréia-PAGE) e quantificação de aminoácidos individuais livres. Não foram detectadas diferenças

significativas entre os queijos A, B, C e D no início da maturação. Contudo, com a fragmentação das proteínas, ocorreu um aumento gradual desses índices, tendo-se observado valores mais elevados no queijo D, seguido dos queijos C, B e A. Os perfis eletroforéticos de proteínas foram similares para os queijos das quatro origens e mostraram claramente que o coagulante e a plasmina foram os responsáveis pela degradação inicial das caseínas. A taxa de degradação da α_{s1} - e β -caseína apresentou a seguinte ordem: $D > C \geq B > A$. O acúmulo de aminoácidos livres também foi mais rápido no queijo D, seguido dos queijos C, B e A. Portanto, a autólise de *Lab. helveticus* no queijo D acelerou a proteólise, diminuindo o período de maturação em 45% e não afetando negativamente o desenvolvimento de "flavour" e nem a textura. No final da maturação (45 dias), os compostos voláteis foram determinados por meio de cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-MS). Com raras exceções, os queijos das quatro origens continham os mesmos compostos voláteis, embora em quantidades distintas. Os álcoois e ésters foram os compostos majoritários nos queijos A e B e benzaldeído, 3-metil-butanal-2 e hexanal nos C e D. O perfil de textura instrumental (TPA) e a análise sensorial descritiva e quantitativa foram realizados. Os queijos B, C e D apresentaram características mais típicas de queijo Prato, independentemente do fato de que o aroma de manteiga e o sabor doce serem mais acentuados no queijo D. O queijo A foi classificado como tendo as menores características de queijo Prato e apresentou maior nível de defeitos de "flavour", principalmente residual e amargor. Os queijos avaliados não apresentaram diferenças significativas quanto à elasticidade e coesividade. Pequenas alterações na composição físico-química dos queijos, principalmente os teores de umidade e de caseína, influenciaram nos parâmetros como a firmeza e a adesividade. O presente estudo demonstrou pela primeira vez a ausência de autólise de *Lc. lactis* sp. em queijo Prato de quatro origens, bem como a ocorrência de autólise de *Lab. helveticus* nos queijos de duas origens, C e D. A pronunciada autólise dessa espécie teve um impacto positivo na proteólise e foi a responsável pelo aumento da concentração de aminoácidos livres nesses queijos. As diferenças na evolução da proteólise observada entre os queijos C e D, com taxas mais baixas no queijo C, independentemente da autólise pronunciada de *Lab. helveticus*, foram atribuídas à falta de uniformidade na composição físico-química dos queijos, principalmente pH e os teores de sal na umidade (S/U).

SUMMARY

This paper reports a study aimed at evaluating the variations that occur in the interrelationship between autolysis of lactic starter bacteria and the development of proteolysis in Prato cheese produced in four different regions of Brazil: Santa Catarina (Cheese A), Goiás (Cheese B), São Paulo (Cheese C) and Minas Gerais (Cheese D). Quantitative analysis of microbial population yielded similar microbiological profiles for all the cheese samples investigated. After 5 days ripening, lactococci and streptococci were present in higher numbers than mesophilic and thermophilic lactobacilli, leuconostoc and lactate fermenting bacteria. However, the populations of the latter species had considerably increased by the time the ripening process completed 45 days. Enterococci and citrate fermenting bacteria remained present in relatively low numbers throughout ripening. The findings from qualitative analysis confirmed the predominance of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) in the cheeses from four different origins, especially *Lactobacillus* sp. Other genera of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) were identified in smaller proportions: *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Aerococcus* sp., *Tetragenococcus* sp. and *Streptococcus* sp. Cheese C differed from the cheeses in that it no evidence was found of the presence of *Pediococcus* sp. and *Streptococcus* sp. The bacteria of the lactic starter culture *Lactococcus lactis* sp. and *Leuconostoc* sp. were also found to be present, although in lower numbers. Autolysis was studied by: (1) determination of aminopeptidase activity; (2) detection of autolysins by zymograms and (3) detection of intracellular enzymes by immunoblotting. The release of aminopeptidase was highest in cheese D, followed by C, B and A. No bands of lytic activity were appeared in the zymograms of Cheeses A and B in all conditions evaluated. At pH 7,4 and 44 °C, a low-intensity band of 30 KDa was found in cheeses C e D, whereas another low-intensity band was observed only in cheese D. At pH 6,8 and 42 °C, bands of 40KDa were observed in cheese C (low intensity) and cheese D (high intensity), in addition to two more low-intensity bands of 90KDa and 110KDa in cheese D. Immunoblotting with antiserum anti-Lc produced only minor signs of positive reaction, evidenced by the formation of low-intensity bands of 100 Kda in cheeses A and B and two high-intensity bands of 75 Kda and 100 Kda in cheeses C and D. Since these were present in smaller numbers to those revealed with crude cytoplasm of *Lac. lactis* subsp. *lactis*, it was concluded that autolysis did practically non occur. Immunoblotting with antiserum anti-D-LDH also detected sings of positive reaction in cheeses A and B, whereas in cheeses C e D positive high-intensity signs of 37Kda were found relative to D-LDH protein, indicating lysis of *Lab. helveticus*. The evolution of proteolysis was determined quantitatively during the ripening process and evaluated on the basis of the

following parameters: NS-pH_{4,6}/NT% and NNP/NT% indexes, tyrosine content, electrophoresis (Urea-PAGE) and quantification of free amino acids. No significant differences were found between cheeses A, B, C and D in the early stages of ripening. However, with the on-going fragmentation of proteins during ripening, a gradual increase of the ripening indexes occurred, with the highest values being observed in cheese D, followed by C, B e A. The electrophoretic profiles were similar for the four cheeses investigated and clearly showed that the clotting agent or milk coagulant and plasmin were responsible for the initial breakdown of the caseins. The degradation rate of α_{s1} - and β -casein followed the following order: D > C \geq B > A. The buildup of free amino acids was also faster in cheese D, followed by cheeses C, B e A. At the end of the ripening process studied (45 days), the volatile compounds were identified using gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS), whereas the instrumental texture profile was measured and evaluated by Texture Profile Analysis (TPA). Cheese samples were evaluated by descriptive and quantitative sensory analysis. With rare exceptions, the cheeses of four different origins contained the same volatile compounds, although in different quantities. Alcohols and esters were the predominant volatile compounds in cheeses A and B and benzaldehyde, 3-methyl-butanal-2 and hexanal in cheeses C and D. Autolysis of *Lb. helveticus* accelerated proteolysis in cheese D, thereby reducing ripening time by 45% without any negative effect on either flavor or texture development. Cheeses B, C and D exhibited the most typical Prato cheese characteristics, in spite of the fact that the buttery aroma and sweet taste were more pronounced in cheese D. Cheese A was rated as the cheese with the less typical overall Prato cheese profile and was also the one that exhibited the highest degree and number of flavor defects, notably aftertaste and bitterness. The cheeses investigated did not present any significant differences as to elasticity and cohesiveness. Minor changes in the physical-chemical composition of the cheeses – mainly related to the moisture and casein levels – influenced parameters such as firmness and adhesiveness. The present study demonstrates for the very first time the absence of autolysis of *Lc. lactis* sp. in Prato cheese from four different origins, as well as the occurrence of autolysis of *Lb. helveticus* in two of the cheeses analyzed (cheeses C and D). The pronounced autolysis of this species had a positive impact on proteolysis and was responsible for the release of increased quantities of free amino acids in these cheeses. The differences in the evolution of proteolysis observed between cheeses C and D – lower rate of proteolysis in cheese C, in spite of pronounced autolysis of *Lb. helveticus* – were attributed to poor uniformity of the physical-chemical composition of this cheese, particularly as related to pH and the salt and moisture levels (S/M).

1 INTRODUÇÃO

1.1 QUEIJO PRATO

A fabricação industrial de queijos no Brasil é relativamente recente, remontando ao início do século passado e, sobretudo a partir da década de 20, com o estabelecimento de imigrantes dinamarqueses e holandeses na região sul de Minas Gerais, que por volta de 1930, introduziram o queijo Prato. Considera-se que este queijo seja uma adaptação dos clássicos de massa semicozida e lavada holandesa (Gouda e Edam) e dinamarquesa (Tybo e Dambo), não se conhecendo exatamente a origem da denominação "Prato". Como sua fabricação é bem diferente das dos tipos mencionados, o queijo Prato pode ser considerado como um tipo de queijo nacional, sendo um dos mais apreciados e o mais fabricado no Brasil (RIBEIRO, 1961).

Segundo FURTADO e LOURENÇO NETO (1994), a tecnologia de fabricação do queijo Prato foi adaptada às diferentes condições locais, o que explicaria em parte as diferenças de "flavour" (sabor e aroma) e textura observadas em relação aos queijos ascendentes. Enquanto seus precursores apresentam-se com textura mais aberta e com olhaduras regulares e pequenas, o Prato pode ser encontrado tanto com olhaduras regulares e irregulares, quanto completamente fechado, devido à tendência de comercialização de queijo fatiado, no qual a presença de olhaduras não é condição predominante. Uma etapa comum no processamento desses queijos relaciona-se com a retirada de parte do soro, que é substituído por água quente para aquecimento moderado da coalhada, efetuado com o propósito de controlar a acidificação, resultando em queijos de consistência macia e sabor suave (ACCOLAS et al., 1977).

Dentre os queijos produzidos e comercializados no Brasil, principalmente nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, o Prato atualmente disputa com a Mussarela o primeiro posto na produção total de queijos, o que evidencia sua importância sócio-econômica. De acordo com os dados estatísticos da ABIQ (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO, 2000), foram produzidas cerca de 88.500 toneladas deste tipo de queijo em 2000, o que representa um quarto da produção

nacional. Sob a denominação Prato encontram-se três variedades, cuja tecnologia difere uma da outra em pequenos detalhes, resultando em produtos muito semelhantes, que se diferenciam somente quanto ao formato e ao peso. O Lanche apresenta-se moldado na forma de um paralelepípedo e peso médio variando de 0,5 a 3 Kg, o Cobocó, na forma cilíndrica e peso médio de 1 Kg e o Esférico ou Bola, com peso de 1,8 Kg (ALBUQUERQUE, 1986). O queijo Prato é muito similar aos queijos Estepe e Gouda (ALVES, 1995).

Segundo o REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE QUEIJOS (BRASIL, 1999), o queijo Prato é classificado como um queijo gordo (45 a 59,9% de gordura no extrato seco) e de média umidade (36 a 46%), devendo apresentar-se com as seguintes características sensoriais: consistência semi-dura, elástica; textura compacta, lisa, fechada, com alguns olhos pequenos ovalados bem distribuídos e/ou algumas olhaduras mecânicas ou sem olhaduras; coloração amarelo ou amarelo-palha; sabor e odor característicos; sem crosta ou com crosta fina, lisa e sem trincas. OLIVEIRA (1986) o descreveu como um queijo de consistência e untura manteigosa, de sabor suave, não ácido e nem picante, tendendo ao adocicado e com olhaduras de 3mm de diâmetro, ovaladas e de fundo brilhante. SCHIFTANN e KOMATSU (1980) enfatizaram que as olhaduras devem ser regulares, pouco numerosas e bem formadas e a consistência, macia e compacta. FURTADO e WOLFSCHOON-POMBO (1979) complementaram que a fatiabilidade deve ser uma de suas principais características e que o rendimento médio de sua produção gira em torno de 9,0 a 9,5 litros de leite por quilo de queijo.

Ainda, segundo o REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE QUEIJOS (BRASIL, 1999), o Prato é o produto obtido por coagulação enzimática do leite de vaca pasteurizado, pela ação do coalho de origem bovina, composto de quimosina e pepsina, adicionado de fermento láctico, cloreto de cálcio e urucum. Ingredientes adicionais podem ser, o leite em pó, o creme e os sólidos de origem láctea. O coágulo obtido é aquecido e lavado retirando-se parte do soro e adicionando-se de água a 74-80°C. Em seguida é realizada a dessoragem, a pré-prensagem, o corte em blocos, a moldagem em formas, a prensagem e subsequente salga. Os queijos são embalados à vácuo e estocados em câmaras a 12-14°C, onde permanecem por um período de tempo para o desenvolvimento de suas características "flavour" e textura. De acordo com ROGICK (1951), o período

de maturação deveria ser de pelo menos 60 dias, enquanto a legislação brasileira preconizou 25 dias. Na prática, entretanto, esta etapa dura somente apenas algumas semanas, sendo o queijo Prato comercializado, na maioria das vezes, maturado incompletamente (BALDINI, 1998).

O fluxograma do processamento do queijo Prato variedade Lanche, conforme descrito por MARTINS et al., (1979), encontra-se sumarizado na Figura 1. Cada uma das etapas de fabricação foi bem detalhada por SILVA (1998).

Devido à importância econômica nacional, e, atualmente, para o MERCOSUL, muitas pesquisas foram realizadas com o queijo Prato, principalmente com relação à tecnologia de fabricação (FURTADO e WOLFSCHOON-POMBO, 1978; FURTADO et al., 1979; FURTADO e SOUZA, 1984), rendimento (FURTADO e WOLFSCHOON-POMBO, 1978, 1983), aceleração do processo de fabricação (VAN DENDER et al., 1986), maturação por adição de enzima proteolítica comercial (SILVA, 1998; MINUSSI et al., 1995) e cultura adjunta (MARTINS et al., 1979), avaliação da composição (HOSKEN e GAUDERETO, 1973; SCHIFTAN e KOMATSU, 1980), proteólise (WOLFSCHOON-POMBO, 1983; BALDINI, 1998), efeito do subcongelamento na microbiota (VALLE et al., 1991) e nas características físico-químicas (VALLE et al., 1979).

1.2 MICROBIOTA ENVOLVIDA NO PROCESSAMENTO DE QUEIJOS

É fato bem conhecido que a microbiota dos queijos é composta basicamente de bactérias lácticas (as do ácido láctico ou acidificantes do leite), um termo genérico utilizado para denominar um grupo de microrganismos bastante heterogêneo, que apresentam diferentes características morfológicas, metabólicas, fisiológicas e taxonômicas e cuja principal função metabólica é a de produzir ácido láctico a partir de carboidratos (AXELSSON, 1993; DELLAGLIO et al., 1994). São cocos e bastonetes Gram-positivos, imóveis, não esporulados, catalase negativa ou variável, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, ácido-tolerantes, não apresentam pigmentos e são muito exigentes do ponto de vista nutricional (AXELSSON, 1993; DELLAGLIO et al., 1994).

As bactérias lácticas são bastante difundidas na natureza e são capazes de se desenvolver em uma diversidade de ambientes, sendo encontradas mais freqüentemente em vegetais. Chegam ao leite por várias vias e assim passam a constituir sua microbiota natural. Devido à rápida adaptação fisiológica, as bactérias lácticas são capazes de colonizar meios diferentes do ponto de vista físico-químico e biológico. Em determinados ecossistemas, elas são dominantes enquanto, em outros, são minoritárias, mas capazes de exercer seus efeitos benéficos, ou, mais raramente, iniciar alterações biológicas indesejáveis (DELLAGLIO et al., 1994).

Esse grupo reúne atualmente espécies pertencentes aos seguintes gêneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus*. Embora os gêneros *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* e *Brevibacterium* filogeneticamente pertençam à subdivisão dos *Actinomycetes* das eurobactérias Gram-positivas, eles são associados ao grupo láctico devido às características metabólicas (DELLAGLIO et al., 1994; LUDWIG et al., 1994; POT et al., 1994).

As bactérias lácticas provocam uma série de alterações no leite, sendo a principal delas a metabolização da lactose em ácido láctico (AXELSSON, 1993; DELLAGLIO et al., 1994). Nas bactérias lácticas homofermentativas, o excesso de glicose é convertido quase que quantitativamente em ácido láctico (90-95%), enquanto nas heterofermentativas, devido à diferentes sistemas enzimáticos, são formadas quantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono (CO₂) e etanol (AXELSSON, 1993; THOMPSON e GENTRY-WEEKS, 1994; DELLAGLIO et al., 1994, 1995;). O piruvato, composto intermediário presente nos dois tipos de fermentação, pode ser metabolizado em diferentes vias enzimáticas, formando compostos importantes para as características finais do queijo (COGAN et al., 1991).

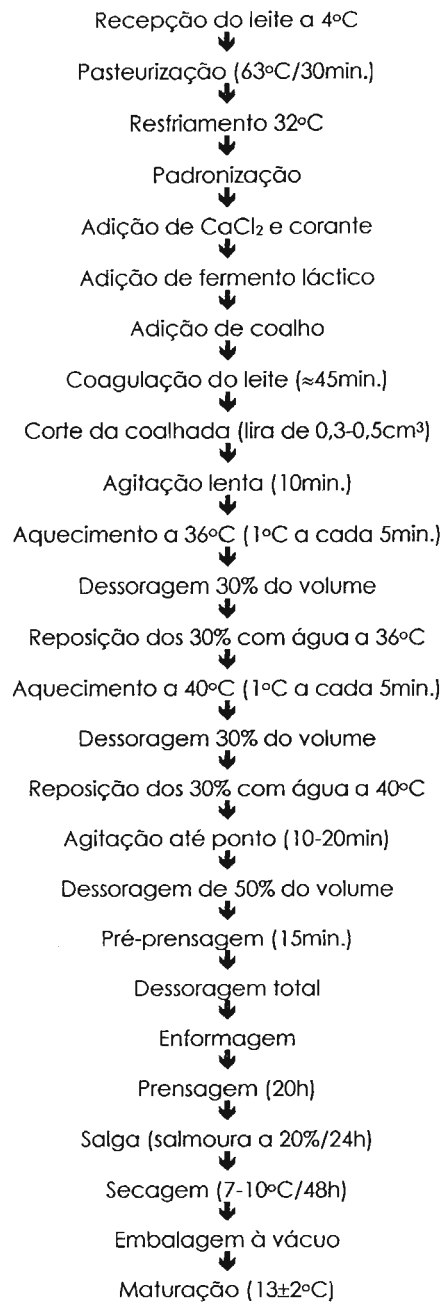


Figura 1 - Processamento de queijo Prato variedade Lanche. Fonte: Martins et al. (1979).

1.2.1 Fermentos lácticos

O uso de fermentos lácticos no processamento de queijos é tão antigo quanto a prática de preservação do leite, pois, mesmo antes da identificação das bactérias lácticas, os queijeiros já utilizavam um soro ou leite acidificado como fermento. Assim sendo, a microbiota normalmente presente no leite, juntamente com os contaminantes normais dos utensílios empregados no manuseio do leite e preparo do queijo, garantiam um suprimento de “fermento natural”. Ainda hoje, é comum o emprego de leite e soro previamente acidificado para garantir a fermentação láctica (GARCIA, 1984).

Com o desenvolvimento da indústria queijeira e a prática da pasteurização do leite, tornou-se necessária a adição de culturas lácticas selecionadas a fim de repor a microbiota destruída pelo tratamento térmico. A ação dessas bactérias no leite é constante ao longo do tempo e refletem na qualidade final do produto, proporcionando características organolépticas e propriedades estruturais uniformes (AYAD et al., 2001).

Com base na composição, os fermentos lácticos são divididos em três categorias: simples, múltiplos e mistos. Um fermento simples é constituído por uma única linhagem, sendo raramente utilizado na prática. Os fermentos múltiplos, de composição definida, são constituídos por uma combinação de linhagens puras, que levam à prevenção dos bacteriófagos, da intolerância ao sal ou do efeito da temperatura de cozimento, permitindo ainda a otimização da produção de ácido láctico. Os fermentos mistos são uma combinação de linhagens envolvendo espécies diferentes, cuja composição é indefinida. Este tipo de fermento é muito utilizado na fabricação de queijos frescos de massa crua ou semi-cozida, sendo sempre compostos por espécies acidificantes, aromatizantes ou uma associação de ambas (COGAN et al., 1991, COGAN, 1996).

O Quadro 1 apresenta a composição dos fermentos mistos e os produtos a que se destinam. Na fabricação do queijo Prato, utiliza-se o fermento LD, composto por *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lac. lactis* subsp *cremoris*, *Lac. lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis*, e por *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*. Os lactococos do fermento têm como função principal produzir ácido láctico e

diacetil respectivamente, enquanto que o *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* só produz diacetil após a diminuição do pH, pois ao contrário do que ocorre nos *Lac lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*, sua enzima citratase, que inicia a cadeia de reações para a produção de diacetil, só é ativada em condições ácidas (HUGENHOLTZ et al.,1993; COGAN et al., 1991, COGAN, 1996). Além do diacetil, o *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*, produz pequena quantidade de CO₂, responsável pelas olhaduras típicas do produto final (OLIVEIRA, 1986). Ademais, essas culturas lácticas apresentam um papel primordial na maturação do queijo em decorrência da ação de peptidases citoplasmáticas, liberadas após a autólise celular, sobre as proteínas e seus produtos de degradação, levando às alterações de textura e formação de compostos determinantes do "flavour" (LYNCH et al., 1997).

QUADRO 1 - Tipos e composição dos fermentos lácticos mistos e os produtos a que se destinam. Fonte: LIMSONTIN et al. (1996).

Tipo de fermento	Espécie	Produto
Mesofílico		
0 ¹	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lac. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Queijo Cheddar, Queijo Feta, Quark Queijo Cottage, Queijo Minas Frescal,
L ²	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ; <i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp.	Manteiga, Queijo Feta, Queijo Cheddar
D ³	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Manteiga
LD ⁴	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lac. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> <i>Leu. mesenteroides</i> ssp.	Queijo Cheddar, Queijo Edam, Queijo Gouda, Queijo Prato, Quark, Manteiga, "Buttermilk"
Termofílico		
	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Str. thermophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>St. thermophilus</i> <i>Lab. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> .	logurte, Queijo Mussarela Queijo Emental, Queijo Grana Probióticos

¹Fermento 0 (não inclusão de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*).

²Fermento L (inclusão de *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*).

³Fermento D (inclusão de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*).

⁴Fermento LD (inclusão de ambas).

Em algumas variedades de queijo são adicionadas culturas secundárias com a finalidade de conferir determinadas características peculiares. Esta microbiota não tem sido extensivamente estudada, mas sabe-se que é composta por microrganismos fortemente proteolíticos e lipolíticos, principalmente os mofo e as bactérias que se desenvolvem na superfície de queijos maturados, contribuindo na formação de aminoácidos e ácidos graxos, precursores de muitos compostos de "flavour" (COGAN, 1995). Alguns exemplos podem ser citados, como o *Propionibacterium freudenreichii* em queijos do tipo Suíço, *Brevibacterium linens* em queijos de superfície limosa e *Penicillium roqueforti* e *Pen. camemberti*, respectivamente, em queijos Roquefort e Camembert (BERESFORD et al., 2001).

1.2.2 "Non starter lactic acid bactéria" (NSLAB)

Tem-se conhecimento há muito tempo que as "non starter lactic acid bactéria" (NSLAB), ou seja, bactérias lácticas não componentes do fermento láctico adicionado, fazem parte da microbiota do queijo, mas sua contribuição na maturação ainda não foi plenamente determinada. As NSLAB são provenientes do leite cru e sobreviventes à pasteurização (termodúricas) ou aportadas ao leite a partir do ambiente de processamento (ar e/ou equipamentos) ou dos componentes adicionados para a fabricação do queijo (enzimas, solução de NaCl, coagulante) (FLEET, 1999).

Estudos para identificar as NSLAB predominantes em diferentes tipos de queijos mostraram que essa microbiota influenciou positivamente na intensidade de "flavour", em função da maior atividade proteolítica de muitas das espécies e, em alguns casos, encurtaram o período de maturação (GOBBETTI et al., 1996; GRAPPIN e BEUVIER, 1997; REHMAN et al., 2000a; ALBENZIO et al., 2001; BERESFORD et al., 2001). Todavia, estudos adicionais serão necessários para estabelecer o papel exato dessas bactérias na maturação, uma vez que foi verificada que determinadas espécies originaram queijo Cheddar de alta qualidade, enquanto outras produziram defeitos, como o amargor (BERESFORD et al., 2001).

Esses estudos têm demonstrado a predominância das culturas do fermento láctico durante a fabricação do queijo que, em decorrência da elevada concentração adicionada, alcançam uma população de 10^9 UFCg⁻¹ no queijo recém-fabricado. Porém, este número é reduzido para cerca de <10 UFCg⁻¹ no final da maturação. Por sua vez, a população NSLAB, sobrevive por mais tempo, alcançando populações mais elevadas (McSWEENEY et al., 1995; REHMAN et al., 2000; BERESFORD et al., 2001; WOUTERS et al., 2002). O efeito da população NSLAB na qualidade do queijo é consequência do tipo de atividade metabólica das principais espécies envolvidas (WILLIAMS e BANKS, 1997).

Segundo McSWEENEY et al., (1995), vários são os fatores que podem influenciar na multiplicação da população NSLAB durante o processamento do queijo. A população inicial presente no coágulo dependerá das temperaturas de estocagem, de termização e/ou de pasteurização do leite, bem como do grau de contaminação dos ingredientes, equipamentos, pessoas ou do ambiente. Durante a maturação, a temperatura e a capacidade dessa microbiota em utilizar os substratos disponíveis no coágulo (FOX et al., 1998), bem como se desenvolver nos potenciais de óxido-redução promovido pelo desenvolvimento do fermento láctico, são os fatores de maior importância.

Como a lactose residual no coágulo é rapidamente metabolizada nas primeiras semanas de maturação (McSWEENEY et al., 1995), as possíveis fontes de energia para as NSLAB são, ribose, galactose, N-acetil-galactosamina, ácido N-acetil-neuramínico e lactato. A predominância de determinadas espécies em detrimento de outras é determinada justamente pela capacidade de utilização dos substratos disponíveis (PETERSON et al., 1990; MARTLEY e CROW, 1993; GOMEZ et al., 1999). Variações de especificidade ao substrato foram observadas para 11 linhagens de *Lactobacillus* spp. e 2 de *Weissella* spp.: lactose, glicose e galactose foram utilizados por 85 a 100% das culturas, ribose, N-acetil-galactosamina e ácido salicílico por 22 a 58%, lactato por 15% e citrato por 27% (WILLIAMS et al., 2000).

A taxa de multiplicação das NSLAB é dependente da linhagem e influenciada pela temperatura. A multiplicação mais rápida foi detectada em queijo resfriado lentamente, de 34°C para 8°C em 8 dias, do que naqueles refrigerados rapidamente em túnel de resfriamento comercial (FOLKERTSMA et al., 1995). Em queijo Cheddar, a diminuição da temperatura de maturação de 8 para

1°C promoveu uma multiplicação mais lenta da população de NSLAB, com uma diminuição de 2 ciclos logarítmicos após 60 dias de maturação (REHMAN et al., 2000).

Estudos sobre a ocorrência e diversidade de NSLAB revelaram que os lactobacilos mesofílicos são os predominantes, pois são capazes de se desenvolver muito bem no ambiente hostil prevalecente no interior do queijo: pH (4,9-5,3), teor de sal (4-6%), umidade (40%) e temperatura (5-13°C) (GOBBETTI et al., 1999; BERESFORD et al., 2001; WOUTERS et al., 2002). Também foi observado que muitas espécies apresentavam atividade mais elevada de β -galactosidase e maior resistência à bacteriófagos (HÉBERT et al., 2000).

Segundo WOUTERS et al. (2002), as espécies de NSLAB mesofílicas normalmente são encontradas nos queijos originários de países do oeste e norte europeu, enquanto aqueles de países de clima sub-tropical apresentam em sua composição principalmente bactérias lácticas termofílicas. Assim, *Str. thermophilus*, *Enterococcus* sp. e as espécies de lactobacilos termofílicos são incluídas neste grupo, uma vez que têm sido encontradas em muitas variedades de queijos (LAAN et al., 1998; FREITAS et al., 1999; GOBBETTI et al., 1999; MORENO et al., 2001).

Em estudo sobre a origem e a diversidade de NSLAB, BERTHIER et al. (2001) identificaram culturas a partir do leite, do fermento láctico e de queijos Comté provenientes de dois laticínios. *Lab. paracasei* e *Lab. rhamnosus* foram as espécies dominantes nesses produtos, constituindo-se em 98,7% dos isolados. Foi observada diversidade genética tanto em culturas provenientes de queijos quanto de laticínios diferentes. Os autores concluíram que a maioria dos lactobacilos mesofílicos era originária do leite cru, sendo esta provavelmente a fonte mais importante, e que a origem do leite, associada ao perfil específico das linhagens presentes, explicaria as diferenças nas características organolépticas entre os queijos.

Embora presentes em populações menores, espécies de *Pediococcus* tolerantes ao aquecimento têm sido identificadas em alguns tipos de queijos (BERESFORD et al., 2001). Em queijo Cheddar com diferentes idades de maturação e provenientes de dois laticínios foram identificados somente 5,6% das linhagens como sendo *Pediococcus* sp. e as demais como *Lactobacillus* spp. (LITOPOULOU-TZANETAKI et al., 1989). Uma das linhagens de *Pediococcus* que apresentava

atividade elevada de aminopeptidases e capacidade de produzir diacetil, acetaldeído e bacteriocina, promoveu uma proteólise mais intensa de queijo Feta, encurtando em 30 dias o período de maturação, além de intensificar o desenvolvimento de compostos de "flavour" (VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI et al., 1990).

AYAD et al. (2000) evidenciaram que lactococos isolados de produtos lácteos de fabricação artesanal apresentavam algumas características fenotípicas distintas daquelas das linhagens industriais. Porém, mesmo após 50 subcultivos muitos desses lactococos conservavam algumas características tecnológicas importantes, como resistência à bacteriófagos, atividades proteolítica e de acidificação, produção de bacteriocinas e compostos de "flavour". Posteriormente, AYAD et al. (2001) constataram que linhagens selvagens e industriais cresciam bem em associação em leite e nas condições de processamento de queijo Gouda. Os autores concluíram que linhagens selvagens de lactococos poderiam ser utilizadas para a produção de queijos com propriedades sensoriais diversificadas ou específicas para cada região.

GOBBETTI et al. (1999) encontraram diferenças quantitativas e qualitativas na microbiota presente em queijo Fossa proveniente de seis laticínios. Os autores verificaram que, com exceção da amostra de um dos laticínios, todas as outras apresentaram uma pequena população de lactococos provenientes do fermento láctico, de lactobacilos termofílicos e de *Enterococcus* sp. Verificaram ainda, que os lactobacilos mesofílicos homofermentativos, *Lab. plantarum*, *Lab. curvatus* e *Lab. paracasei* subsp. *paracasei*, foram as espécies NSLAB predominantes nesses queijos e que aqueles com populações mais elevadas apresentavam concentrações mais elevadas de aminoácidos.

ANTONSSON et al. (2001) utilizando testes fenotípicos e tipagem em RAPD classificaram a microbiota presente no queijo semiduro Herrgård em processo de maturação e fabricado em três laticínios diferentes na Suécia. Nos queijos de dois dos laticínios, as bactérias do fermento láctico diminuíram e os lactobacilos constituíram a microbiota dominante após três meses de maturação. Nos queijos do outro laticínio, que apresentavam uma população maior, a microbiota adicionada foi a dominante durante os seis meses de maturação. Segundo os autores, essas diferenças poderiam ser decorrentes da maior resistência à autólise das bactérias

adicionadas nesse queijo. Foi observada maior diversidade genética nos *Lactobacillus* sp. isolados dos queijos de apenas dois dos laticínios.

Com relação ao queijo Prato, existem somente dois trabalhos na literatura sobre a evolução da microbiota durante a maturação. Num deles, MARTINS et al. (1979) verificaram uma população elevada de *Lactococcus lactis* spp. e de fermentadores de citrato, posteriormente identificados como *Leuconostoc* sp. e *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, nas primeiras semanas de maturação. Houve no decorrer da maturação uma diminuição das bactérias adicionadas e aumento da população elevada de *Lactobacillus* sp. VALLE et al. (1991), ao estudarem a evolução da microbiota láctica de queijos conservados a temperaturas de subcongelamento (-4-5°C), verificaram um decréscimo de 1,3 ciclos logarítmicos na população de lactococos nos queijos maturados tradicionalmente após 2 meses e de 1,5 ciclos logarítmicos naqueles submetidos ao subcongelamento e mais 2 meses de maturação. População elevada de lactobacilos mesofílicos foi detectada nos queijos recém-fabricados, porém, com um decréscimo no final da maturação da ordem de 1 ciclo logarítmico nas duas condições.

1.3 CONTRIBUIÇÃO DA MICROBIOTA LÁCTICA NO PROCESSAMENTO DE QUEIJOS

A conversão do leite em queijo pode ser caracterizada como um processo de concentração diferencial, na qual os teores de caseína e gordura são concentrados de 6 a 12 vezes. Para a maioria das variedades, esta conversão pode ser dividida em duas fases bem definidas, fabricação e maturação.

FOX (1987) define a fase de fabricação como sendo a das operações realizadas durante as primeiras 24 horas, apesar de que algumas delas como salga e desidratação possa continuar por um período maior. Muito embora os fluxogramas de fabricação para as diferentes variedades de queijos sejam diferentes quanto aos detalhes, as etapas básicas são comuns para a maioria deles: acidificação, coagulação, desidratação (corte do gel, aquecimento/cozimento, agitação, drenagem/prensagem ou qualquer processo que promova a sinérese),

enformagem e salga, a partir das quais são obtidos todos os queijos conhecidos (CHAPMAN e SHARPE, 1990; MIETTON et al., 1994).

O queijo representa um sistema biológico dinâmico: através dos processos de fabricação e maturação, ocorre uma série conjunta e/ou sucessiva de eventos bioquímicos que, se balanceados, fornecem um produto com "flavour" e textura desejáveis (FOX, 1987).

Normalmente os queijos obtidos por coagulação ácida são consumidos frescos. Porém, a maioria deles passa por uma etapa de maturação, definida como sendo um processo complexo que envolve uma série de modificações bioquímicas nos principais constituintes do coágulo que levam à transformação de uma coalhada insípida em um queijo com características de "flavour" e textura própria das diferentes variedades (FOX et al., 1996; EL SODA, 1997).

As principais vias bioquímicas (glicólise, proteólise, lipólise e metabolismo do citrato) que ocorrem durante a maturação do queijo estão esquematizadas na Figura 2.

1.3.1 Acidificação

A acidificação é um dos principais eventos na fabricação queijos. É definida como sendo o desenvolvimento de acidez durante a etapa de fabricação, e para algumas variedades também nos estágios iniciais de maturação. Envolve a fermentação, "in situ", de lactose a L-lactato pelas culturas do fermento láctico (COGAN, 1995; FOX et al., 1990).

A produção de ácido é a chave para a obtenção de queijo de boa qualidade e influencia várias etapas do processamento resumidamente das seguintes formas: promove a coagulação do leite no ponto isoelétrico das caseínas, ao redor de pH 4,6 ou de 5,2, quando associada ao calor; favorece a coagulação enzimática; auxilia a sinérese do coágulo; afeta a textura ao promover a progressiva remoção do fosfato de cálcio coloidal; inibe o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (COGAN et al., 1991).

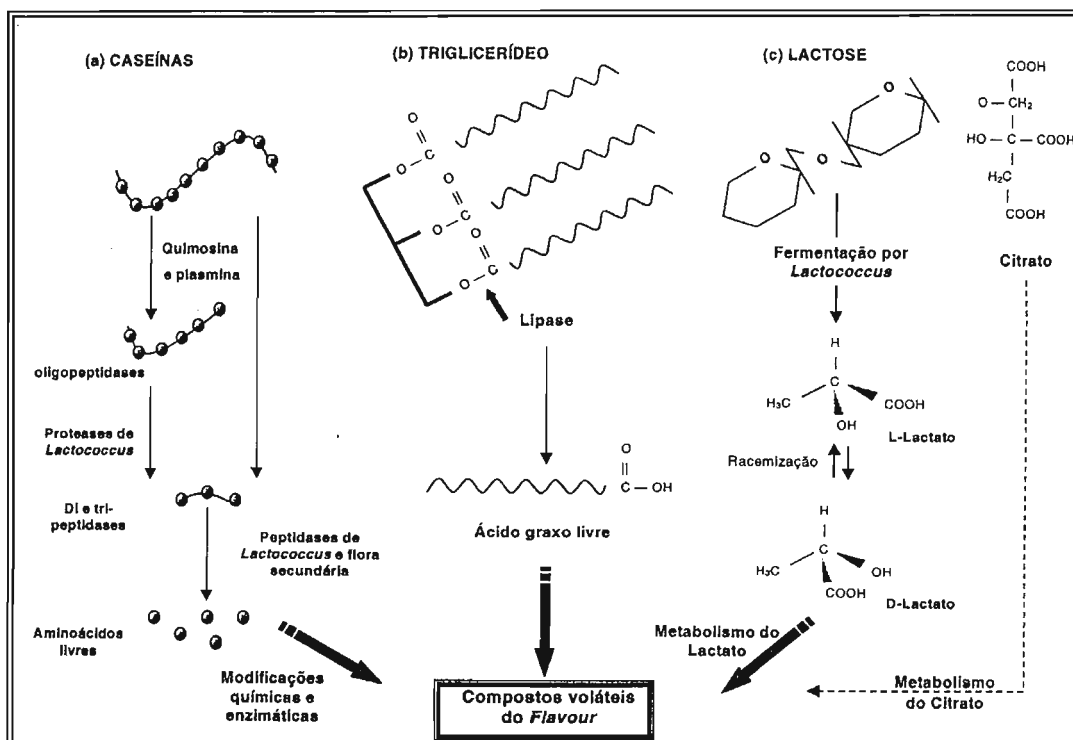


Figura 2 - Principais vias bioquímicas da maturação: (a) proteólise, (b) lipólise, (c) metabolismo da lactose e do citrato. Fonte: McSWEENEY e SOUZA (2000).

Dois aspectos importantes devem ser considerados na conversão de ácido láctico: a velocidade e o seu nível máximo de produção, uma vez que existem diferenças importantes entre os gêneros, espécies e mesmo entre as linhagens. Assim, a quantidade de ácido láctico produzido pelas espécies do gênero *Lactobacillus* é geralmente superior à de outros gêneros utilizados industrialmente: *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. Com uma população de 10^9 UFC/mL de lactococos, a acidez máxima é de 0,5% de ácido láctico (p/v), o que corresponde a um pH de 4,3 a 4,5. Para os lactobacilos termofílicos que são ácido-tolerantes, um pH de 3,0 a 3,5 corresponde a 1,5% de ácido láctico (p/v), enquanto para as linhagens de *Leuconostoc* sp., que são mais sensíveis, o pH situa-se abaixo de 5,0 (ACCOLAS et al., 1977).

Outro fator que influencia a fermentação da lactose é a relação sal na umidade (S/U) da coalhada. As NSLAB são mais resistentes ao sal que os lactococos, que são fortemente inibidos por concentrações de sal superiores a 2,5% e, ao contrário, são estimulados em baixos níveis de sal. Se a temperatura de estocagem

e a relação S/U estiverem um pouco mais elevadas que o normal, ocorrerá a formação de D-lactato pelas NSLAB (TURNER e THOMAS, 1980).

Além de conseqüências nutricionais indesejáveis, devido a sua menor solubilidade e absorção, especialmente em crianças, o D-lactato pode cristalizar no queijo, causando manchas brancas indesejáveis, principalmente na superfície (DYBING et al., 1988). Também pode ocorrer no queijo a oxidação de L-lactato a acetato e CO₂, sendo esta reação dependente da população de NSLAB e da disponibilidade de oxigênio, que é determinada pelo tamanho dos blocos de queijo e permeabilidade da embalagem ao oxigênio (THOMAS, 1987).

1.3.2 Fermentação do citrato

Embora o leite apresente concentrações relativamente baixas de citrato, ao redor de 8-9mM, o seu metabolismo é importante em queijos fabricados com fermentos mesofílicos, como o Prato. O citrato é rapidamente metabolizado por *Lac. lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc* spp., com a formação de diacetil, acetoína, 2,3-butanodiol e CO₂ (COGAN, 1995). Também pode ser transformado a acetato e CO₂ por determinadas espécies de lactobacilos mesofílicos (COGAN, 1995; MEDINA DE FIGUEROA et al. 2000; McSWEENEY e SOUZA, 2000).

As espécies *Lac. lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* não são capazes de utilizar o citrato como única fonte de energia, mas podem co-metabolizá-lo rapidamente na presença de um açúcar fermentescível (COGAN, 1995). A fermentação do citrato é influenciada pelo pH e pela linhagem. Embora atividade seja observada a pH 6,5, ela é bem mais rápida a 4,5 e mais efetiva para *Lac. lactis* sp. que *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* (HUGENHOLTZ et al, 1993; COGAN, 1995).

Dentre os principais compostos de "flavour" formados a partir do metabolismo do citrato, quantitativamente, a acetoína é a mais importante. Porém, o diacetil proporciona aroma de manteiga a certas variedades de queijo. Por sua vez, o CO₂ é responsável pela formação de olhaduras nos queijos dinamarqueses e Prato, sendo o número, localização e tamanho destas dependentes da

consistência do queijo e atividade metabólica da cultura (DIVIES et al., 1994; COGAN, 1995; MEDINA DE FIGUEROA et al., 2000).

1.3.3 Lipólise

O queijo é um produto com alto teor de gordura, variando na faixa de 12% para os frescos fabricados por coagulação ácida e de 20 a 40% para os maturados (RENNER, 1987) estando sujeito às alterações lipolíticas (enzimáticas) e oxidativas (químicas). A hidrólise de triglicérides por ação de lipases forma ácidos graxos livres, mono e diglicérides e glicerol, sendo uma das mais importantes transformações bioquímicas da maturação de queijos italianos como Romano e Parmesão e de queijos azuis (FOX e STEPANIKI, 1993, BOSSET et al., 1997).

As bactérias lácticas apresentam uma capacidade limitada para hidrolisar triglicérides, que constituem mais que 98% da matéria graxa do leite. Por isto, na maioria das variedades de queijos, sua contribuição no desenvolvimento de "flavour" é muito pequena (FOX e SPANIKI, 1993; BOSSET et al., 1997). Alguns estudos mostraram que determinadas espécies de lactobacilos e *Str. thermophilus* apresentavam fraca atividade lipolítica, sendo algumas linhagens de *Lactococcus* sp. e de *Leuconostoc* sp. um pouco mais ativas (SEARLES et al., 1970; STADHOUDERS e VERINGA, 1983; FOX et al., 1995). Algumas espécies liberaram ácidos graxos a partir dos mono- e diglicérides previamente formados pela hidrólise dos triglicérides pelas lipases naturais do leite e/ou de bactérias Gram-negativas, formando metilcetonas, álcoois, lactonas e éster (MOLIMARD et al., 1997; McSWEENEY; SOUZA, 2000; KRANEMBURG et al., 2002).

Assim, os ácidos graxos apresentam um papel importante no "flavour" de algumas variedades de queijos, mas participam somente do sabor de fundo em outros tipos, como o Cheddar e Gouda, nos quais valores elevados em ácidos graxos liberados podem conduzir a um gosto de ranço. Ao contrário, uma fraca concentração teria um impacto positivo, principalmente se houver um equilíbrio com os produtos de degradação das caseínas. Em queijo Cheddar, observou-se que o "flavour" aumentou com a elevação da concentração dos ácidos butanóico

e hexanóico e declinou quando estes alcançaram determinados níveis (BOSSET e GAUCH, 1993; URBACH, 1993; RYCHLIK et al., 1997).

1.3.4 Proteólise

A proteólise é a mais importante transformação bioquímica do processo de maturação da maioria das variedades de queijos. Ela se sucede em três etapas distintas da fabricação: inicia-se no leite, é induzida na coagulação enzimática e continua durante a etapa de maturação (FOX, 1987). Envolve a degradação gradual das caseínas, devido à ação combinada de vários agentes proteolíticos originários de diferentes fontes, a saber: 1) proteinases nativas do leite, principalmente a plasmina; 2) quimosina ou outro agente coagulante (pepsina ou proteinase microbiana); 3) proteinases e peptidases do fermento láctico, bem como das NSLAB e das culturas secundárias, dependendo do tipo de queijo (LAW et al., 1992; FOX e STEPANIAK, 1993; FOX et al., 1993).

Os produtos resultantes da proteólise contribuem diretamente para o aparecimento do "flavour" ou, indiretamente, via catabolismo de aminoácidos a compostos voláteis de aroma. A extensão e a natureza da proteólise, bem como a quantidade de produtos de degradação, varia de acordo com a especificidade e atividade das enzimas disponíveis envolvidas. Essas transformações são atribuídas, principalmente à microbiota e reguladas pela composição do queijo (sal, cálcio, fosfato, lactose), condições físico-químicas (pH, níveis de atividade de água) e maturação (tempo, temperatura, umidade (McSWEENEY, 1996).

A proteólise primária das caseínas ocorre pela ação de proteinases naturais do leite, principalmente a plasmina, do coagulante adicionado e, em menor extensão, de proteinases bacterianas (FOX, 1989; ANDREWS, 1994). A plasmina é uma serina-proteinase que apresenta atividade semelhante à tripsina, com um pH ótimo ao redor de 7,5 e uma especificidade para ligações envolvendo resíduos de lisina. Atua preferencialmente sobre a β -caseína, com a formação de γ -caseínas e proteose-peptonas (SNOEREN e VAN RIEL, 1979; GRUFFERTY e FOX, 1988; FOX e McSWEENEY, 1998). Como é inativada nas faixas de temperatura de pasteurização, sua contribuição na maturação de queijo Prato é pequena em relação à quimosina

(LAWRENCE et al., 1987). A quimosina, que também apresenta uma serina em seu sítio ativo, hidrolisa as ligações peptídicas entre os resíduos Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -caseína, dividindo-a em duas frações: a fração amino-terminal para- κ -caseína (κ -CN f1-105) que é insolúvel na presença de íons cálcio e permanece integrada com a α_{s1} -, α_{s2} - e β -caseínas, fazendo parte da estrutura do coágulo; e a fração carboxi-terminal 106-169 (κ -CN f1-106-169), denominada de caseíno-macropéptido ou glicomacropéptidos (GMP; κ -CN f106-148), que é solúvel na presença de íons cálcio e, portanto, perdida no soro (FOX et al., 1996; FOX e McSWEENEY, 1998).

Embora o papel mais importante das proteinases de bactérias lácticas seja a degradação de peptídeos originados a partir da ação da quimosina, estas enzimas também são capazes de degradar as ligações peptídicas das caseínas, formando peptídeos de alto e médio peso molecular (oligopeptídeos) e alguns aminoácidos (Ile, Leu, Val, His e Met), contribuindo para o aumento de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (ZEVACO e DESMAZEUD, 1980; VISSER et al., 1991). Nas células bacterianas, as proteinases encontram-se ancoradas à parede e são codificadas por um gene localizado em um plasmídeo ou no cromossomo, sendo sintetizadas sob forma de um precursor, que expressa uma seqüência sinal N-terminal, cuja função é liberar a proteína para o exterior da célula, e outra seqüência sinal de ancoramento no C-terminal da molécula (TAN et al., 1993; DE VOS e SIEZEN, 1994; KOK e DE VOS, 1994; KUNJI et al., 1996). Apresentam características bioquímicas similares: são serina-proteinases, com peso molecular entre 100 e 210KDa; e têm atividade ótima sobre a caseína a pH entre 6,0 e 7,0, exibindo especificidades diferentes de substrato e sendo ativadas ou estabilizadas pelo cálcio (LAAN e KONINGS, 1989, 1992; KUNJI et al., 1996; MONNET e GRIPON, 1997). Com base nas diferentes especificidades aos substratos, três classes de proteinases de lactococos foram identificadas: as proteinases PI e PIII, que hidrolisam, respectivamente, a β -caseína e α_{s1} -, β - e κ -caseínas, e um tipo com especificidade intermediária, tendo alguns pontos em comum com as proteinases dos tipos PI e PIII (VISSER et al., 1986; KOK et al., 1988; REID et al., 1991; POOLMAN e KONINGS, 1993; MONNET et al., 1992).

A proteólise secundária é caracterizada pela formação de pequenos peptídeos e aminoácidos pela ação de peptidases bacterianas de várias especificidades. Estas atuam juntamente com as proteinases e a quimosina residual nos oligopeptídeos, contribuindo para as características organolépticas do queijo

(VEGARUD et al., 1983; FOX e McSWEENEY, 1998). Somente na década de 90 ficou estabelecida a localização intracelular dessas enzimas e que seus genes eram de origem cromossômica (TAN et al., 1993; MONNET et al., 1994; POOLMAN et al., 1995). Após autólise celular, elas são liberadas na matriz do queijo, em menor ou maior velocidade, dependendo da linhagem em questão (LORTAL, 1995; POOLMAN et al., 1995; VALENCE, 1998).

As bactérias lácticas apresentam várias categorias de peptidases: as aminopeptidases, di- e tri-peptidases e peptidases específicas de prolina. Todavia, não possuem nenhuma carboxipeptidase (KRANENBURG et al., 2002). Na literatura, verificam-se diferentes classificações para as aminopeptidases. CHRISTENSEN et al. (1999) as dividiu em duas classes de acordo com a especificidade: as endopeptidases que degradam oligopeptídeos por clivagem de ligações internas (PepO, PepE, PepF); e as exopeptidases, que degradam oligopeptídeos a partir do N-terminal ou C-terminal, removendo de 1 a 3 resíduos de aminoácidos (PepN, PepT, PepV, PepD, PepA, PepP, PepQ, PepX, Pep I, PepR, PepL, PCP e PepG). Vários estudos têm demonstrado que a maioria das peptidases apresenta uma metalo-protease no sítio ativo, embora algumas apresentem serina ou sulfidrilas. Possuem alto peso molecular, de 36 a 52KDa, com atividade ótima de pH na faixa 6 a 9 e temperatura de 30 a 55°C, exibindo diferentes especificidades hidrolíticas (FOX et al., 1996; MULHOLLAND, 1997; CHRISTENSEN et al., 1999). Outros trabalhos têm evidenciado que a ação de determinadas aminopeptidases, como por exemplo, PepN, PepC, PepT, PepX e PepO foram primordiais para o desenvolvimento da proteólise (L'ANSON et al., 1995; CHRISTENSEN e STEELE, 1996; MIREAU et al., 1996a), tendo sido verificado que a inativação da PepN e da PepC afetou diretamente a liberação de aminoácidos a partir de oligopeptídeos (MIEREAUX et al., 1996b).

1.3.5 Formação de "flavour"

A formação do "flavour" é um processo extremamente complexo e resultante de um equilíbrio sutil e frágil entre todos os compostos originários do metabolismo da lactose, lipídeos e proteínas (YVON e RIJNEN, 2001). Os fatores determinantes nesse caso são a tecnologia de fabricação e a microbiota (fermento láctico, NSLAB e secundária) (McSWEENEY et al., 1997a). Sabe-se que os produtos

formados durante proteólise contribuem diretamente para a formação de "flavour". Todavia, dada à complexidade das reações ocorridas na matriz do queijo à relação de um determinado sabor com algum peptídeo, em particular, é muito difícil de ser estabelecida. Normalmente, nos queijos maturados, os peptídeos pequenos são mais importantes que os médios e os grandes (CROW et al., 1992). Porém, em alguns casos, os peptídeos pequenos formam junto com os grandes a base dos defeitos de sabor, dentre eles, o amargor (FOX et al., 1996; ENGELS, 1997).

Tem-se verificado que o amargor, principal defeito encontrado em queijos, origina-se pela presença de peptídeos de alto peso molecular, ricos em aminoácidos hidrofóbicos (leucina, prolina, fenilalanina), provenientes, em sua maior parte, das extremidades C-terminal da β -caseína e N-terminal da α_{S1} -cadeína (VISSER et al., 1983; THOMAS e PRITCHARD, 1987; LEE et al., 1996; DESMAZEAUD e GRIPON, 1977) e peptídeos básicos como a arginina da região N-terminal (HABIBI-NAJAFI e LEE, 1996). Esses peptídeos amargos podem ser degradados a peptídeos e aminoácidos não amargos pelas aminopeptidases das bactérias lácticas, conforme constatado por NIVEN et al., (1996) num estudo em que a aminopeptidase PepN hidrolisou peptídeos contendo aminoácidos hidrofóbicos como a leucina e, em menor extensão, a fenilalanina. Tem sido verificado também que linhagens de lactobacilos com atividade de peptidases maior que a de lactococos apresentam elevado potencial para degradar peptídeos hidrofóbicos e reduzir o amargor em queijos (HABIBI-NAJAFI e LEE, 1996).

Os aminoácidos liberados pela proteólise são os precursores, via degradação enzimática ou química, de compostos voláteis, dentre os quais amônia, aminas, aldeídos, fenóis, indol e álcool que contribuem de forma significativa para o aroma do queijo (CHRISTENSEN et al., 1999). Vários desses compostos originados do catabolismo dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano), aminoácidos de cadeia lateral (leucina, isoleucina, valina) e aminoácidos sulfurosos (metionina) têm sido identificados em alguns tipos de queijos (CHRISTENSEN et al., 1999); porém, compostos "off-flavours", principalmente aqueles derivados dos aminoácidos aromáticos, também são formados (DUN e LINDSAY, 1985; URBACH, 1993). Os aminoácidos sulfurosos são representados principalmente pelos resíduos metionina, uma vez que os resíduos cisteína estão presentes em níveis baixos e somente nas α_2 - e κ -caseínas (McSWEENEY; SOUZA, 2000).

As reações ocorridas no catabolismo de aminoácidos de queijos (Figura 3), são bem determinadas, mas as vias catabólicas para muitos aminoácidos ainda permanecem desconhecidas. Algumas enzimas envolvidas nessas reações têm sido caracterizadas bioquimicamente e geneticamente, principalmente as de *Lac. lactis* sp. (ALTING et al., 1995; BRUINENBERG et al., 1997; CHICH et al., 1999). Uma ampla revisão sobre as vias catabólicas identificadas em bactérias lácticas foi publicada por CHRISTENSEN et al. (1999).

Tem se verificado que muitas pesquisas relacionadas com a aceleração da proteólise foram realizadas nesta última década. Estudos mais recentes mostraram que a intensificação das reações da proteólise primária não leva a intensificação de "flavour" e que a ação de enzimas conversoras de aminoácidos a compostos voláteis é que constitui o principal fator limitante. Porém, um balanço adequado entre a taxa de degradação das caseínas e a de conversão de aminoácidos é essencial para o processo (CHRISTENSEN et al., 1995, WALLACE e FOX, 1997, YVON e RIJNEN, 2001). Um estudo de seleção de bactérias lácticas e outros microrganismos relacionados com a maturação quanto à sua capacidade em degradar aminoácidos a compostos aromáticos revelaram que esta característica é extremamente dependente da linhagem (YVON e RIJNEN, 2002).

1.4 AUTÓLISE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

Todas as células bacterianas apresentam em sua parede celular enzimas hidrolíticas denominadas autolisinas, cuja função fisiológica ainda não foi determinada claramente. Mas, como estão presentes em todo ciclo evolutivo, têm sido implicadas em etapas importantes, a saber: na fase de alongamento, divisão e separação das células filhas (POOLEY et al., 1987); na biossíntese, remodelagem (SHOCKMAN et al., 1968) e "turnover" do peptidoglicano (POOLEY, 1976) e nos processos de germinação e liberação de esporos (SHOCKMAN et al., 1996). Os estudos efetuados para a elucidação dessas funções são dificultados principalmente pela presença de autolisinas de diferentes especificidades numa mesma célula bacteriana (POOLEY, 1976; SHOCKMAN et al., 1996).

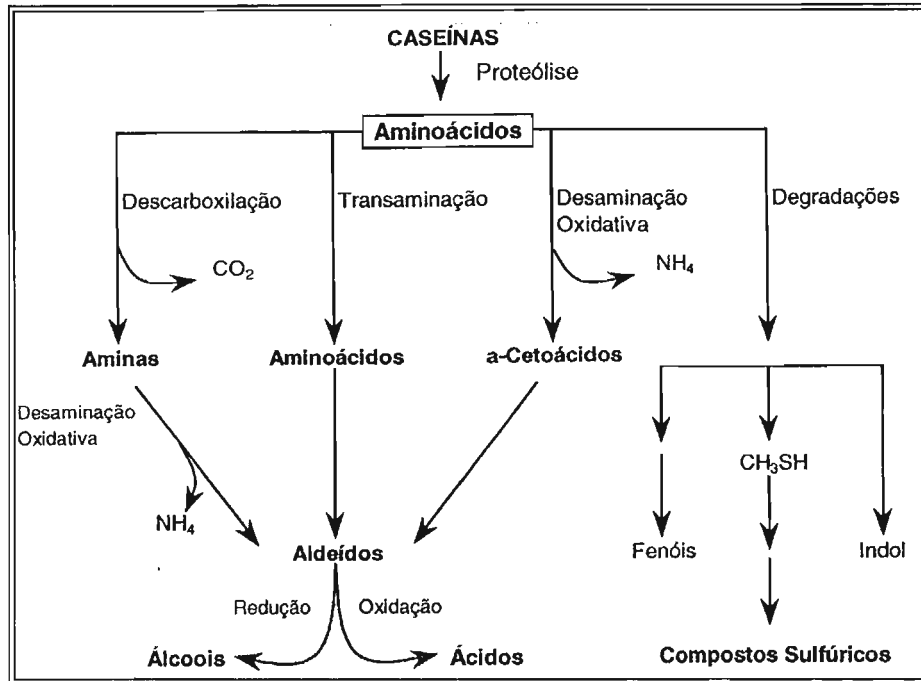


Figura 3 - Principais vias do catabolismo de aminoácidos. Fonte: HEMME et al. (1982).

Assim, a autólise de bactérias lácticas é definida como um complexo fenômeno de ruptura celular que ocorre devido à hidrólise de ligações específicas no peptidoglicano (SHOCKMAN e HÖLJTJE, 1993) promovida por autolisinas, enzimas tão perigosas para as bactérias, que são descritas como "enzimas suicidas" (SHOCKMAN et al. 1996). A autólise pode ser espontânea, como acontece em células em fase estacionária de desenvolvimento (GHUYSEN et al., 1966; VEGARUD et al., 1983; BUIST et al., 1997; LORTAL et al., 1997), ou induzida por condições fisiológicas desfavoráveis (VEGARUD et al., 1983; SHOCKMAN e HÖLJTJE, 1994; BUIST et al., 1997).

Sendo a autólise um evento decorrente de modificações do peptidoglicano pela ação combinada de autolisinas, uma breve descrição da estrutura deste substrato é necessária para uma melhor compreensão do fenômeno. O peptidoglicano forma uma rede di- ou tri-dimensional complexa e larga que cobre inteiramente a célula bacteriana e representa entre 30 a 70% do peso seco da parede celular. É constituído por longas cadeias de glicanos de composições distintas, unidas por pontes curtas de peptídeos, resultando em uma rede que mantém a integridade celular independentemente da alta pressão

osmótica intracelular (PERKINS, 1963; ROGERS, 1963; CLARKE e DUPONT, 1992; SHOCKMAN et al., 1996).

Dependendo da espécie, em alguns ou em todos os resíduos de ácido murâmico, encontram-se ligadas cadeias interpeptídicas que apresentam uma seqüência consenso: L-alanina, ácido D-glutâmico, ácido meso-diaminopimélico ou L-lisina e D-alanina e que, por sua vez, estão unidas em ligações covalentes, resultando em uma rede de pelo menos duas dimensões (PERKINS, 1963; GHUYSEN et al., 1966). As ligações covalentes das cadeias interpeptídicas mais freqüentes são aquelas que ocorrem entre o grupo terminal carboxila da D-alanina de uma e o grupo terminal ϵ -amino da L-lisina ou o grupo α' -amino do ácido diaminopimélico de outra cadeia peptídica (PERKINS, 1963; GHUYSEN et al., 1966; DELCOU et al., 1999). As ligações cruzadas permitem à rede de peptideoglicano se expandir ou se encolher, fornecendo à macromolécula covalentemente fechada uma elasticidade extraordinária e alta resistência à tensão (DELCOU et al., 1999).

De acordo com a especificidade ao substrato, três classes de autolisinas são descritas: 1) duas glicosidases, a endo-N-acetilmuramidase (muramidase) [E.C.3.2.1.17] e a endo-N-acetilglicosaminidase (glicosaminidases) [E.C.3.2.1.52], que hidrolisam respectivamente as ligações entre o ácido N-acetil-murâmico β 1-4 N-acetilglucosamina e entre o ácido N-acetilglucosamina β 1-4 ácido N-acetilmurâmico; 2) a N-acetilmuramil-L-alanina amidase (amidase) [E.C.3.5.1.28], que hidrolisa especificamente as ligações entre grupamento lactil do ácido murâmico (NacMur) e o grupamento α -amina da alanina em posição 1 das cadeias peptídicas, separando esta da cadeia de glicano; 3) as peptidases (endo ou exo), que hidrolisam as ligações peptídicas principais das cadeias peptídicas (BUIST et al., 1995; GHUYSEN et al., 1966; RIEPE et al., 1997; DELCOU et al., 1999).

A Figura 4 apresenta um esquema da estrutura do peptideoglicano de *Lac. lactis* sp., na qual as cadeias principais paralelas, essenciais à resistência mecânica e insolubilidade, são compostas pelos dissacarídeos N-acetil-D-glicosamina e ácido N-acetilmurâmico, dispostos de maneira alternada e unidos entre si por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). A Figura mostra também as especificidades das autolisinas e os sítios ativos no peptideoglicano.

1.4.1 Avaliação da autólise por diferentes métodos

Em decorrência das concentrações reduzidas de autolisinas presentes nas células, os métodos normalmente utilizados para sua determinação envolvem medidas indiretas. Em meios aquosos, a autólise pode ser facilmente determinada pelo decréscimo da densidade óptica durante o desenvolvimento bacteriano. Porém, essa determinação torna-se mais difícil em um sistema mais complexo como o queijo, onde as células encontram-se incrustadas em uma matriz sólida. Nestas condições, os métodos mais comumente utilizados são relacionados com a verificação do decréscimo da população viável, o exame de alterações celulares por microscopia e a atividade de material celular por métodos enzimáticos e imunológicos. Além disso, a atividade lítica pode ser visualizada, "in vitro", em ágar contendo substratos adequados e em zimogramas. Devido às suas vantagens e desvantagens, CROW et al. (1995) sugeriram uma combinação de cada um desses métodos.

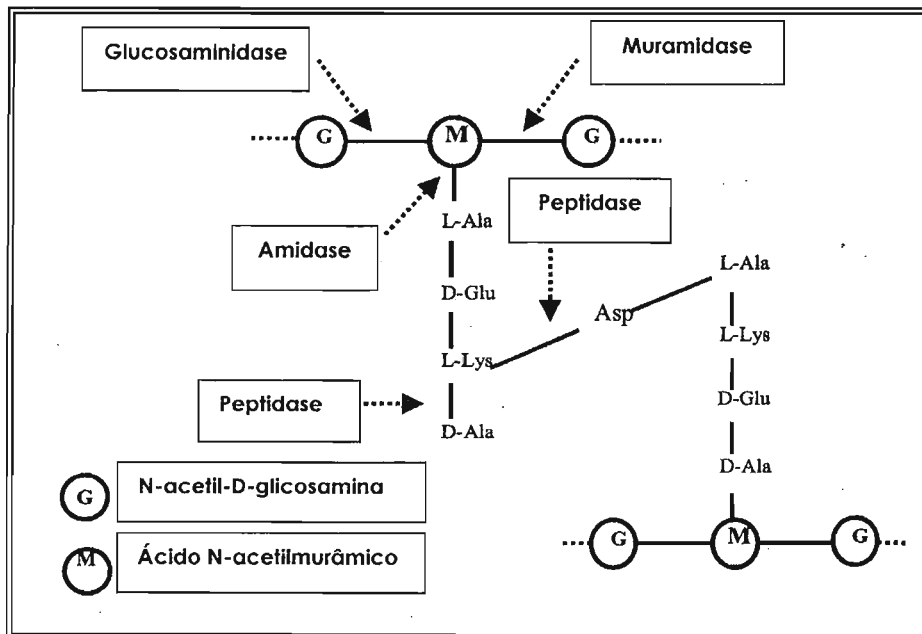


Figura 4 - Representação esquemática da estrutura do peptidoglicano de *Lac. lactis* sp. mostrando os sítios ativos de clivagem das autolisinas. Fonte: DELCOU et al. (1999).

1.4.1.1 Decréscimo da população durante a multiplicação celular

A autólise de bactérias lácticas tem sido estudada em sistemas aquosos, meios de cultivos ou tampões pela verificação do decréscimo na densidade óptica (BIE e SJÖSTRÖM, 1975b; VEGARUD et al., 1983; FERNÁNDEZ-MURGA et al., 1994; ØSTLIE et al., 1995a,b,c; LANGSRUD et al., 1987; RIEPI et al., 1997; HUSSON-KAO et al., 2000) ou da população de células viáveis (LANGSRUD et al., 1987; BOUTROU et al., 1998b). Embora esses sistemas aquosos não simulem totalmente as condições de processamento e nem a complexidade das transformações sucedidas na maturação dos queijos, a principal vantagem destacada em vários estudos foi relacionada à adequação para avaliação da tendência da cultura, bem como dos parâmetros ambientais que afetam a ocorrência da autólise (CROW et al., 1995).

LORTAL et al. (1997) evidenciaram uma relação entre os resultados de autólise obtidos em meios de cultivos e em tampões para determinadas espécies de propionibactérias, que apresentaram atividade elevada em ambos os meios. Por outro lado, para linhagens de *Lab. helveticus*, essa tendência não foi detectada. Isto foi atribuído à não degradação das proteínas cristalinas (S) presentes na parede celular dessa espécie, que mantinha sua forma celular mesmo após a hidrólise do peptidoglicano, conforme visualizado por microscopia eletrônica.

Em um estudo comparativo, não foi evidenciada uma relação entre a medida da densidade óptica e a contagem de células viáveis. Este fato foi atribuído a fatores intrínsecos às culturas que poderiam ter interferido na medida da absorbância, como formação de muco, presença de fragmentos grandes de parede celular e/ou formação de cadeias longas de células (LANGSRUD et al., 1987). No que concerne à enumeração celular, uma das principais limitações observadas foi a presença de protoplastos (UNEMOTO et al., 1978; CHAPOT-CHARTIER et al., 1994), verificando-se apenas uma diminuição da população viável, porém, sem haver liberação de componentes intracelulares (CROW et al., 1993; WILKINSON, et al., 1994b; O'DONOVAN et al., 1996).

1.4.1.2 Atividade de componentes intracelulares

Em sistemas complexos como o leite e o queijo, a medida da atividade de um componente intracelular, denominado de marcador ou indicador, tem sido muito utilizado para se demonstrar a autólise (CROW et al., 1995). Os mais utilizados são os ácidos nucleicos (LAW et al., 1976; LANGSRUD et al., 1987; ØSTLIE et al., 1995b; BIE e SJÖSTRÖM, 1975a; FERNANDEZ-MURGA, 1994, 1995), lactato desidrogenase (LDH) (O'DONOVAN et al., 1996), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (LANGSRUD et al., 1987; WILKINSON et al., 1994; O'DONOVAN et al., 1996), frutose-1,6 bifosfato aldolase (FBA) (WILKINSON et al., 1994) e as aminopeptidases, X-prolil-dipeptidil-dipeptidases (PepX) (LANGSRUD et al., 1987; WILKINSON et al., 1994; BOUTROU et al., 1998 a,b; BUIST et al., 1998), prolina iminopeptidase (PIP) (LANGSRUD et al., 1987; ØSTLIE et al., 1995b), leucina e dipeptidil arginina (DAKO et al., 1995).

Os resultados desses estudos mostraram que a autólise celular levou à liberação progressiva do conteúdo citoplasmático no meio circundante e, com raras exceções, foi verificada uma concomitância entre o decréscimo da densidade óptica e atividade de enzimas citoplasmáticas (LANGSRUD et al., 1987; ØSTLIE et al., 1995b; MARTINEZ-CUESTA et al., 1997).

A princípio, DNA e RNA seriam ideais como marcadores, mas, vários autores constataram que essas moléculas, uma vez fora da célula, são rapidamente degradadas. FERNANDEZ-MURGA et al. (1994), observaram uma ampla liberação de ácidos nucleicos e proteínas intracelulares após 3 horas de incubação de *Lab. acidophilus* em tampão fosfato 0,1M a pH 6,5 e 7,8, no qual nenhuma variação veio a ser detectada por um período subsequente de 6 horas. Os autores concluíram que os ácidos nucleicos eram os mais apropriados para indicar o início da autólise, em decorrência de sua degradação progressiva após um período prolongado de incubação. Por sua vez LANGSRUD et al (1987), em um estudo sobre a seleção de linhagens autolíticas de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, enfatizou que a aminopeptidase PIP foi mais adequada para demonstrar a progressão da autólise.

Algumas pesquisas revelaram haver diferenças de atividade entre as enzimas, linhagens e substrato. Dentre os marcadores avaliados por LANGSRUD et al (1987) para *Lac. lactis* subsp. *lactis*, DNA, LDH e PIP, aquele que mais variou em

meios aquosos foi a LDH. Ao contrário, WILKINSON et al. (1994) verificaram que a LDH foi mais estável que a G6PDH e PepX para quatro linhagens de *Lac. cremoris* subsp. *cremoris*, após 48 horas de estocagem de um queijo "slurried" durante 7 dias a 4°C. ØSTLIE et al. (1995c), utilizando densidade óptica detectaram maior autólise para *Pro. freudenreichii* ISU-P59 em água que em tampão, enquanto para *Ped. acidipropionici* ISU P-9, que apresentou menor atividade, não houve diferenças entre os dois meios.

HUSSON-KAO et al. (1999) determinaram a autólise de *Srt. thermophilus* DN-001065 em leite pela densidade óptica e atividade da PepX. Para a medida da densidade óptica o leite foi clarificado. Em leite não tamponado, a autólise não foi evidenciada por nenhum desses métodos, o que foi atribuído à instabilidade da enzima a valores de pH abaixo de 4,0. Em leite tamponado, a atividade da Pep X pôde ser evidenciada somente no final da fase exponencial de desenvolvimento da cultura. Porém, em incubação prolongada a 42°C, quando o valor de pH situava-se abaixo de 5,1, houve instabilidade.

Um dos problemas apontado por vários pesquisadores foi a perda de atividade dos marcadores de autólise, devido aos seguintes fatores: instabilidade enzimática nas condições do estudo, degradação pela ação de proteinases, DNases, RNases, regulação do sistema enzimático durante a multiplicação celular (FERNANDEZ-MURGA et al., 1994; ØSTLIE et al., 1995b) e inibição da atividade pelo NaCl (WILKINSON et al., 1994a). Outro fator que afeta a eficácia deste método foi relacionado com os procedimentos utilizados para a preparação dos extratos aquosos de queijos.

Assim, a seleção do marcador enzimático é fundamental para a obtenção de resultados confiáveis. Segundo CROW et al., (1995), os marcadores devem apresentar as seguintes características: ser exclusivamente intracelular, ter atividade elevada ou estar presente em alta concentração, ser estável nos sistemas avaliados, como por exemplo, em queijo e nos procedimentos de extração para determinação da atividade, e não ter sensibilidade aos componentes do queijo e ao tampão utilizado nas etapas de extração. Além dessas características, as enzimas selecionadas devem apresentar funções importantes nas reações envolvidas na proteólise.

1.4.1.3 Observações microscópicas

As alterações morfológicas ocasionadas pela ruptura do peptidoglicano nas células bacterianas foram monitoradas diretamente no queijo por microscopia de contraste de fase (FERNÁNDEZ-MURGA et al., 1994, 1995) ou eletrônica de transmissão (KANG et al., 1988; LEPEUPLE et al., 1998a,b; VALENCE et al., 1998; HUSSON-KAO et al., 2000).

Células danificadas de *Lab. helveticus* foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão em um extrato de queijo Suíço com 22 dias de maturação, enquanto as células não líticas de *Prop. Freudenreichii* ITGP23 permaneceram sem alterações morfológicas nesse mesmo período (VALENCE et al., 1998). Ao avaliarem a autólise neste mesmo tipo de queijo, LEPEUPLE et al. (1998b) evidenciaram que somente 10% de células integrais de *Lac. lactis* subsp. *cremoris* AM2 foram visualizadas após 48 horas de processamento. As demais células apareciam como protoplastos ou apresentavam rupturas na membrana citoplasmática, com perda de parte de seu conteúdo citoplasmático.

O exame de *L. acidophilus* CRL 640 em microscópio de contraste de fase, após desenvolvimento durante 3 horas em tampão, não revelou nenhum tipo de alteração morfológica a 37°C, em decorrência da baixa atividade lítica. Já a 45°C, células granulosas e fantasmas eram evidentes. Os autores concluíram que, embora essas alterações morfológicas tivessem sido detectadas em um número elevado de células, nem todas se apresentavam alteradas, revelando vários graus de sensibilidade à autólise entre a população (FERNANDEZ-MURGA et al., 1994).

Como as técnicas microscópicas eram consideradas qualitativas e subjetivas, KANG et al. (1998) desenvolveram um estudo no sentido de estabelecer uma relação quantitativa entre a presença de células não lisadas e lisadas. Os resultados revelaram uma correspondência entre a degradação gradual da parede celular visualizada por microscopia eletrônica e a autólise estimada pela queda da densidade óptica de cultivos de *Lab. bulgaricus* UL12 e *Lab. casei* I2A e 137 em tampão NaCl 0,2M a 40°C.

BUNTHOF et al. (2001), trabalhando com fluorescência, buscavam um método que permitisse monitorar a permeabilização e a lise de *Lac. lactis* subsp. *lactis* MG1363 em queijo Gouda, a fim de dispensar os procedimentos para extração das amostras, evitando, desta forma, os danos celulares. Concluíram que este método foi adequado não somente para monitorar a desintegração completa da célula, como no caso dos métodos tradicionais para a medida da lise, mas também para visualizar a presença de células permeabilizadas, que poderiam ser significativas na maturação, uma vez que nesse estado as peptidases podem se difundir rapidamente para a matriz do queijo.

1.4.1.4 Formação de halos de lise em ágar

Este método, "in vitro", envolve os mesmos procedimentos normalmente utilizados para estudar as bacteriocinas. A atividade lítica é visualizada pela formação de halos de lise em ágar contendo um substrato adequado para a atividade (NISKASAARI, 1989; BUIST et al., 1995; ØSTLIE et al., 1995a). Diferenças de atividade autolítica foram detectadas na avaliação de 30 linhagens de *Lac. lactis* sp. que formaram zonas de hidrólise variando de 1 a 6mm de diâmetro em *Mic. luteus*. Um número elevado de culturas (26) apresentou zonas de hidrólise de 3mm de diâmetro. Contudo, quando 4 destas culturas foram avaliadas com células integrais e fração de lactococos como substrato, somente fracas zonas de hidrólise foram visualizadas (ØSTLIE et al., 1995a).

1.4.1.5 Zimogramas

A eletroforese em SDS-PAGE renaturante contendo um substrato adequado (zimograma) foi utilizada para demonstrar a atividade lítica, cuja determinação envolveu as seguintes etapas: 1) eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida suplementado com o substrato adequado para a ação das autolisinas; 2) incubação do gel em um tampão de renaturação em condições de temperatura e tempo adequados para a atividade das autolisinas, visualizada pela presença de bandas translúcidas no gel opaco (BUIST et al., 1995; RIEPI et al., 1997; LEPEUPLE et al., 1998). Além da fácil detecção, essa técnica permite ainda estabelecer o perfil

das autolisinas com relação ao número e peso molecular, constituindo-se, assim, em uma ferramenta auxiliar em procedimentos de identificação (LORTAL, 1997).

Devido à complexidade, o substrato para as autolisinas ainda não se encontra disponível na forma sintética. Portanto, são utilizadas células de *M. luteus* liofilizadas e autoclavadas, que apresentam alto nível de sensibilidade. Células integrais ou parede celular da própria espécie em teste também podem ser utilizadas, porém, apresentaram sensibilidade menor e forneceram halos fracos de hidrólise (BUIST et al., 1995; LEPEUPLE et al., 1998). Embora forneçam bandas de intensidade menor, células integrais foram consideradas mais adequadas que a fração da parede celular (ØSTLIE et al., 1995a; RIEPE et al., 1997).

Os perfis líficos de 22 culturas de lactococos examinados em zimogramas utilizando como substrato *Mic. luteus* revelaram a presença de 2 a 5 bandas de intensidades variáveis de 32 a 53KDa, estando uma delas, de 47KDa e com alta intensidade, presente em todas as culturas. Esta banda de 47KDa e mais duas de intensidade mais fraca, de 32 e 39KDa, foram detectadas com o substrato de células de *Lac. diacetylactis* INF-E2-6 em fase exponencial de desenvolvimento. Essas bandas aumentavam em intensidade com células na fase estacionária quando uma nova banda de 53KDa era formada (ØSTLIE et al., 1995a).

A análise dos zimogramas das culturas *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, CO e 2250, que apresentavam forte atividade autolítica, revelou número e intensidade de bandas líficas variáveis de acordo com o pH e especificidade ao substrato. Com *Mic. luteus*, a cultura CO revelou duas bandas de 48KDa e 56KDa, enquanto a cultura 2250 apresentou uma maior de 42KDa e uma série de bandas menores. Com suas próprias células como substrato, a cultura CO revelou duas bandas, de 45KDa e 48KDa. Essas mesmas bandas foram reveladas com a fração da parede celular dessa cultura, além de uma adicional de 30KDa. A discrepância nas intensidades das bandas foi atribuída às diferenças de especificidade aos substratos (RIEPE et al., 1997).

Posteriormente, a presença do gene da autolisina *AcmA*, que codifica uma N-acetilmuramidase do peptidoglicano de lactococos foi confirmada nas culturas CO e 2250 (BUIST et al., 1995; RIEPE et al., 1997). A deleção deste gene, revelado pela ausência da banda lífica de 42KDa na cultura 2250, resultou na perda

completa da autólise, mesmo após incubação prolongada em caldo M17 contendo concentração limitada de lactose (RIEPE et al., 1997).

Autolisinas de *Lab. helveticus* ISLC5 foram detectadas e parcialmente caracterizadas em zimogramas. Com o substrato *Mic. luteus* ou a própria cultura, foram detectadas uma banda de atividade lítica de 42,4KDa e outras 6 bandas restantes, com pesos moleculares similares, que variaram de 29,1 a 32,8KDa. Zimogramas de outras 30 linhagens de *Lab. helveticus* de várias origens geográficas revelaram perfis similares ao dessa cultura, em termos de número de bandas e peso molecular. Somente a intensidade das bandas variou, dependendo da linhagem (VALENCE e LORTAL, 1995).

LEPEUPLE et al. (1998a), compararam os perfis de autolisinas das culturas líticas *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 e MG1363, esta última apresentando a autolisina AcmA, e de uma cultura não autolítica, *Lac. lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. O perfil da cultura AM2 variou de acordo com o substrato utilizado. Três bandas de lise foram detectadas com *Lac. lactis* subsp. *lactis* e que não estavam presentes com o *Mic. luteus*, sendo detectada a autolisina AcmA, porém, em níveis mais baixos que aqueles da MG1363. Uma banda adicional de 46KDa, não encontrada em NCDO 763 e com características distintas da AcmA quanto à especificidade ao substrato, massa molecular, faixa de pH ótimo e sensibilidade a diferentes cátions divalentes, foi encontrada na cultura AM2 e identificada como uma lisina, codificada por um pequeno bacteriófago isomérico temperado denominado de ϕ AM2. Observações adicionais de que um mutante AM2 curado de seu profago exibia fraca atividade após um período de incubação prolongada em caldo M17 permitiu concluir que a autólise desta cultura também estava associada ao sistema lítico de um bacteriófago e que o mesmo poderia estar envolvido na autólise previamente detectada em vários tipos de queijos.

1.4.1.6 Detecção imunológica de marcadores de lise por “Immunoblotting”

Trata-se de uma técnica qualitativa que tem a vantagem de não ser dependente da atividade dos marcadores, detectados mesmo quando inativos ou parcialmente degradados na matriz do queijo. Além disso, a especificidade dos

anticorpos permite monitorar a autólise de uma determinada espécie em um sistema complexo como o queijo. A determinação envolve as seguintes etapas: a) eletroforese das amostras em condições denaturantes e em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); b) a eletro-transferência das proteínas contidas no gel para membranas de nitrocelulose ("Western-Blotting"), c) a reação com anticorpos espécie-específica ou o citosol integral da espécie estudada ("immunoblotting"); d) a revelação da reação imuno-enzimática pela ação da peroxidase. (BUIST et al., 1997; VALENCE et al., 1988).

Constatou-se na literatura que foram utilizados os seguintes anticorpos: dipeptidase (PepD) e lactato desidrogenase (D-LDH) de *Lab. helveticus* e coenzima metil malonil de *Prop. freudenreichii* (VALENCE et al., 1998), endopeptidas (PepO), tripeptidase (PepT) e AcmA de *Lac. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (BUIST et al., 1997), citosol de *Str. thermophilus* (DEUTSCH et al., 2002) e citosol de *Lac. lactis* (VALENCE et al., 1998).

VALENCE et al. (1998) utilizando o anticorpo PepD, de 53,4KDa, determinaram a autólise de *Lab. helveticus* em amostras de queijos comerciais, Emmental, Comté, Beaufort e Parmesão. Nos queijos Comté e Parmesão, a enzima foi claramente detectada, mostrando a ocorrência de autólise de *Lab. helveticus*. Nos queijos Beaufort e Emmental, foram detectados somente sinais fracos de reação imunológica correspondentes a um composto com peso molecular menor que a PepD, de 51KDa. Esses sinais foram atribuídos à reação cruzada com *Lab. lactis*, indicando a autólise dessa espécie nesses queijos.

PILLIGGE et al. (2002), utilizando o antisoro contra a AcmA (anti-AcmA) de *Lc. cremoris* 2250, não encontraram uma relação precisa entre os resultados obtidos por zimogramas e por "immunoblotting" para 10 de 16 linhagens de *Lac. Lactis* subsp. *cremoris*. Segundo os autores, as bandas que reagiram com o anti-AcmA e não correspondiam àquelas encontradas no zimograma, poderiam ser produtos não ativos formados pela hidrólise da AcmA ou uma proteína relacionada com a AcmA e não detectável no zimograma. Ao contrário, as bandas dos zimogramas não correspondentes às bandas de reação no "Immunoblotting" poderiam ter surgido pelas diferenças de sensibilidade entre os dois métodos, pela presença de uma proteína que havia perdido sua capacidade de reconhecer o anti-soro ou ainda devido à outras hidrolases imunologicamente distintas.

1.4.2 Fatores que influenciam a autólise

Segundo LORTAL et al. (1997) a autólise é um fenômeno complexo ainda não totalmente estabelecido. Os seguintes fatores podem influenciar a autólise: 1) intrínsecos: predisposição à autólise, estado fisiológico da célula (idade e as condições de injúria), composição da parede celular, presença de proteinases (LORTAL et al., 1997); 2) físico-químicos: temperatura, pH, Aa, fonte de carbono, temperatura, solventes orgânicos, detergentes, sal e outros cátions (OHMIYA e SATO, 1969; BIE e SJÖSTROM, 1975a, 1975b, 1975c; VEGARUD et al., 1983; LANGSRUD et al., 1987; FUGLSANG et al., 1995; LORTAL et al., 1997).

Estudos realizados em meios de cultivos e tampões revelaram que a predisposição à autólise é uma característica que varia muito entre as linhagens de uma mesma espécie, conforme constatado para *Propionibacterium* sp. (LEMÉE et al., 1994; ØSTLIE et al., 1995b), *Lac. lactis* sp. (LANGSRUD et al., 1987; CROW et al., 1995c; DAKO et al., 1995), *Lactobacillus* spp. (KANG et al., 1997; KANG et al., 1998). Segundo LEMÉE et al. (1995), essa aptidão é uma característica própria da linhagem num determinado ambiente e de acordo com LORTAL (1997), relaciona-se com a maior fragilidade da parede celular de determinadas linhagens. Distintos sistemas enzimáticos e possíveis variações no mecanismo de liberação das autolisinas (LANGSRUD et al., 1987), sistemas autolíticos distintos que afetariam o mecanismo de ativação das autolisinas e maior especificidade ao substrato de determinadas autolisinas (KANG et al., 1998) são várias hipóteses que procuram explicar esses resultados.

Segundo LORTAL et al. (1997), um dos fatores que mais influenciou na autólise de várias linhagens de lactobacilos termofílicos e de propionibactérias foi a fase de crescimento celular, tendo sido mais elevada em células que se encontravam entre as fases exponencial e estacionária de crescimento. Observações similares foram relatadas por FERNÁNDEZ-MURGA et al. (1994, 1995), que detectaram picos máximos de autólise para células de *Lab. acidophilus* CRL 640 no início da fase exponencial e na transição entre as fases exponencial e estacionária de crescimento. Resultados idênticos foram visualizados em zimogramas pelo aumento da intensidade das bandas das autolisinas do tipo B em *Lab. helveticus* ISLC5 (VALENCE e LORTAL, 1995). Um aumento da atividade da N-acetilmurimidase ao

longo da fase exponencial de *Lab. acidophilus* 63 AM Gasser foi constatada por COYETTE e GHUYSEN (1970, 1973).

A constatação de que células em fase exponencial de crescimento são as mais propensas à autólise ainda não foi esclarecida. A hipótese prevalecente é a de que ela poderia estar relacionada com a evolução da estrutura e composição química do peptidoglicano, onde os componentes seriam sintetizados a taxas não equivalentes (FERNÁNDEZ-MURGA et al., 1994; LORTAL, 1997; KANG et al., 1998). LORTAL et al. (1997), relatam que a proporção de ácidos teóicos presentes na parede celular de *Lab. acidophilus* varia de 17% na fase exponencial a 30% na fase estacionária de crescimento.

Além disso, outros fatores podem estar envolvidos, como, por exemplo, os diferentes sistemas de regulação da atividade, bem como concentração e natureza das autolisinas (FERNÁNDEZ-MURGA et al., 1994), além do transporte das autolisinas aos receptores específicos no peptidoglicano, devido à incapacidade de multiplicação e divisão celular na fase estacionária. Essas observações concordam com a hipótese prevalecente do envolvimento das autolisinas com a biossíntese da parede celular (COYETTE e GHUYSEN, 1970), bem como nas etapas de multiplicação e divisão celular (LORTAL et al., 1997; KANG et al., 1998).

A susceptibilidade de degradação das autolisinas por proteinases foi explicada por MARTINEZ-CUESTA et al. (1997) ao verificarem que uma linhagem de *Lac. lactis* subsp. *lactis* deficiente em proteinases apresentava menor taxa de autólise que sua cultura parente proteinase positiva (Pr⁺). BUIST et al., (1997) comprovaram a degradação da autolisina AcmA por uma proteinase do tipo PI de *Lac. lactis* subsp. *cremoris* MG1363, sendo a taxa de degradação dependente da especificidade, localização e quantidade de proteinase produzida. BUIST et al. (1998) mostraram que a AcmA foi degradada pela lactocepina ligada à célula e não por aquela secretada no leite.

Com variações entre as linhagens e condições estudadas, verifica-se na literatura que taxas máximas de autólise foram obtidas em temperaturas favoráveis ao desenvolvimento das linhagens (SANDHOLM e SARIM, 1981; MARTÍNEZ-CUESTA et al., 1997; HUSSON-KAO et al., 1999). A 5°C houve uma diminuição na autólise, conforme verificado para 9 de 14 culturas de lactococos (VEGARUD et al., 1983).

Segundo ØSTLIE et al. (1995b), essas observações reforçaram a importância de se selecionar culturas autolíticas, levando-se em consideração as condições encontradas no processamento de queijos.

RIEPE et al. (1997) observaram que o pH ótimo variou de acordo com a fase de desenvolvimento da cultura, tendo sido de 6,5 e 8,5 para células em fase exponencial e estacionária de crescimento, respectivamente. Além disso, FERNANDES-MURGA et al. (1994), verificaram que o pH ótimo era dependente do tipo de tampão utilizado. Segundo ØSTLIE et al. (1995b), o fato do *Prop. freudenreichii* ISU P-59 ter apresentado autólise máxima a pH 7,2 e 6,0 indicaria a atividade de pelo menos dois tipos de autolisinas nessa cultura.

Efeitos sinérgicos de determinados compostos na atividade de autolisinas, foram relatados por vários autores. São eles: NaCl (BIE e SJÖSTRÖM, 1975b; SANDHOLM e SARIM, 1981; VEGARUD et al., 1983; DAKO et al., 1995; KANG et al., 1998); 2) cátions monovalentes (Na^+ , K^+ e NH_4^+ e divalentes Cu^{+2} , Zn , Mn^{+2} , Co^{+2} (ØSTLIE et al., 1995c), CaCl_2 e EDTA (BIE e SJÖSTRÖM, 1975b); 3) etanol 2%, metanol 0,6% e clorofórmio 2% (HUSSON-KAO et al., 2000). Em contraposição, efeitos antagônicos foram verificados com o CaCl_2 (LORTAL et al., 1991) e com os cátions divalentes Mg^{+2} e Ca^{+2} (ØSTLIE et al., 1995c).

1.4.3 Efeito da autólise na proteólise de queijos

As autolisinas não influenciam diretamente a proteólise, mas sua ação tem sido reconhecida como essencial na maturação. Vários estudos revelaram que culturas autolíticas levaram a um aumento da proteólise e uma maior liberação de aminoácidos livres em determinadas variedades de queijos e, em alguns casos, à diminuição do amargor (CHAPOT-CHARTIER, 1994; WILKINSON et al., 1994a, 1994b; VALENCE et al., 1998; KIERNAN et al., 2000; SABOYA et al., 2002).

OHMIYA e SATO (1970) foram os primeiros autores a evidenciar a autólise de *Lab. helveticus* em queijos. Os autores detectaram DNA depois que células em fase estacionária de crescimento foram incubadas por 10 dias a 10°C e observaram um aumento na dosagem deste ácido até 25º dia. Células danificadas puderam ser visualizadas por microscopia eletrônica somente após 63 dias de incubação.

Depois, LAW et al. (1974,) reportaram a autólise de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* em queijo Cheddar, mensurada pelo decréscimo da viabilidade celular durante a maturação concomitante com a liberação de uma dipeptidase intracelular.

Em um outro estudo, BIRKELAND et al. (1992) constataram que queijos processados com *Lac. lactis* subsp. *lactis* e com uma linhagem mutante *Lac. lactis* subsp. *cremoris* lactose negativa e proteinase positiva (*Lac:Prt⁺*) apresentaram maior concentração de DNA, LDH e prolina aminopeptidase que aqueles obtidos com fermento láctico tradicional. Ambas as linhagens se autolisavam rapidamente nas condições de maturação do queijo, levando ao maior desenvolvimento da proteólise, que foi determinada pela medida das frações nitrogenadas.

Vários estudos foram realizados com *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2, uma cultura fortemente autolítica e lisogênica, sensível às temperaturas de processamento de queijo e não formadora de amargor. Na maioria desses estudos foi utilizado para comparação *Lc. lactis* subsp. *cremoris* HP, uma cultura não autolítica de crescimento rápido, tolerante às temperaturas e formadora de amargor e/ou culturas comerciais.

Em queijo Cheddar, foi detectada autólise das culturas AM2, HP uma cultura mista G11/C25 no extrato obtido por pressão hidráulica com 1 dia de processamento, obedecendo a seguinte ordem: AM2 > HP > mistura G11/C25, tanto pelo decréscimo da população viável quanto pela atividade da LDH, G6PDH e PepX. A proteólise medida pela liberação de aminoácidos livres também acompanhou essa tendência: AM2 > HP > mistura G11 e C25. Nenhuma relação pôde ser estabelecida entre as diferenças de atividade autolítica e a estabilidade e níveis de enzimas (WILKINSON et al., 1994b).

MORGAN et al., (1995) constataram uma menor população da cultura AM2 em queijo Cheddar, que diminuiu 500 vezes após 8 semanas de maturação, enquanto a de HP exibiu viabilidade típica, porém, com uma diminuição de 1 ciclo logarítmico após 8 semanas. Por outro lado, a população de um fermento comercial de desenvolvimento rápido e tolerante ao aquecimento aumentou em 85% e 40% respectivamente após 4 e 13 semanas. Os queijos com AM2 apresentaram maior atividade de enzimas intracelulares, enquanto àqueles com

HP, fraca atividade. A atividade da LDH e da G6PDH aumentou ao longo de 26 semanas de maturação, enquanto a da PepX diminuiu.

Resultados similares foram obtidos por O'DONOVAN et al. (1996) que avaliaram as mesmas culturas nesse mesmo tipo de queijo. Após 10 semanas de maturação, as reduções da população foram: 99% para AM2, 93% para HP e 55% para 303. Atividades elevadas de LDH, G6PDH e PPDA foram detectadas ao longo da maturação, tendo sido maior nos queijos com AM2. A proteólise mensurada pelos teores de nitrogênio total solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6) e de aminoácidos livres aumentou em todos os queijos, sendo mais rápida naqueles com AM2.

Em queijo Saint-Paulin, o decréscimo da população de AM2 foi verificada na primeira semana de maturação e confirmada por microscopia eletrônica e pela atividade de uma aminopeptidase de especificidade ampla e da PepX. A atividade destas enzimas alcançou atividade máxima após 20 dias de maturação. Em queijos com HP, um número elevado de células intactas ainda era evidente após 3 meses e nenhuma atividade enzimática pôde ser visualizada durante as 3 primeiras semanas de maturação. A alta susceptibilidade à lise da cultura AM2 foi relacionada com a maior concentração de aminoácidos livres nos queijos (CHAPOT-CHARTIER et al., 1994).

Quando a linhagem AM2 foi comparada com uma variante curada de seu profago AM2-C, houve uma redução de células viáveis de 4 e 1,5 ciclos logarítmicos respectivamente. Isso ocorreu após 14 dias de maturação do queijo Saint-Paulin, sendo que após 42 dias somente 10% de células de AM2 e 75% de AM2-C ainda permaneciam intactas. Maior desenvolvimento de proteólise ocorreu em queijos com AM2 e pôde ser relacionada com a maior atividade da PepX. Os autores concluíram que a autólise de lactococos aumentou a proteólise de queijos e, conseqüentemente, a formação de aminoácidos livres, diminuindo o amargor (LEPEUPLE et al., 1998b).

SABOYA et al. (2002) avaliaram o comportamento das culturas AM2 e AM2-C na fabricação de queijo Minas Frescal obtido pelos processos tradicional e de ultrafiltração (UF) a partir de leite microfiltrado. Verificaram uma grande diferença entre os queijos obtidos por ambos processos, o que indicou que a autólise diferia em função da tecnologia de fabricação. Em tecnologia tradicional, a AM2

mostrou-se fortemente autolítica, não tendo impacto na proteólise. Ao contrário a AM2-C apresentou pequena taxa de autólise e um grande impacto na proteólise. No processo UF, as duas linhagens se comportaram de forma parecida, tendo sido detectado apenas sinais fracos de lise por "Immunoblotting". As culturas apresentaram comportamentos similares em termos de proteólise. Esses mesmos resultados foram verificados em queijos Saint-Paulin e em queijos UF comerciais. Os autores aventaram a hipótese da fraca lise da cultura autolítica se dever a componentes existentes no retentado de UF, como o lactato de cálcio concentrado.

O efeito de *Lac. lactis* subsp. *cremoris* 2250, cultura que apresenta a autolisina *AcmA*, foi avaliado na proteólise do queijo Cheddar e comparado com uma cultura variante que teve o gene *acmA* deletado ($2250\Delta acmA$) e com uma mistura de ambas as culturas. Após 24 horas de processamento a autólise, determinada pela atividade da frutose-1,6 bifosfato aldolase (FBA), foi um pouco menor para a $2250\Delta acmA$. Um aumento moderado da atividade da FBA foi verificado em todos os lotes de queijos e um pequeno aumento da população de $2250\Delta acm$ comparativamente à cultura tipo 2250 foi observado após 18 dias. De acordo com os autores, estes resultados diferiram daqueles observados para as mesmas culturas em caldo e em leite, tendo-se concluído que um outro fator, além da *AcmA*, poderia estar relacionado com a forte atividade autolítica desta cultura (PILLIDGE et al., 1998).

A influência da autólise de lactobacilos mesófilos e de *Lab. helveticus* DPC4571 na proteólise de queijo Cheddar foi avaliada por KIERNAN et al. (2000). Durante a maturação, a população de lactobacilos mesofílicos manteve-se elevada em todos os queijos, não sendo detectada atividade dos marcadores de autólise desidrogenase D-lactato (D-LDH), prolinase e aminopeptidase prolina específica de lactobacilos, utilizada para diferenciação da lise a partir dos lactococos. Nos queijos com a cultura termofílica DPC4571, a D-LDH e a aminopeptidase prolina estavam presentes e os índices de proteólise aumentaram. Os autores concluíram que, ao contrário dos lactobacilos mesófilos, o *Lab. helveticus* DPC4571 sofreu autólise e a conseqüente liberação de peptidases influenciou na proteólise. Esses marcadores enzimáticos de autólise também foram detectados em queijos comerciais processados com *Lab. helveticus* DPC4571, os

quais apresentavam, inclusive, um melhor "flavour". Esses resultados sugeriram uma correlação positiva entre a lise desta espécie e o aumento da proteólise e intensidade de "flavour".

Diferentes taxas de autólise foram detectadas para as linhagens de *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, principalmente no início da maturação de um tipo de queijo semiduro. A autólise foi mais rápida para a cultura RD 248, onde houve uma diminuição de 78% da população viável após 2 dias de maturação. Para as cultura AM2 e RD1, a diminuição da população coincidiu com os picos de atividade da PepX. A ausência desta aminopeptidase nos queijos com as linhagens RD 226 e RD 232 foi relacionada à fraca atividade proteolítica destas culturas (BOUTROU et al., 1998a).

A autólise de *Lab. helveticus* ITGLH77 e *Prop. freundenreichii* ITGP23 foi determinada durante a maturação de queijo Suíço processado com leite microfiltrado termizado. Houve uma redução de 99,9% da população de *Lab. helveticus* ITGLH77, concomitante à detecção da dipeptidase PepD nos extratos dos queijos. A análise por microscopia eletrônica revelou a presença de células fantasmas. Ao contrário, *Prop. freundenreichii* ITGP23 multiplicou-se, não sendo detectada perda de viabilidade. A enzima metil malonil coenzima A mutase (MMCoA), específica de *Prop. freundenreichii*, foi detectada somente no final da maturação, demonstrando que a autólise havia sido limitada. A comparação do perfil de proteínas por SDS-PAGE dos extratos aquosos dos queijos, do citoplasma das culturas e do leite, revelou um aumento do número de bandas nos extratos de queijos, principalmente daquelas com peso molecular superior a 30KDa, não detectadas no leite, sendo, portanto, associadas às células bacterianas (VALENCE et al., 1998).

1.4.4 Controle da atividade das autolisinas

Sendo a autólise uma característica essencial na ocorrência da proteólise de uma variedade de queijos e dependente da linhagem, sistemas têm sido desenvolvidos para a indução da atividade das autolisinas, após a formação de ácido láctico, a fim de acelerar a maturação e/ou intensificar o "flavour" de

queijos. Segundo GASSON (1996), a construção de linhagens apresentando um sistema de autólise induzível seria uma das alternativas mais interessantes para os sistemas líticos das bactérias lácticas. BUIST et al. (1995b), clonaram e seqüenciaram o gene *AcmA* da autolisina de *Lact. lactis* subsp. *cremoris* MG1363. A partir de então, alguns sistemas têm sido desenvolvidos, explorando a indução do gene super-expressado da autolisina *AcmA* por um fator ambiental, como por exemplo a temperatura (BUIST et al., 1997) ou um composto de grau alimentar (nisina) (DE RUYTERS et al., 1997), fornecendo sistemas naturais que poderiam ser utilizados para acelerar a maturação do queijo. Outros indutores como NaCl ou pH são promissores no controle de genes líticos durante a maturação e poderiam ser explorados (GASSON, 1996).

Embora esses sistemas que utilizam tecnologia de DNA recombinante de grau alimentar tenham sido desenvolvidos e duas patentes depositadas (GASSON, 1994; BUIST et al., 1995), existe o problema da barreira legal do uso de microrganismos geneticamente modificados (OGM). Assim, a seleção de linhagens com fenótipo autolítico interessante nas condições de maturação do queijo seria uma alternativa simples e de baixo custo (PILLIDGE et al., 1998). Contudo, os métodos de seleção disponíveis até o momento não permitem prever o comportamento autolítico de uma linhagem nas mesmas condições existentes da maturação. Além disso, a necessidade de validação posterior em queijos ou em coágulos demanda tempo, é custosa e somente um número reduzido de culturas poderia ser avaliada.

A utilização de culturas produtoras de bacteriocinas junto com culturas autolíticas foi sugerida por MORGAN et al., (1997), que evidenciaram de forma muito interessante que a autolisina *Acm* foi necessária para a lise de células de *Lac. lactis* sp. em presença da nisina. A nisina por si só ocasionou danos celulares que levou à degradação descontrolada da parede celular pela *AcmA* (MARTÍNEZ-CUESTA, al., 2000). Alternativamente, a utilização de células atenuadas por aquecimento ou por congelamento, procedimentos que danificam as vias metabólicas envolvidas na acidificação sem, contudo, inibir as atividades de todas as enzimas citoplasmáticas nem danificar as autolisinas (KLEIN-IBLED, 1999). Desta maneira, culturas atenuadas poderiam ser utilizadas como substratos ("enzymes bags") para as autolisinas liberadas pelas linhagens autolíticas.

2 OBJETIVOS

Considerando-se a importância econômica do queijo Prato, que apresenta um perfil de maturação predominado pela proteólise, e a escassez de dados a respeito deste assunto, buscou-se, neste estudo, aprofundar os conhecimentos sobre a influência da autólise da microbiota láctica na proteólise e, conseqüentemente, no desenvolvimento dos atributos sensoriais e de textura deste tipo de queijo. As informações procedentes deste estudo são de suma importância para o desenvolvimento de novas alternativas tecnológicas que conduzam a uma maior uniformização, bem como ao aprimoramento da qualidade do queijo Prato.

Assim, a presente pesquisa foi conduzida com os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar os principais gêneros de bactérias lácticas envolvidas na maturação de queijo Prato de quatro regiões brasileiras;
2. Determinar a autólise bacteriana e quantificar a proteólise e os produtos de sua degradação durante o período de maturação dos queijos;
3. Verificar o efeito da autólise nos atributos sensoriais e no perfil de textura dos queijos;
4. Estudar as variações existentes na relação autólise da microbiota láctica e desenvolvimento da proteólise entre queijos Prato de diferentes origens.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Foi analisado queijo Prato variedade Lanche processado em maio de 2001 em quatro laticínios brasileiros localizados em Santa Catarina (Queijo A), Goiás (Queijo B), São Paulo (Queijo C) e Minas Gerais (Queijo D). Aproximadamente 40 peças de queijo de cada laticínio, recém processados e provenientes de um mesmo lote, foram transportadas para o Centro de Tecnologia de Laticínios, TECNOLAT – ITAL, Campinas, SP. e armazenadas em câmaras a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 45 dias.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Procedimentos de maturação e de amostragem

Em diferentes períodos de estocagem (5, 15, 25, 35, 45 dias), 3 peças de queijo de cada laticínio eram retiradas da câmara de maturação e submetidas aos procedimentos de amostragem. Asepticamente, cada peça de queijo foi dividida em 3 fatias de aproximadamente 30mm de espessura, das quais foram retiradas amostras para os estudos da microbiota e da atividade enzimática com o auxílio de um saca amostra estéril. As amostras foram colocadas em sacos plásticos estéreis e homogeneizadas manualmente (amostra composta). As partes remanescentes dos queijos foram trituradas em processador 2084 (WALITA), fracionadas e reservadas para análises. Uma das frações foi armazenada a -20°C até a realização das análises físico-químicas, enquanto a outra foi liofilizada para a determinação da hidrólise das proteínas.

3.2.2 Evolução quantitativa da microbiota durante a maturação

A evolução dos diferentes grupos de bactérias lácticas, relacionados no Quadro 2, foi avaliada nos queijos com 5, 15, 25, 35, 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$. Porções de 25g das amostras compostas de queijo (3.2.1) foram homogeneizadas com 225mL de citrato de sódio 2%, previamente aquecido a $40-45^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos em Stomacher (Lab-Blender 400). As diluições seriadas obtidas a partir de 1mL deste homogeneizado em solução aquosa de peptona 0,1% foram semeadas ($100\mu\text{L}$) por espalhamento na superfície dos meios de cultivos. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (Gaspak, BBL, Cockeysville, MD) nas condições de tempo e temperatura referidas no Quadro 3. A atmosfera de anaerobiose foi gerada com AnaeroGen (Oxoid) (FRANK et al., 1992). As determinações foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos em unidades logarítmicas das unidades formadoras de colônias por grama de queijo (UFCg^{-1}).

3.2.3 Determinação dos gêneros envolvidos na maturação dos queijos

Os gêneros envolvidos na maturação dos queijos A, B, C e D foram determinados por meio da caracterização morfológica e fenotípica das colônias isoladas.

3.2.3.1 Isolamento e manutenção das culturas

Após as enumerações, aproximadamente 10 colônias foram selecionadas de forma aleatória a partir de cada um dos meios de cultivo, transferidas para caldo LPTG (RAIBAUD et al., 1961) e incubadas em temperaturas apropriadas a cada grupo bacteriano (Quadro 2) durante 48 horas. Essas culturas foram purificadas por meio de sub-cultivos em ágar LPTG e submetidas à identificação ao nível de gênero. As culturas puras foram mantidas -80°C em caldo LPTG suplementado com 15% (v/v) de glicerol.

3.2.3.2 Caracterização morfológica e produção de catalase

A morfologia foi determinada em ágar LAPTG pela observação das colônias formadas em microscópio de contraste de fase (Zeiss, Alemanha). Para o agrupamento em Gram, foi utilizado o método do KOH, misturando-se uma porção de colônias com solução aquosa de KOH 3% (p/v) em uma lâmina de vidro. A formação de um gel viscoso indicou a presença de microrganismos Gram-negativos (ANTONSSON et al., 2001). A atividade da catalase foi determinada misturando-se uma porção da colônia com peróxido de hidrogênio 3% (v/v) em uma lâmina de vidro. A formação de efervescência, causada pela liberação de oxigênio livre como bolhas de gás, indicou a produção de catalase pelo microrganismo (HARRIGAN e McCANCE, 1976).

QUADRO 2 - Meios de cultura e condições de cultivos utilizados para os grupos de bactérias lácticas.

Grupo	Meio de cultivo	Condição	Referência
Lactococos	Ágar M17(Difco)	35°C/48 h	THERZAGHI e SANDINE, 1975
Leuconostoc	Ágar MSE	25°C/72 h	MAYEUX et al, 1962
Enterococos	Ágar KF (Oxoid)	44°C/24h	FRANK et al., 1992
Estreptococos	Ágar M17 (Difco)	42°C/48h	THERZAGHI e SANDINE, 1975
Fermentadores de citrato	Ágar Citrato	30°C/48 h	HARRIGAN e MCCANCE, 1976
Fermentadores de lactato	Ágar Lactato de sódio	25°C/6dias	MAUK et al., 1968
Lactobacilos mesofílicos	Ágar Acetato pH 5,6	30°C/3 a 5d	HARRIGAN e McCANCE, 1976
Lactobacilos termofílicos	Ágar Rogosa pH 5,5 (Difco)	42°C/72h	ROGOSA et al., 1951

2.2.3.3 Determinações das características fenotípicas

As culturas que se apresentaram como Gram-positivas e não produtoras de catalase tiveram suas características fenotípicas (capacidade de multiplicação a 10 e 45°C, em 6,5 e 18% de cloreto de sódio e em pH 4,4 e 9,6) e bioquímicas (metabolismo da glicose, capacidade de reduzir nitratos e produção de CO₂ a partir do gluconato) determinadas para identificação ao nível de gênero.

3.2.3.3.1 Obtenção da suspensão celular

As suspensões de células foram obtidas semeando-se as culturas por esgotamento em ágar MRS contido em placas de Petri, posteriormente incubadas em temperaturas específicas à cada grupo bacteriano (Quadro 2) durante 16-18 horas. Após este período, uma porção de massa de células foi suspensa em 1mL de solução fisiológica, e transferida para um tubo contendo 10mL da mesma solução, em quantidade suficiente para se alcançar uma densidade igual à escala de McFarland número 5.

3.2.3.3.2 Capacidade de multiplicação a 10 e 45°C, em 6,5 e 18% NaCl e em pH 4,4 e 9,6

Foram utilizadas placas de micro-titulação contendo, em cada poço, 180 μ L de meio de glicose extrato de levedura e extrato de carne adequado à cada teste e suplementado com 0,2gL⁻¹ de púrpura de bromo-cresol. Alíquotas de 20 μ L da suspensão celular (3.2.2.3.1) foram inoculadas nos meios correspondentes e as placas incubadas nas condições do teste ou naquela descrita para cada grupo bacteriano (Quadro 2) durante 7 dias. O crescimento das culturas foi observado pela alteração da coloração do meio de cultivo (HARRIGAN e MCCANCE, 1976).

3.2.3.3.3 Metabolismo da glicose

O metabolismo fermentativo ou oxidativo da glicose foi determinado em caldo MRS com 5,0% de glicose (ELORTONDO et al., 1998), com a omissão de citrato de tri-amônio (LEISNER et al., 2001). Alíquotas de 1% da suspensão celular (3.2.2.3.1) foram transferidas para tubos contendo 5mL de meio e tubos de Durham, que a seguir foram incubados nas condições descritas para cada grupo bacteriano (Quadro 2) durante 7 dias. Após este período, a formação de gás no interior dos tubos de Durham indicava o metabolismo heterofermentativo, enquanto a ausência, o homofermentativo (HARRIGAN e McCANCE, 1976).

3.2.3.3.4 Capacidade de reduzir o nitrato

A capacidade da cultura em reduzir o nitrato no meio à nitrito foi determinada em caldo nitrato peptona, segundo HARRIGAN e McCANCE (1976). Alíquotas de 1% da suspensão celular (3.2.2.3.1) foram transferidas para tubos contendo 5mL e tubos de Durham, que a seguir foram incubados na condição descrita para cada grupo bacteriano (Quadro 2) durante 7 dias. Após este período, foi adicionado 1mL de cada um dos reagentes 1 e 2 de "Griess-Ilosvay's". A formação de coloração vermelha em alguns minutos indicou a presença de nitrito, enquanto o controle manteve-se inalterado. O resultado negativo foi confirmado adicionando-se uma porção de zinco em pó ao cultivo para reduzir o nitrato ainda presente.

3.2.3.3.5 Produção de CO₂ a partir do gluconato

A capacidade da cultura em produzir CO₂ a partir do gluconato foi determinada em caldo MRS contendo gluconato (40gL⁻¹) em vez da glicose, segundo HARRIGAN e McCANCE (1976). Alíquota de 1% da suspensão celular (3.2.2.3.1) foi inoculada em 5mL de meio contido em tubos, incubando-os na temperatura descrita para cada grupo bacteriano (Quadro 2) durante 7 dias. Após este período, foi adicionado 1mL de reagente de "Benedict's" a cada cultivo, que foi imediatamente submetido a tratamento em água fervente durante 10 minutos. A formação de um precipitado de coloração amarelo-marrom após o tratamento ou indicou a utilização do gluconato pelo microrganismo.

3.2.4 Determinação da lise celular durante a maturação

A ocorrência de autólise foi determinada nos queijos A, B, C e D com 5, 15, 25, 35, 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$ pela atividade de aminopeptidases e dipeptidil-aminopeptidases e pela detecção da atividade de autolisinas livres por zimogramas e de marcadores imunológicos por "Immunoblotting".

3.2.4.1 Obtenção do extrato aquoso do queijo

Os extratos aquosos dos queijos foram obtidos homogeneizando-se manualmente 4,5g das amostras em 20mL de água deionizada estéril em um saco plástico estéril contendo filtro (Humeau, França). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes, filtrados em membranas de $0,42\mu\text{m}$ (SARTORIUS F-91 127, Palaiseau, França) e mantidos a -20°C até sua utilização (VALENCE e LORTAL, 1998).

A concentração de proteínas nos extratos aquosos dos queijos (3.2.4.1) foi determinada pela dosagem do biureto (LOWRY et al., 1951), utilizando-se o kit nº 690 (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). A absorbância da mistura foi medida a 725nm e a concentração de proteínas (mgmL^{-1}) determinada a partir da comparação dos dados com uma curva padrão de albumina bovina (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA).

3.2.4.2 Determinação da atividade de aminopeptidases dipeptidil-aminopeptidases

A atividade das aminopeptidases e dipeptidil-aminopeptidases foi determinada pela extensão de hidrólise dos substratos cromogênicos relacionados no Quadro 3, segundo RONCARI e ZUBER (1969). A mistura de reação era composta de 0,1mL de extrato aquoso de queijo (3.2.4.1), 0,1mL do substrato 16,4mM em metanol e 2,8mL de tampão fosfato de potássio 0,01M pH 6,5. Após incubação a 37°C durante 4 horas, foi adicionado 0,5mL de ácido acético glacial 30% (v/v) para bloquear a reação e a absorbância mensurada a 410nm. A unidade da atividade

enzimática foi arbitrariamente definida como a variação de 0,01 unidade de absorvância em 1 minuto (0,01U.min⁻¹), nas condições realizadas. A unidade de atividade específica foi definida pela relação entre o número de unidades da atividade enzimática por miligrama de proteína no extrato enzimático (0,01U.min⁻¹.mg de proteína⁻¹).

QUADRO 3 - Substratos cromogênicos utilizados para avaliação da atividade de aminopeptidases e dipeptidil-aminopeptidases nos queijos Prato A, B, C e D durante a estocagem a 12±2°C.

Aminopeptidase	Substrato	Referência
PepA	Glutamina (Glu- ρ -NA) ¹	BACON et al., 1991
PepG	Alanina (Ala- ρ -NA)	KLEIN et al., 1997
PepI	Prolina (Pro- ρ -NA)	BAANKREIS, 1992
PepN	Arginina (Arg- ρ -NA)	GOBBETI et al., 1996
	Lisina (Lis- ρ -Na)	GOBBETI et al., 1996
PepQ	Leucina (Leu- ρ -Na)	GOBBETI et al., 1996
PepX	Glicina (Gli- ρ -NA)	ZEVACO et al., 1990
	Glicina-prolina (Gli-pro- ρ -NA)	ZEVACO et al., 1990
PCP	Ácido-piro-glutâmico (Piro-glut- ρ -NA)	ZEVACO et al., 1990

¹ - ρ -NA: - ρ -nitroanilida

3.2.4.3 Detecção da atividade de autolisinas por zimogramas

A presença de autolisinas livres nos extratos dos queijos A, B, C e D com 5, 15, 25, 35, 45 dias de estocagem a 12±2°C foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamina em condições denaturantes (SDS-PAGE) [gel de separação a 14%, pH 8,8 contendo 0,2% (p/v) de células de *M. luteus* liofilizadas e gel de concentração a 4%] durante 1 hora sob voltagem constante de 180V e à temperatura ambiente (aproximadamente 30°C), utilizando-se uma unidade vertical Protean II (BIO-RAD), segundo VALENCE e LORTAL (1995).

Os géis foram lavados durante 30 minutos em água destilada com agitação e temperatura ambiente para eliminação do SDS e incubados durante 16 horas em tampão Tris-HCl 50mM contendo Triton X-100 1,0% (v/v), com agitação suave, em uma câmara de hibridização HB-1D (Techne, USA) para favorecer a renaturação da enzima. Três condições de renaturação foram avaliadas: 1) pH 8,0 e 44°C; 2) pH 7,4

e 44°C; 3) pH 6,8 e 42°C. Após a renaturação, os géis foram corados em solução de azul de metileno 0,1% (p/v) acrescida de hidróxido de potássio 0,001% (p/v) e lavados extensivamente em água destilada. A atividade das autolisinas foi visualizada como bandas translúcidas no gel opaco.

As amostras para eletroforese foram preparadas misturando-se os extratos de queijos (2.2.4.1) com tampão de Laemmli 1:3 (v/v) (Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, SDS 2%, DL-dihiothreito-DTT 20mM, glicerol 40% p/v, azul de bromofenol 0.01%) e aquecidas em água fervente durante 2 minutos. Uma alíquota de 10µL de um padrão de proteína pré-colorida 94749 (Biorad) foi aplicada ao gel para determinação da massa molecular das autolisinas.

3.2.4.4 Detecção de marcadores de lise por "immunoblotting"

Para a detecção de marcadores de lise por "immunoblotting", foram utilizados os anticorpos específicos contra proteínas intracelulares de *Lactococcus* sp. (anti Lc-citosol) e contra a lactato desidrogenase D (D-LDH) de *Lab. helveticus* (anti-D-LDH), denominados de AC1. Para a revelação da reação imunoenzimática foi utilizado o anticorpo conjugado à peroxidase IgG (H+I)-HRP (BIO-RAD), denominado de AC2, juntamente com a DAB (3,3`diaminobenzidiazol tetrahydroclorina (Amresco, Sólon, EUA), segundo VALENCE et al. (1998).

Os extratos aquosos dos queijos (3.2.4.1) foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme o item 4.2.3.3, não sendo, neste caso, adicionado células de *M. luteus*. Após a migração durante 1 hora sob voltagem constante de 180V e temperatura ambiente (aproximadamente 30°C), os géis foram rapidamente lavados em água destilada e incubados na solução de transferência (Tris-base 48mM, glicina 39mM, SDS 1,3M em solução de metanol a 20% v/v) durante 10 minutos.

A eletrotransferência do conteúdo protéico dos géis para a membrana de nitrocelulose 0,45µm (MILLIPORE F-78051, St. Quentin-em-Yvelines, França) foi realizada por "Western-Blotting", conforme a Figura 5, utilizando-se o sistema Trans-blot Cell (Biorad) nas condições de amperagem constante de 250mA durante uma hora e quinze minutos e solução de transferência. Após este período, a membrana

foi recuperada e incubada durante 10 minutos em solução de vermelho de Ponceau 0,2% em ácido tricloroacético (TCA) 0,8% para a visualização da eletrotransferência. O excesso de corante foi eliminado lavando-se a membrana cuidadosamente em água destilada e em solução de PBS-Tween [Tween 0,05% em solução de PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, KH₂PO₄ 1,5mM, Na₂HPO₄.2H₂O 8,1mM)] durante 10 minutos por duas vezes consecutivas e mais uma vez na solução de PBS diluída 1:10 durante 10 minutos.

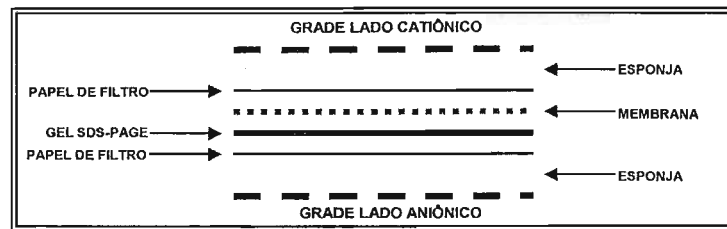


Figura 5 - Montagem do sistema de "Western-Blotting" para a transferência de proteína para a membrana de nitrocelulose.

O bloqueio dos sítios específicos foi efetuado incubando-se a membrana em albumina de soro bovino (SIGMA) 1% p/v em solução de PBS diluída 1:10, sob agitação suave seguida de três lavagens sucessivas de 10 minutos cada em PBS-Tween. A seguir, a membrana foi incubada em solução PBS-Tween contendo o anticorpo AC1 (anti LC-citosol ou anti D-LDH), diluído a 1/2500 durante 1 hora e temperatura ambiente, sob agitação suave. Após este período, as membranas foram lavadas por três vezes consecutivas de 10 minutos cada em PBS-Tween e incubadas em PBS-Tween contendo o anticorpo AC2 diluído a 1/2500 durante 1 hora, sob agitação suave.

A membrana foi novamente lavada por 3 vezes consecutivas de 10 minutos cada em PBS-Tween e mais uma vez em PBS 1:10 por 10 minutos. A revelação imuno-enzimática (Figura 6) foi realizada incubando-se a membrana em solução 1:1 de DAB (3,3' diaminobenzidina tetraclorido) (50mgmL⁻¹ em Tris 50mM pH 7,2) e de H₂O₂ (20µL em 50mL de água destilada), misturadas no momento do uso. A reação foi bloqueada, lavando-se abundantemente a membrana em água destilada.

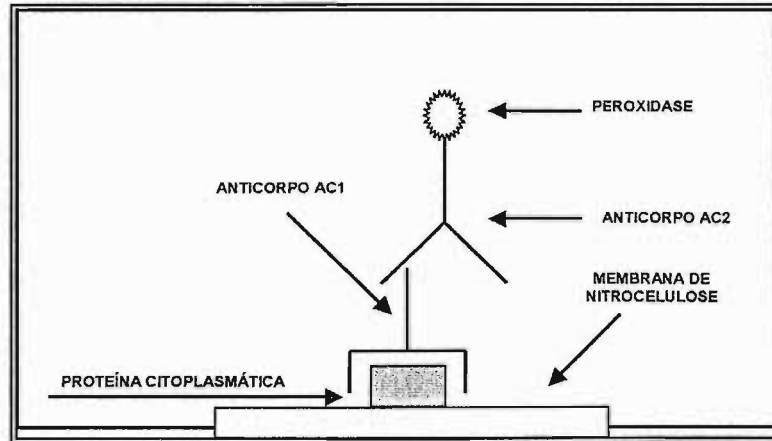


Figura 6 - Ilustração esquemática da reação imunológica para a visualização de proteínas específicas.

3.2.5 Determinação das propriedades físico-químicas dos queijos

As propriedades físico-químicas dos queijos A, B, C e D com 5, 15, 25, 35, 45 dias de estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$ foram determinadas por meio de análises físico-químicas descritas a seguir. As análises foram feitas em triplicata. Uma vez que o teor de gordura não apresenta variações significativas, este parâmetro foi determinado somente nos queijos com 5 dias de maturação.

pH: Determinado segundo LANARA (1981), em potenciômetro digital B375 (MICRONAL).

Lactose: Determinado segundo o método fenol-sulfúrico (ACTON, 1977).

Atividade de água (Aa): Calculada a partir dos parâmetros físicos-químicos de acordo com MARCOS (1993) pela fórmula (a):

$$(a) Aa = [0,9450 - 0,0059 (\text{NaCl}) - 0,0056 (\text{NNP}) - 0,0019 (\text{cinzas}) - (\text{NaCl}) + 0,0105 (\text{pH})]$$

Sal: Determinado pelo método de SERRES et al. (1973), titulando-se o excesso de nitrato de prata com tiocianato de potássio, e foi expresso em cloretos.

Cinzas: Determinado após incineração em mufla a 550°C (HORWITZ, 1975).

Umidade e extrato seco total (EST): Determinada pelo método de secagem da amostra até peso constante em estufa a 102±2°C e o extrato seco total (EST) foi calculado pela diferença (a) (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1982):

$$(a) \text{ EST} = 100 - \text{umidade}$$

Gordura e Gordura no extrato seco total (GES): Determinada pelo método de Gerber-van-Gulik (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) e o teor de gordura no extrato seco total (EST) foi calculado pela fórmula (a):

$$(a) \text{ GES} = \text{gordura (\%)} / \text{EST (\%)}, \text{ onde GES: gordura no extrato seco total}$$

Teor de proteína total: Calculado multiplicando-se o teor nitrogênio total (NT) pelo fator 6,38. O NT foi determinado no extrato de queijo pelo método micro-KJELDAHL (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1962, 1964).

2.2.6. Evolução da proteólise durante a maturação

A evolução da proteólise foi monitorada nos queijos A, B, C e D com 5, 15, 25, 35, 45 dias de estocagem a 12±2°C, calculando-se os índices de maturação a partir dos teores de nitrogênio (WOLFSCHOON-POMBO, 1983) e pela determinação do teor de tirosina (VAKARELIS e PRICE, 1959).

3.2.6.1 Determinação dos índices de maturação

Os índices da maturação foram obtidos em função dos teores de nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6, (NS-pH4,6) e do nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% (TCA 12%) ou nitrogênio não protéico (NNP) relacionados pelas

fórmulas (a) e (b), respectivamente (VAKALERIS e PRICE, 1959; WOLFSCHOON-POMBO, 1983, 1989):

$$(a) IEM = (NS-pH4,6/NT) \times 100$$

$$(b) IPM = (NNP/NT) \times 100$$

Os teores de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, (NS-pH4,6) e nitrogênio não protéico foram determinadas pelo método micro-KJELDAHL (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1962, 1964) nos seguintes extratos:

Nitrogênio total (NT): Determinado no extrato de queijo, que foi preparado homogeneizando-se 10g de queijo com citrato de sódio 0,5M até 200mL, conforme metodologia descrita por GRIPON et al. (1975).

Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6): Determinado no sobrenadante resultante da precipitação isoelétrica das caseínas no extrato de queijo com HCl 1,41N (VAKALERIS e PRICE, 1959).

Nitrogênio não protéico (NNP): Determinado no sobrenadante resultante da precipitação das proteínas no extrato de queijo em presença de 12% de TCA (ASCHAFFENBURG e DREWRU, 1959).

3.2.6.2 Determinação do teor de tirosina

O teor de tirosina foi determinado na fração de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6) pelo método espectrofotométrico descrito por VAKARELIS e PRICE (1959). Após a leitura espectrofotométrica a 270 e 290nm, a concentração de tirosina (Tir) foi calculada usando-se as fórmulas (a) e (b):

$$(a) Tir (mM/L) = (0,95 \times A_{270} - 1,31 \times A_{290}) \times 2$$

$$(b) Tir (mg/100g de queijo) = mM/L \times 453$$

3.2.7 Avaliação da hidrólise das caseínas por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida URÉIA-PAGE

As amostras para eletroforese foram preparadas dissolvendo-se 20mg de queijos liofilizado em 1mL de tampão (1,5g de tris hidroximetil aminometano-TRIS, 98g de uréia, 0,8mL de ácido clorídrico concentrado, 1,4mL de 2-mercaptoetanol, 0,3g de azul de bromofenol, para um volume final de 200mL com água destilada) com aquecimento a 40°C durante uma hora.

A hidrólise das proteínas foi analisada nos extratos aquosos dos queijos A, B, C e D com 5, 15, 25, 35, 45 dias de estocagem a 12±2°C por eletroforese em gel de poliacrilamida (uréia-PAGE) (gel de separação a 12,5% e de concentração a 4%), de acordo com uma modificação do método descrito por ANDREWS (1983), usando-se uma unidade vertical Protean II (Bio-Rad). O preparo dos géis foi efetuado de acordo com os procedimentos descritos por BALDINI (1998) e a coloração com "Coomassie Brilliant Blue" (CBB), conforme metodologia descrita por BLAKESLEY e BOEZI (1977).

3.2.8 Determinação do teor de aminoácidos livres

Os aminoácidos livres nos queijos A, B, C e D com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de estocagem a 12±2°C foram extraídos com solução de TCA, partindo-se das amostras liofilizadas e diluídas em diluente pH 2,2 (PICKERING). A separação dos aminoácidos individuais foi realizada por cromatografia de troca catiônica e reação pós-coluna com ninidrina usando o analisador de aminoácidos DIONEX DX-300, segundo metodologia descrita por SPACKMAN et al. (1958). As concentrações de aminoácidos foram calculadas usando-se como referência uma solução padrão de aminoácidos Pierce.

3.2.9 Determinação de compostos voláteis neutros de aroma ("HEADSPACE-GC-MS")

Os compostos voláteis neutros de aroma foram isolados a partir das amostras de queijos Prato A, B, C e D com 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$, empregando-se a técnica de "headspace" e a separação realizada em um cromatógrafo a gás 5890 série II (HP) com um detector seletivo de massa série 5972 (HP) como descrito por THIERRY et al., (1999). A técnica "headspace" utiliza o equilíbrio existente entre os componentes voláteis e a mistura de vapor emitido pelo extrato de queijo, que é analisado introduzindo-se o utensílio de vidro especial diretamente no cromatógrafo a gás.

As amostras de queijo foram diluídas em água Milli-Q na proporção 1:3 e homogeneizadas por 1 minuto em Ultra-Turrex T25 (JANKE; KUNKEL, Ika Labortechnik) a 20.500rpm. A seguir, 10g desta suspensão foram transferidos para um tubo especial de 35mL para a entrada da amostra no cromatógrafo. No cromatógrafo, os compostos voláteis foram imobilizados sobre um Vocabarb 3000 trap (Supelco, Bella Fonte, PA), submetidos a desorção térmica a 250°C e condensados com nitrogênio líquido a -100°C antes de serem injetados e separados em coluna capilar HP5 (AGILENT TECHNOLOGIES 60m x 0,32m x $1\mu\text{m}$ de espessura de filme). Foram detectados por um espectrômetro quádruplo de massa HP7972A (AGILENT TECHNOLOGIES) após ionização por impacto eletrônico e identificado por comparação do espectro com aquele da base de dados do "Nist 75 K Mass Spectral" e/ou do espectro com o tempo de retenção dos compostos de referências.

3.2.10 Determinação instrumental de textura

O perfil de textura foi determinado nos queijos A, B, C e D com 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizando-se o texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems). O equipamento é operado pelo programa Texture Expert®, que analisa os resultados da textura trabalhando em ambiente Windows Microsoft®. A temperatura foi mantida a 10°C durante a realização do teste. As condições do teste foram:

velocidade pré-teste: 2,0mm/seg e pós-teste: 2,0mm/seg; velocidade do teste: 1,0mm/seg; distância que o dispositivo comprime a amostra: 10mm; força de contato: 5,0g; dispositivo utilizado: SMS P/55 ("probe" metálico, cilíndrico de 55mm de diâmetro).

Duas fatias de 30 mm de espessura cada, uma externa e a outra interna, foram retiradas de cada peça de queijo. Destas fatias, retiraram-se 6 cilindros sendo 3 deles da região externa e os restantes da região central, conforme a Figura 7. Os cilindros foram cortados com uma lâmina de 20mm de diâmetro. Foram avaliados os seguintes parâmetros: firmeza, adesividade, coesividade e elasticidade. Os resultados foram expressos como média de três leituras de cada região (cilindros externos e internos).

3.2.11 Análise sensorial

Os queijos Prato A, B, C e D com 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$ foram avaliados quanto à análise sensorial descritiva e quantitativa por uma equipe de 15 julgadores selecionados.

A seleção de julgadores foi realizada recrutando-se 19 candidatos dentre os funcionários e estagiários do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas, que foram avaliados quanto à habilidade descritiva e consenso com a equipe. Duas sessões foram realizadas para descrever uma lista de termos segundo o método "Kelly Repertory Grid Method" (MOSKOWITZ, 1983), para caracterização das amostras de queijo Prato disponíveis no mercado local. De posse dos atributos escolhidos, foi elaborada a ficha para a avaliação (Figura 8) da intensidade destes atributos, fazendo uso da escala não estruturada de 10cm. Os atributos selecionados foram: aparência (cor amarela e olhaduras), textura (elástica, flexível, firme e resistente à mastigação), aroma (leite/manteiga, iogurte e queijo Prato maturado), sabor (queijo Prato maturado, salgado, ácido, doce, amargo e picante) e sabor residual. Foi considerada como referência a amostra de queijo Prato de marca D e a posição relativa da amostra referência marcada nas escalas.

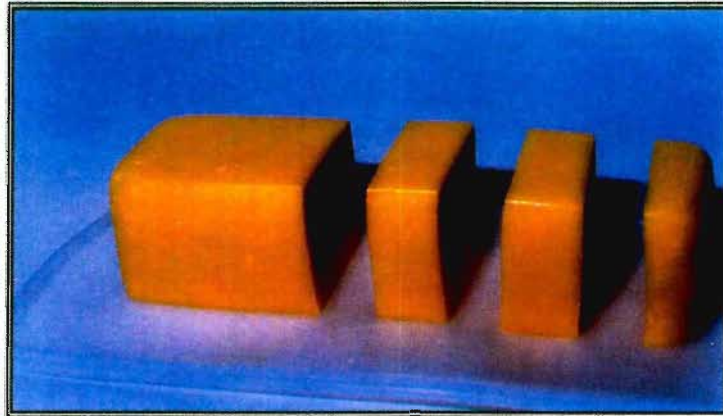
A avaliação sensorial do queijo Prato foi realizada em cabines individuais no Laboratório de Análise Sensorial LAFISE – ITAL, utilizando o sistema computadorizado "Compusense Five" versão 4,2 para a coleta de dados. As análises foram realizadas com repetição, sendo as amostras apresentadas de forma monádica, segundo um delineamento de blocos casualizados. As amostras de cada bloco de queijo foram retiradas com amostrador em formato de um cilindro de 1,0cm de diâmetro e foram mantidas refrigeradas até serem servidas à cada julgador.

Os dados da análise sensorial foram submetidos à análise de variância paramétrica (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tuckey ao nível de erro de 5% utilizando o programa S.A.S (Statistical Analysis System). Além disso, realizou-se uma análise multivariada dos dados da análise sensorial por meio da técnica de componentes principais.

3.2.12 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos dados obtidos nas análises microbiológicas, físico-químicas e perfil de textura foi feita através da análise de variância e comparação das médias (ANOVA), utilizando-se o teste de Tuckey, utilizando o programa S.A.S (Statistical Analysis System).

A



B

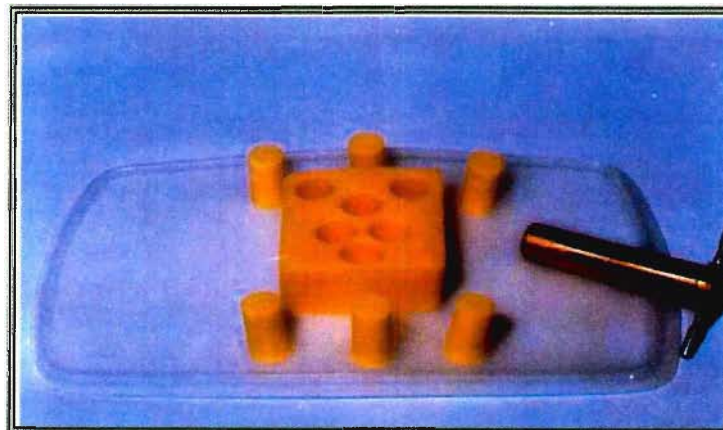


Figura 7 - Corte das fatias externa e interna no queijo tipo Prato (A) e corte dos cilindros externos e internos nas fatias do queijo tipo Prato (B). Fonte: Silva (1998).

Nome: _____

Data: _____

ANÁLISE SENSORIAL DE QUEIJO PRATO

1. Cor amarela	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte
2. Olhaduras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Pouca	Muita
3. Elasticidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Pouca	Muita
4. Flexibilidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Pouca	Muita
5. Firmeza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Pouca	Muita
6. Resistência à mastigação	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Pouca	Muita
7. Aroma manteiga	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte
3. Aroma ácido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte
9. Aroma característico de queijo prato	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte
10. Sabor salgado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte
11. Sabor ácido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte
12. Sabor doce	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte
13. Sabor característico de queijo prato maturado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte
14. Sabor amargo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte
15. Sabor picante	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte
16. Sabor residual	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Fraco	Forte

Figura 8 - Modelo da ficha de avaliação da análise sensorial de queijo Prato.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EVOLUÇÃO DA MICROBIOTA DURANTE A MATURAÇÃO DOS QUEIJOS

A Tabela 1 apresenta os resultados médios das contagens de células viáveis dos diferentes grupos de bactérias lácticas encontradas nos queijos Prato A, B, C e D durante o período de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Comparando-se as contagens de células viáveis no início da maturação (5 dias), observa-se que, com exceção dos lactobacilos termofílicos nos queijos A e D e das bactérias fermentadoras de citrato no queijo C, a presença de populações elevadas de todos os grupos bacterianos examinados nos queijos das quatro origens, de 3,6 a $9,2\text{LogUFCg}^{-1}$. Isto era esperado uma vez que se sabe que ao final do processo de fabricação do queijo a diversidade da microbiota do coágulo é variada e dependente de fatores relacionados com a matéria-prima (condições microbiológicas, tratamento térmico aplicado) e com a capacidade de multiplicação e a retenção no coágulo da população de culturas lácticas adicionadas. (TATINI et al., 1997; ZÁRATE et al., 1997; BUENSUCESO et al., 1988; POZO et al., 1988). Além disso, pequenas alterações nos procedimentos de aquecimento e resfriamento realizados durante a fabricação do queijo são determinantes na predominância de determinados grupos microbianos (GOBBETTI et al., 1999).

Analisando-se a população de células viáveis no início da maturação (5 dias) (Tabela 1, Figura 9), verifica-se uma similaridade entre os perfis microbiológicos dos queijos das quatro origens. Com algumas exceções, todos apresentaram populações de lactococos ($A=9,2$, $B=7,9$, $C=8,4$ e $D=8,1$ Log UFC⁻¹) e estreptococos ($A=8,8$, $B=9,1$, $C=8,4$, $D=7,5$ Log UFC⁻¹) significativamente maiores ($p<0,05$) do que as de lactobacilos mesofílicos ($A=5,7$, $B=4,3$, $C=6,3$, $D=6,7$ Log UFC⁻¹) e termofílicos ($A=1,5$, $B=4,5$, $C=6,6$, $D=1,5$ log UFC⁻¹), fermentadores de lactato ($A=5,7$, $B=7,1$, $C=5,8$, $D=5,4$ log UFC⁻¹) e leuconostoc ($A=6,9$, $B=5,4$, $C=6,2$, $D=5,2$ Log UFC⁻¹). As populações de fermentadores de citrato ($A=4,2$, $B=4,6$, $D=3,9$ log UFC⁻¹) e de enterococos ($A=4,3$, $B=4,6$, $C=3,6$, $D=3,7$ Log UFC⁻¹) foram significativamente ($p<0,05$) menores.

Tabela 1 - Evolução da microbiota láctica nos queijos Prato A, B, C e D durante estocagem a 12±2°C (valores médios de duas repetições).

Grupo de Microorganismo	Origem	População bacteriana nos diferentes dias de estocagem ¹					
		5	15	25	35	45	dms
Lactococos	A	9,2±0,2 B ³ a ⁴	10,7±0,3 Aa	8,3±0,0 Ca	7,7±0,15 Ca	8,3±0,11 Ca	0,7
	B	7,9±0,0 Bc	9,1±0,2 Abc	7,2±0,0 Cb	7,3±0,13 Ca	7,7±0,15 Bb	0,5
	C	8,4±0,0 Ab	8,7±0,2 Ac	8,5±0,3 Aa	7,5±0,06 Ba	7,6±0,1 BCB	0,6
	D	8,1±0,1 Bbc	10,4±0,6 Aa	6,9±0,0 Cb	6,4±0,07 Cb	6,8±0,21 Cc	1,2
	dms ²	0,4	1,5	0,6	0,4	0,6	
Leuconostoc	A	6,9±0,0 Aa	7,3±0,1 Aa	7,4±0,1 Aa	7,5±0,6 Aa	7,5±0,2 Aa	1,2
	B	5,4±0,0 Cc	5,1±0,0 Cc	7,4±0,1 Aa	6,5±0,0 Ba	6,6±0,2 Ba	0,4
	C	6,2±0,1 BCB	6,0±0,1 Cb	6,6±0,0 Bb	6,3±0,1 BCa	7,2±0,2 Aa	0,5
	D	5,2±0,0 Bc	6,1±0,1 Ab	6,0±0,2 Ac	4,2±0,1 Cb	6,6±0,4 Aa	0,8
	dms	0,2	0,3	0,4	1,3	1,1	
Enterococos	A	4,4±0,0 Dab	4,6±0,0 Ab	4,5±0,0 Ca	3,2±0,0 Eb	4,5±0,0 Bb	0,0
	B	4,6±0,1 Aa	5,4±0,3 Aa	4,4±0,6 Aa	5,4±0,3 Aa	5,6±0,1 Aa	1,41
	C	3,6±0,4 Ab	3,7±0,2 Ac	3,8±0,1 Aa	3,9±0,4 Ab	3,9±0,1 Ac	0,99
	D	3,7±0,2 Cb	4,9±0,1 Aab	4,4±0,0 Ba	3,6±0,0 Cb	3,6±0,0 Cd	0,36
	dms	0,8	0,7	1,3	0,1	0,3	
Estreptococos	A	8,8±0,1 Aa	8,9±0,1 Ab	8,3±0,0 Ba	7,2±0,2 Da	7,7±0,1 Ca	0,4
	B	9,1±0,0 Aa	9,5±0,2 Aa	7,6±0,0 Bb	6,5±0,2 Cbc	6,8±0,0 Cb	0,5
	C	8,4±0,1 Aa	8,7±0,1 Ab	8,5±0,3 Aa	7,1±0,1 Bab	8,1±0,2 Aa	0,7
	D	7,5±0,4 Ab	7,7±0,1 Ac	6,6±0,1 Bc	6,4±0,1 Bc	6,5±0,0 Bb	0,8
	dms	0,9	0,5	0,7	0,7	0,4	
Lactobacilos mesofílicos	A	5,7±0,1 Db	6,9±0,0 Cb	7,6±0,1 Ba	7,8±0,1 Ba	8,3±0,0 Aa	0,2
	B	4,3±0,0 Dc	5,3±0,0 Cd	6,3±0,1 Bc	7,3±0,0 Aa	7,3±0,1 Ab	0,2
	C	6,3±0,2 Ca	7,1±0,1 ABa	6,9±0,1 BCB	7,4±0,2 ABa	7,7±0,3 Aab	0,7
	D	6,7±0,2 Aa	6,5±0,1 Ac	6,7±0,18 Ab	5,9±0,1 Bb	6,6±0,1 Ac	0,5
	dms	0,5	0,2	0,4	0,4	0,6	
Lactobacilos termofílicos	A	1,5±0,0 Dc	6,6±0,1 Ca	7,4±0,0 Ba	7,6±0,1 Ba	8,3±0,1 Aa	0,3
	B	4,5±0,4 CDb	4,2±0,4 Db	5,8±0,3 BCB	6,6±0,3 ABb	7,5±0,1 Ab	1,3
	C	6,6±0,1 Ba	7,2±0,2 Aa	7,5±0,1 Aa	7,2±0,1 Aab	7,5±0,0 Ab	0,5
	D	1,5±0,0 Dc	6,8±0,1 Aa	5,4±0,2 Cb	5,1±0,2 Cc	6,1±0,1 Bc	0,5
	dms	0,9	1,0	0,8	0,8	0,3	
Fermentadores de citrato	A	4,2±0,04 Bb	5,5±0,0 Ab	3,3±0,1 Cc	4,6±0,0 Bb	4,4±0,5 Bb	0,9
	B	4,6±0,01 Ca	5,1±0,1 BCB	5,3±0,3 BCa	5,5±0,2 ABa	5,8±0,1 Aa	0,7
	C	1,5±0,0 Dd	4,3±0,2 Ac	3,8±0,1 Bbc	2,5±0,0 Cd	3,9±0,0 ABb	0,4
	D	3,9±0,0 Bc	6,6±0,1 Aa	4,1±0,2 Bb	3,3±0,2 Cc	4,2±0,1 Bb	0,5
	dms	0,1	0,5	0,7	0,6	1,1	
Fermentadores de lactato	A	5,7±0,1 Dbc	6,9±0,0 Ca	7,6±0,1 Ba	7,8±0,1 Ba	8,3±0,0 Aa	0,2
	B	7,1±0,0 Ca	6,8±0,1 Da	6,6±0,1 Eab	7,4±0,0 Bb	7,9±0,1 Aab	0,2
	C	5,8±0,0 Cb	5,6±0,1 Cb	6,0±0,1 Cb	6,2±0,0 Bc	6,5±0,0 Abc	0,2
	D	5,4±0,1 Bc	5,8±0,1 Bb	7,9±0,7 Aa	5,3±0,0 Bd	6,1±0,8 Bc	1,9
	dms	0,3	0,3	1,5	0,1	1,6	

¹ Resultados em número logarítmico da unidade formadora de colônias por grama de queijo (Log UFCg⁻¹);

² d.m.s: diferença mínima significativa ao nível de erro de 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey;

³ As amostras (média ± desvio padrão) seguidas de letras maiúsculas (A, B, C, D) diferentes na mesma linha diferem significativamente ao nível de erro de 5% para o fator tempo.

⁴ As amostras (média ± desvio padrão) seguidas de letras minúsculas (a, b, c, d) diferentes na mesma coluna diferem significativamente ao nível de erro de 5% para os queijos das diferentes origens.

Pode-se observar ainda na Tabela 1 e Figura 9, contagens iniciais elevadas de NSLAB (lactobacilos mesofílicos e termofílicos, enterococos, estreptococos, fermentadores de citrato e de lactato) nos queijos Prato A, B, C e D, que se situaram entre 1,5 a 9,1UFCg⁻¹, dependendo da origem do queijo e do grupo bacteriano. Como a concentração de lactose é reduzida no queijo recém-processado, devido ao desenvolvimento dos lactococos (McSWEENEY et al., 1995), essas NSLAB podem ter obtido a energia pela fermentação de lactato e de citrato, conforme demonstrado pela população elevada detectada no ágar citrato e no ágar lactato (PEITERSON e MARSHALL, 1990, 1993; GOMEZ et al., 1999).

Analisando-se as curvas de evolução dos diferentes grupos de bactérias lácticas ao longo da maturação (Figuras 10 a 17) podem-se evidenciar comportamentos distintos, independentemente da origem do queijo ou do grupo bacteriano.

Para a maioria dos grupos bacterianos, verifica-se, em determinados períodos da maturação, um aumento e posterior redução significativa ($p < 0,05$) das contagens de células viáveis: lactococos (10,7 a 7,7Log UFCg⁻¹), enterococos (4,6 a 3,2Log UFCg⁻¹) e estreptococos (8,9 a 7,2Log UFCg⁻¹) no queijo A; lactococos (9,1 a 7,2Log UFCg⁻¹), leuconostoc (7,4 a 6,5Log UFCg⁻¹), enterococos (5,4 a 4,4Log UFCg⁻¹), estreptococos (9,5 a 6,5Log UFCg⁻¹), fermentadores de lactato (7,1 a 6,6Log UFCg⁻¹) no queijo B; lactococos (8,7 a 7,5Log UFCg⁻¹), estreptococos (8,7 a 7,1Log UFCg⁻¹) e fermentadores de citrato (5 a 2,5Log UFCg⁻¹) no queijo C e lactococos (10,4 a 6,4Log UFCg⁻¹), leuconostoc (6,1 a 4,2Log UFCg⁻¹), enterococos (4,9 a 3,6Log UFCg⁻¹), estreptococos (7,7 a 6,4Log UFCg⁻¹), lactobacilos mesofílicos (6,7 a 5,9Log UFCg⁻¹) e termofílicos (6,8 a 5,1Log UFCg⁻¹) e fermentadores de citrato (6,6 a 3,3Log UFCg⁻¹) e lactato (7,9 a 5,3Log UFCg⁻¹) no queijo D (Figuras 10 a 17).

Para outros grupos ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) nas contagens de lactobacilos mesofílicos (5,7 a 8,3Log UFCg⁻¹) e termofílicos (1,5 a 8,3Log UFCg⁻¹) e fermentadores de lactato (5,7 a 8,3Log UFCg⁻¹) no queijo A; lactobacilos mesofílicos (4,3 a 7,3Log UFCg⁻¹) e termofílicos (4,5 a 7,5Log UFCg⁻¹) e fermentadores de citrato (4,6 a 5,8Log UFCg⁻¹) no queijo B; lactobacilos mesofílicos (6,3 a 7,7Log UFCg⁻¹) e termofílicos (6,6 a 7,5Log UFCg⁻¹) e fermentadores de lactato (5,8 a 6,5 Log UFCg⁻¹) no queijo C (Figuras 10 a 17).

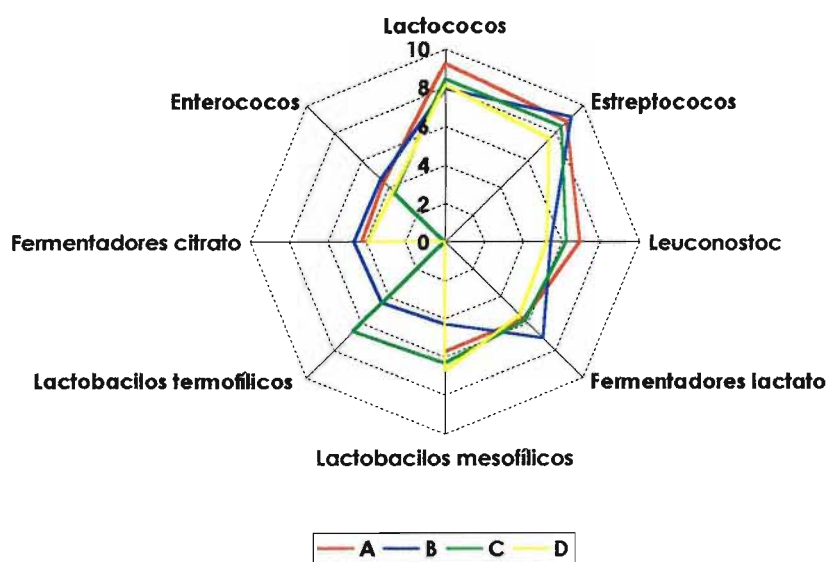


Figura 9 - Perfil microbiológico dos queijos A, B, C e D no início da estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para outros grupos ainda, as variações nas contagens não foram significativas ($<0,05$), mantendo-se praticamente constante ao longo de 45 dias de maturação, como constatado para leuconostoc (6,9 a 7,5 LogUFCg⁻¹) no queijo A e enterococos (3,6 a 3,9 LogUFCg⁻¹) no queijo C (Figuras 10 a 17).

Durante o processamento dos queijos, a microbiota encontra-se em constante evolução, tendo sido observado um aumento da ordem de 2 a 3 ciclos logarítmicos entre as etapas de coagulação e drenagem do soro (TATINI et al., 1971; POZO et al., 1988; ZÁRATE et al., 1997). Durante a maturação, a microbiota comporta-se de maneira distinta, pois as condições de desenvolvimento passam a ser influenciada por diferentes fatores, como por exemplo, pH, e teores de sais, atividade de água, umidade, fonte de carbono, além da temperatura de maturação (GUINEE e FOX, 1993).

Portanto, as variações nas contagens observadas para os diferentes grupos bacterianos podem ter ocorrido em virtude da ação de um ou vários desses fatores que interferem no desenvolvimento bacteriano. Outro fator adicional muito importante e que vêm sendo pesquisado nos últimos anos é a tendência da cultura láctica à autólise, um fenômeno de degradação de ligações específicas do peptídeo glicano pelas autolisinas. A ação destas enzimas leva à rápida lise da membrana citoplasmática (HÖLJTJE, 1993; SHOCKMAN et al., 1996). Normalmente, a autólise pode ser observada por um decréscimo das contagens de células viáveis durante a maturação dos queijos, sendo considerada por vários pesquisadores como um índice de autólise (LANGSRUD et al., 1987; BOUTROU et al., 1998).

Analisando-se as curvas de evolução da microbiota presente nos queijos A, B, C e D (Tabela 1 e Figuras 10 a 17), evidenciam-se decréscimos significativos ($p < 0,05$) nas contagens das culturas lácticas adicionadas, lactococos nos queijos A (3 ciclos LogUFCg⁻¹), B (1,8 ciclos LogUFCg⁻¹), C (1,2 ciclos LogUFCg⁻¹) e D (4 ciclos LogUFCg⁻¹) e leuconostoc nos queijos B (0,9 ciclos LogUFCg⁻¹) e D (1,8 ciclos LogUFCg⁻¹). Com relação as NSLAB, foi observado decréscimo significativo ($p < 0,05$) nas contagens de fermentadoras de citrato no queijo A (2 ciclos LogUFCg⁻¹), C (1,3 ciclos LogUFCg⁻¹) e D (3,3 ciclos LogUFCg⁻¹), enterococos nos queijos A e D (1,3 ciclos LogUFCg⁻¹), estreptococos nos queijos A (1,1 ciclos LogUFCg⁻¹), B (3,0 ciclos LogUFCg⁻¹), C (1,6 ciclos LogUFCg⁻¹) e D (1,3 ciclos LogUFCg⁻¹) e lactobacilos mesofílicos (0,83 ciclos LogUFCg⁻¹) e termofílicos (1,7 ciclos LogUFCg⁻¹) no queijo D e bactérias fermentadoras de lactato no queijo B (0,53 ciclos LogUFCg⁻¹).

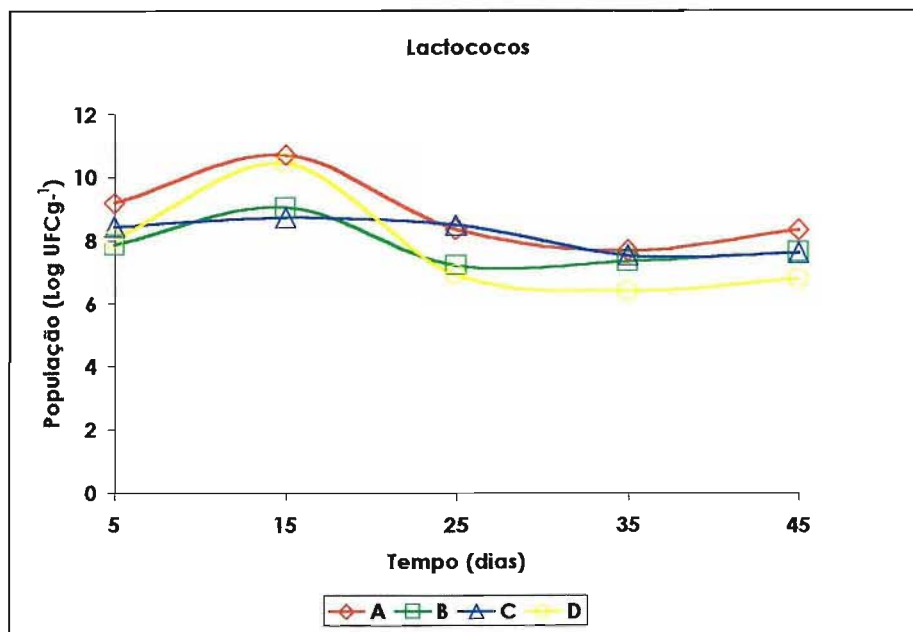


Figura 10 - Evolução da população de lactococos nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$.

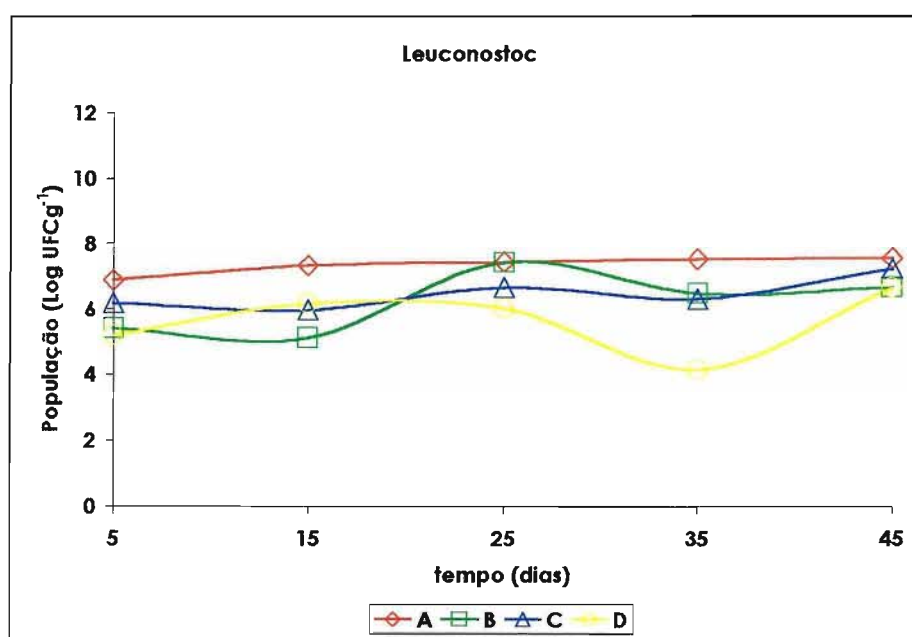


Figura 11 - Evolução da população de leuconostoc nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$.

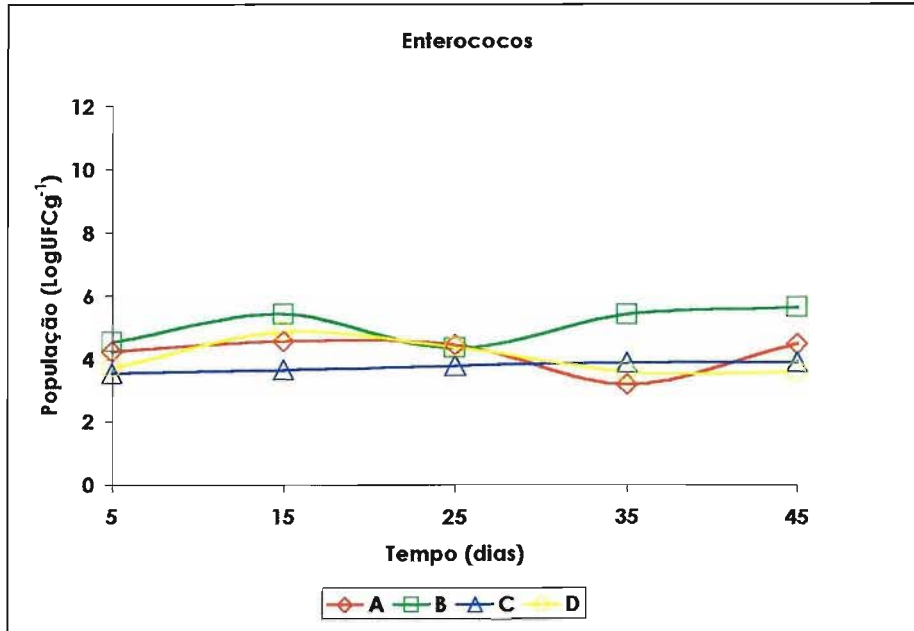


Figura 12 - Evolução da população de enterococos nos queijos A, B, C e D durante estocagem a 12±2°C.

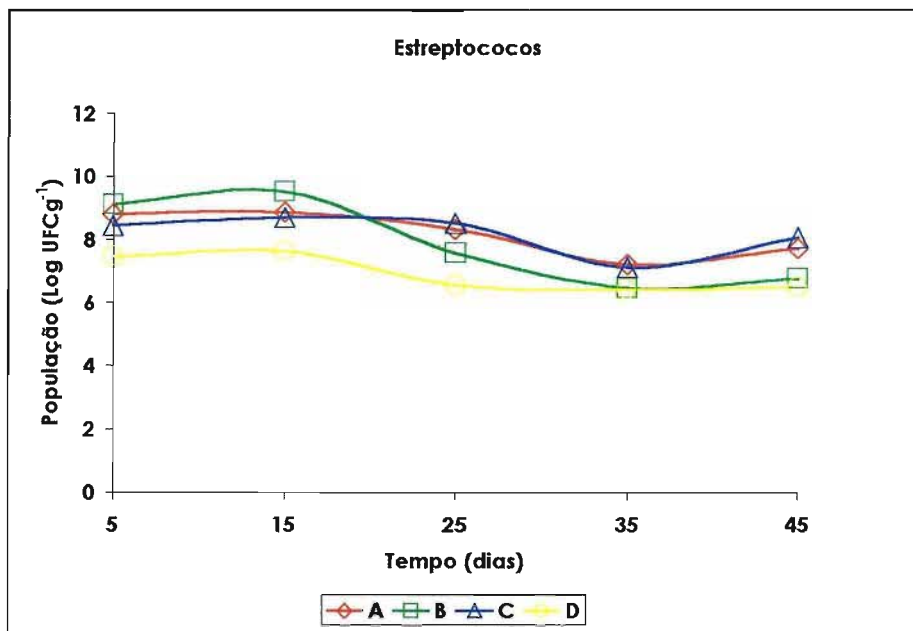


Figura 13 - Evolução da população de estreptococos nos queijos A, B, C e D durante estocagem a 12±2°C.

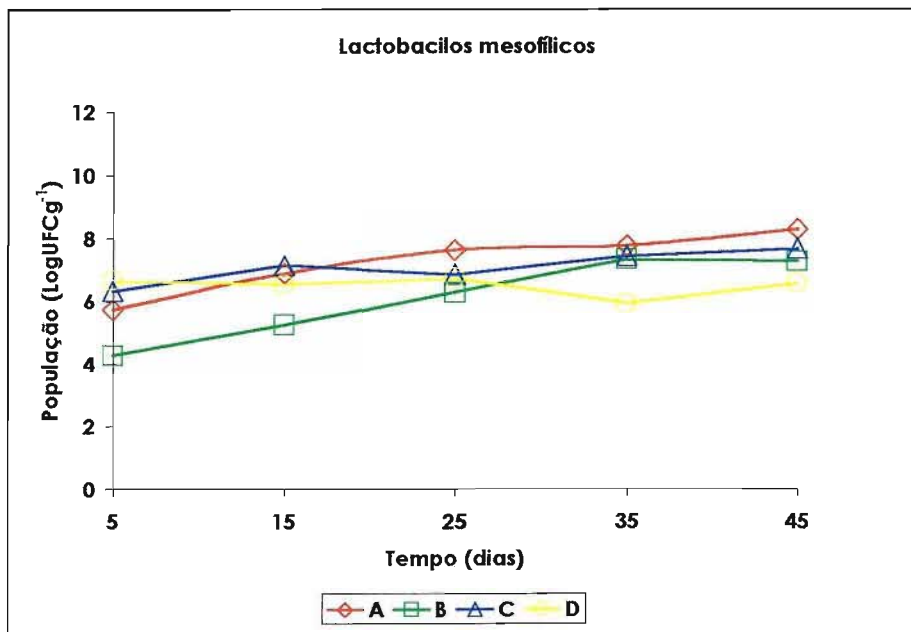


Figura 14 - Evolução da população de lactobacilos mesofílicos nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

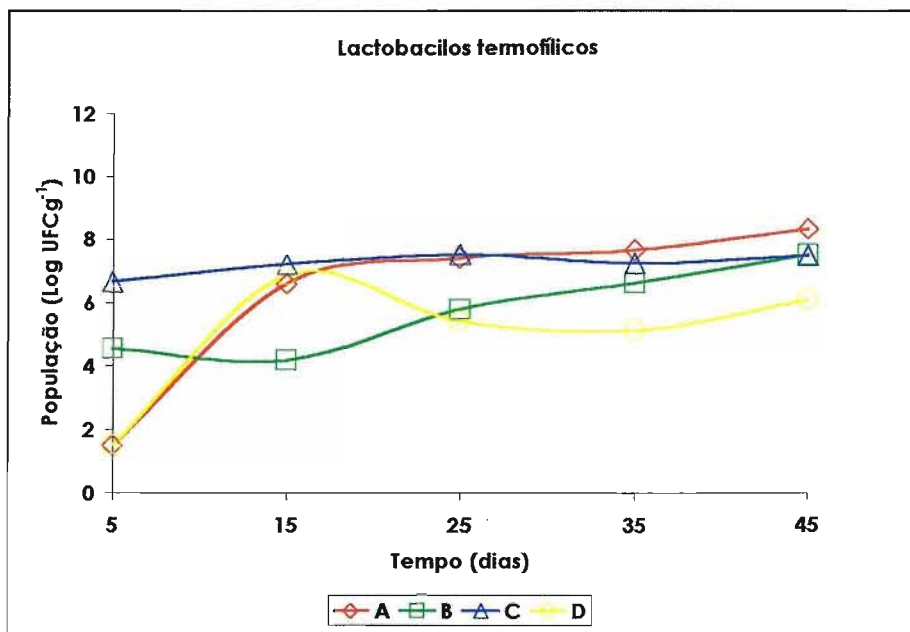


Figura 15 - Evolução da população de lactobacilos mesofílicos e termofílicos nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

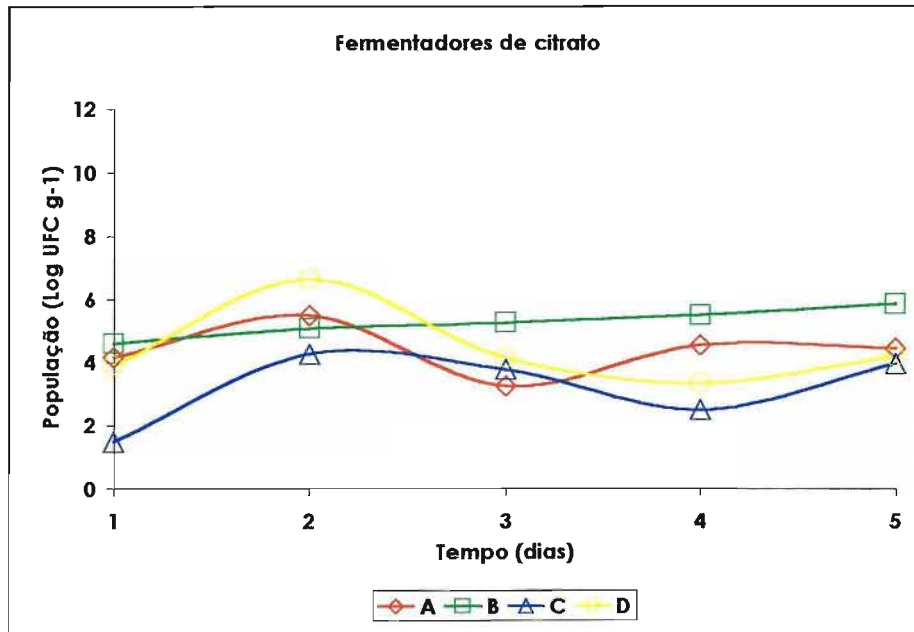


Figura 16 - Evolução da população de fermentadores de citrato nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^\circ\text{C}$.

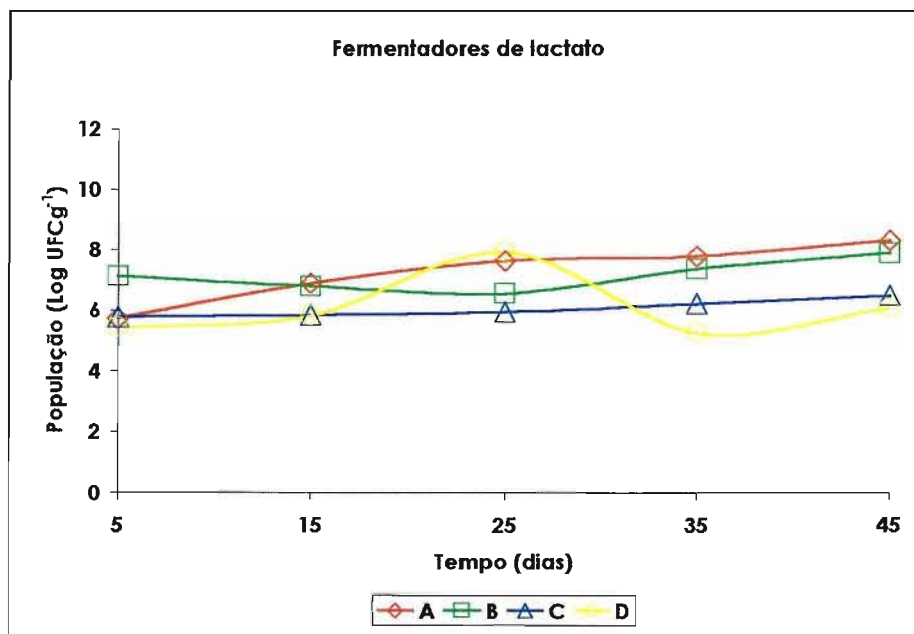


Figura 17 - Evolução da população de fermentadores de lactato nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^\circ\text{C}$.

Esses resultados fornecem evidências de que esses grupos bacterianos sofreram autólise durante o período de maturação dos queijos. No entanto, esses resultados devem ser analisados com certa cautela, uma vez que alguns estudos demonstraram não haver uma correlação significativa entre os níveis de autólise determinada pela contagem de células viáveis e aqueles obtidos por outros métodos (LANGSRUD et al., 1987; CHAPOT-CHARTIER, 1994).

Partindo-se do princípio de que todas as células bacterianas apresentam autolisinas, reduções pequenas nas contagens são indicativas de autólise fraca. Vários fatores podem afetar a atividade das autolisinas, dentre os quais, idade e estado fisiológico da célula e os parâmetros físicos-químicos envolvidos na fabricação e maturação dos queijos (VEGARUD et al., 1983; LANGSRUD et al., 1987). Vale ressaltar que uma redução de 1 ciclo logarítmico tem sido evidenciada para culturas conhecidas como fracamente autolíticas durante a maturação de alguns tipos de queijos (WILKINSON et al., 1994; MORGAN et al., 1995; O'DONOVAN et al., 1996).

Comparando-se as populações no final do período de maturação (45 dias) (Tabela 1 e Figura 18), verifica-se que os lactobacilos mesofílicos (A=8,3, B=7,3, C=7,7, D=6,6 logUFCg⁻¹), lactobacilos termofílicos (A=8,3, B=7,5, C=7,5, D=6,1 logUFCg⁻¹), fermentadores de lactato (A=8,3, B=7,9, C=8,5, D=6,1 log UFCg⁻¹) e leuconostoc (A=7,5, B=6,6, C=7,2, D=6,6 log UFCg⁻¹) elevaram-se a níveis semelhantes ao de lactococos (A=8,3, B=7,7, C=7,6, D=6,8 log UFCg⁻¹) e de estreptococos (A=7,7, B=6,8, C=8,1, D=6,5 log UFCg⁻¹), que no início da maturação eram menos numerosos, enquanto as fermentadores de citrato (A=4,4, B=5,8, C=3,9, D=4,2 log UFCg⁻¹) e enterococos (A=4,5, B=5,6, C=3,9, D=3,6 Log UFCg⁻¹) permaneceram em níveis inferiores nos queijos das quatro origens.

O predomínio de lactococos no início da maturação (Tabela 1, Figura 9) dos queijos A, B, C e D encontra-se de acordo com as constatações de outros pesquisadores (TAVARIA et al., 1998; GOBBETTI et al., 1999; ALBENZIO et al., 2001; FRANCO et al., 2001; PRIETO et al., 2001). Esses pesquisadores avaliaram a microbiota de outros tipos de queijos e constataram que as bactérias componentes do fermento láctico, principalmente lactococos, são as predominantes nos queijos recém-fabricados.

Porém, com o decorrer da maturação, ao contrário do que se esperava, a população de lactococos (Tabela 1, Figura 18) não se reduziu a níveis relatados para outros tipos de queijos (LYNCH et al., 1997; TAVARIA et al., 1998; GOBBETTI et al., 1999; REHMAN et al., 2000; ALBENZIO et al., 2001; FRANCO et al., 2001; PRIETO et al., 2001). No final da estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$, observa-se uma população elevada de lactococos que variou de $6,8\text{LogUFCg}^{-1}$ no queijo e $8,3\text{Log UFCg}^{-1}$ no queijo A.

Ao contrário, as populações NSLAB aumentaram, especialmente lactobacilos mesofílicos e termofílicos, alcançando níveis semelhantes aos detectados para os lactococos. Um aumento da população NSLAB é típico de muitos tipos de queijos, que são mais tolerantes às condições hostis do queijo (alto teor de sal, baixos valores de pH e de temperatura, reduzidas concentrações de substrato). Normalmente elas alcançam valores mais elevados que os das culturas lácticas adicionadas (LYNCH et al., 1997; TAVARIA et al., 1998; GOBBETTI et al., 1999; REHMAN et al., 1999; REHMAN et al., 2000; ALBENZIO et al., 2001; FRANCO et al., 2001; PRIETO et al., 2001).

A população elevada de lactobacilos mesofílicos detectada durante a maturação dos queijos das quatro origens, $5,7$ a $8,3\text{LogUFCg}^{-1}$ no queijo A, $4,3$ a $7,3\text{LogUFCg}^{-1}$ no queijo B, $6,3$ a $7,7\text{LogUFCg}^{-1}$ no queijo C e $6,7$ a $6,6\text{LogUFCg}^{-1}$ no queijo D, vêm confirmar as observações de outros autores para o queijo Prato. VALLE et al. (1991), encontraram variações de $7,1$ a $5,5\text{LogUFCg}^{-1}$, respectivamente, nos queijos Prato com 1 dia e 2 meses de maturação. MARTINS et al. (1979), observaram variações nas contagens de lactobacilos mesofílicos entre três lotes de queijos: 8 a $7,5$, 8 a $6,5$ e $6,8$ a $7,5\text{LogUFCg}^{-1}$ para os queijos no início e final da maturação (45 dias), respectivamente. Mesmo assim, segundo esses autores, os produtos resultantes apresentavam "flavour" e textura peculiares.

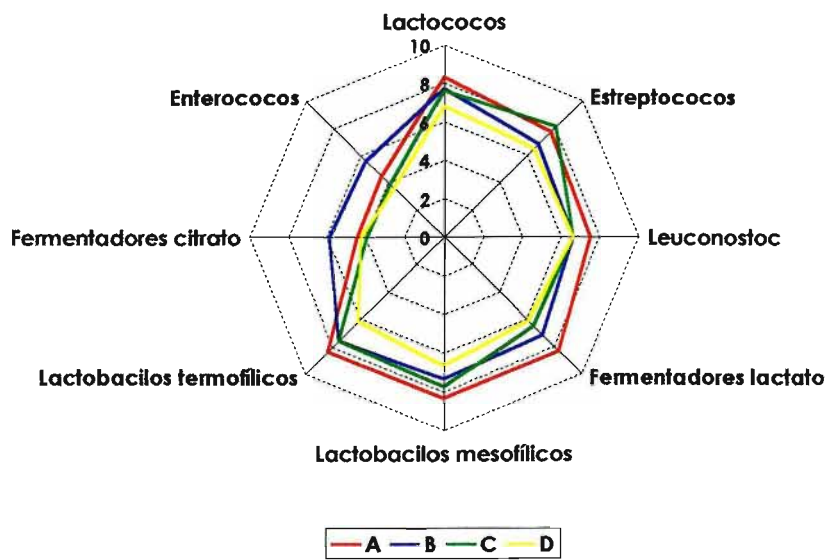


Figura 18 - Perfil microbiológico dos queijos A, B, C e D no final da estocagem $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

Segundo MENÉNDEZ et al. (2000) a presença de lactobacilos mesofílicos é um evento natural em muitas variedades de queijos. Um queijo de massa lavada como o Gouda e, portanto, o Prato apresenta teor elevado de umidade e de pH, condições ideais para o desenvolvimento das NSLAB. Além disso, o menor teor de sal favorece o desenvolvimento dessas bactérias no interior do queijo (MARTLEY e CROW, 1993).

As variações nas populações observadas entre os queijos A, B, C e D podem ter sido decorrente de diferenças na composição da microbiota do leite cru e/ou das contaminações ambientais predominantes em cada um dos laticínios. Segundo PETERSON e MARSHALL (1990), o ambiente pode ser uma fonte permanente de determinadas espécies de lactobacilos e que esta microbiota específica para cada laticínio, pode promover a formação de características especiais e sutis de "flavour".

4.1.1 Gêneros envolvidos na maturação dos queijos

Uma vez que contagens elevadas de NSLAB foram detectadas nas amostras de queijos analisadas e sabendo-se que a maioria dos meios de cultivos não apresenta seletividade para as diferentes espécies de bactérias lácticas, realizou-se o isolamento de colônias a partir de todos os meios de cultivos utilizados para se proceder a uma caracterização presuntiva ao nível de gênero.

Para tanto, após as enumerações dos diferentes grupos de bactérias lácticas durante o período de maturação dos queijos foram isoladas 894 culturas, sendo 217 do queijo A, 234 do queijo B, 184 do queijo C e 259 do queijo D. As culturas foram imediatamente avaliadas quanto às características morfológicas e produção de catalase. A classificação morfológica das culturas Gram-positivas e não produtoras de catalase apresentada na Tabela 2 revela a presença de população elevada de lactobacilos nos queijos das quatro origens, sendo 59% no A, 49,6% no B, 72,8% no C e 47,5% no D.

Tabela 2 - Caracterização morfológica das culturas isoladas a partir dos queijos Prato A, B, C, D durante a estocagem a 12±2°C.

Grupo	Origem				Total
	A	B	C	D	
Cocos Gram-positivos	89 (41,0%)	118 (50,4%)	50 (27,2%)	136 (52,5%)	393
Bastonetes Gram-positivos	128 (59,0%)	116 (49,6%)	134 (72,8%)	123 (47,5%)	501
Total	217	234	184	259	894

Todas as culturas isoladas foram submetidas a testes fisiológicos e bioquímicos para a determinação do gênero, cujos resultados são sintetizados na Figura 19.

No queijo A foram identificadas 35% de culturas como sendo lactobacilos do grupo I (homofermentativos obrigatórios), 19% lactobacilos do grupo II (homofermentativos facultativos), 16% *Lactococcus lactis* sp., 15% *Pediococcus* sp., 5% lactobacilos do grupo III (heterofermentativos obrigatórios), 3% *Enterococcus* sp., 2% *Tetragenococcus* sp., 1% *Aerococcus* sp., 2% *Leuconostoc* sp. e 2% como *Streptococcus* sp. No queijo B foram identificadas 37% de culturas como sendo lactobacilos do grupo I, 15% *Enterococcus* sp., 13% *Lactococcus lactis* sp., 12% lactobacilos do grupo II, 9% *Pediococcus* sp., 6% *Leuconostoc* sp., 4% *Tetragenococcus* sp., 2% *Aerococcus* sp., 1% de *Streptococcus* sp. e 1% como lactobacilos do grupo III. No queijo C foram identificadas 40% de culturas como sendo lactobacilos do grupo II, 31% lactobacilos do grupo I, 22% *Enterococcus* sp., 2% lactobacilos do grupo III, 2% *Leuconostoc* sp., 2% *Lactococcus lactis* sp., 0,6% *Tetragenococcus* sp. e 0,5% como *Aerococcus* sp.. No queijo D foram identificadas, 35% de culturas como sendo lactobacilos do grupo II, 19% *Enterococcus* sp. 18% *Lactococcus lactis* sp., 12% lactobacilos do grupo I, 6% lactobacilos do grupo III, 6% *Aerococcus* sp., 2% *Tetragenococcus* sp., 2% *Pediococcus* sp., 2% *Leuconostoc* sp., e 0,4% como *Streptococcus* sp. (Figura 19).

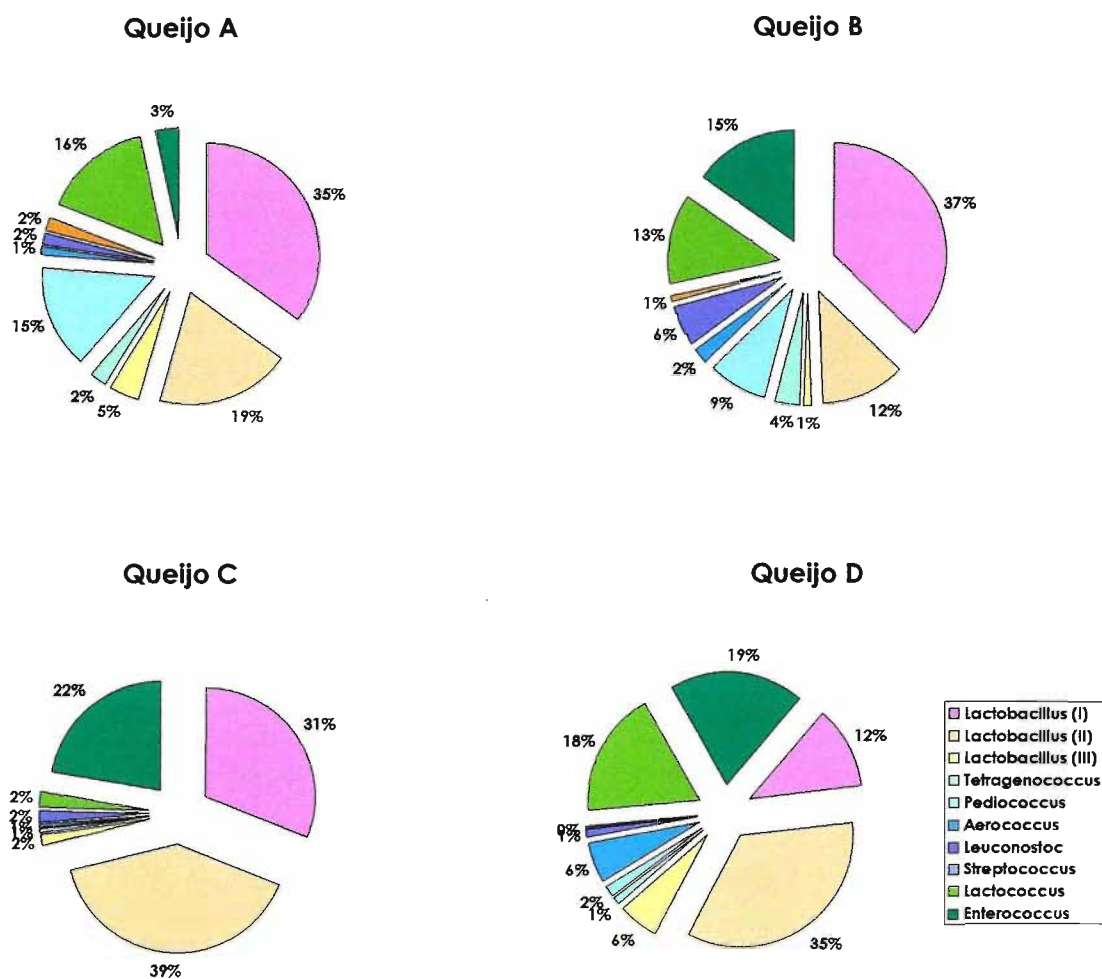


Figura 19 - Distribuição das culturas lácticas isoladas dos queijos A, B, C e D durante a estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

Esses resultados permitiram a confirmação da presença de diferentes gêneros de NSLAB, mas não revelaram diferenças marcantes entre os queijos das diferentes origens. Os lactobacilos foram os gêneros predominantes entre as culturas isoladas desses queijos (A=59%, B=50%, C=73%, 53%), diferindo apenas com relação ao grupo. Foi observada uma maior proporção de culturas identificadas como lactobacilos do grupo I nos queijos A (35%), B (37%) e C (31%) e de lactobacilos do grupo II nos queijos C (39%) e D (35%). Por outro lado, culturas de lactobacilos heterofermentativos foram identificadas em pequena proporção, independente da origem da amostra de queijo (5% no A, 1% no B, 2% no C e 6% no D). A presença deste grupo é indesejável, pois leva a formação de defeitos, conforme constatado por PETERSON e MARSHALL (1990) em queijo Cheddar.

Vários estudos têm mostrado que os lactobacilos homofermentativos são as principais NSLAB presentes em queijos, podendo ser originárias do leite cru (termodúricas) ou do ambiente de processamento (GOBBETTI et al., 1999). Apesar de ocorrerem inicialmente em números iniciais reduzidos, sua população pode aumentar em queijos fabricados a partir de leite pasteurizado, chegando, em muitos casos, a dominar a microbiota, conforme evidenciado neste estudo e relatado para outros tipos de queijos (BUENSUCESO et al., 1988; TATINI et al., 1997; TAVARIA et al., 1998; GOBBETTI et al., 2001; FRANCO et al., 2001).

Pediococcus sp., foi identificado em baixas proporções e somente nos queijos A (15%) e B (8,6%), indicando que não ter havido contaminação elevada na matéria-prima decorrente da alimentação e excrementos dos animais (BERESFORD et al., 2001) ou, então, que somente as espécies tolerantes ao tratamento térmico sobreviveram nesses queijos (LITOPOULOU-TZANETAKI et al., 1989).

É preciso considerar, entretanto, que as características fenotípicas observadas para os gêneros *Aerococcus* e *Tetragenococcus* são muito similares àquelas descritas para os *Pediococcus*. A diferenciação, principal neste caso, está relacionada à capacidade que o gênero *Tetragenococcus* tem de se desenvolver em presença de 18% de NaCl e do fato de *Pediococcus* multiplicar a valores iniciais de pH de 4,4 (POT et al., 1994).

Enterococcus sp. estava presente entre as culturas isoladas a partir todos os queijos (A=3%, B=15%, C=22%, D=19%). Entretanto, não se verificou um aumento dessa população durante a estocagem, coincidindo com o relato de vários autores que estudaram os seguintes tipos de queijos: Arzúa-Ulloa (MENÉNDEZ et al., 2000), Idiazábel (ERTOLONTO et al., 1999), Manchego (RAMOS et al., 1981), La Serena (POZO et al., 1988), Torta del Casar (POULLET et al., 1993), Feta (LITOPOULOU-TZANETAKI et al., 1993) e Comté (BOUTON et al., 1998). Esse comportamento pode ser explicado pela resistência dessa espécie a altas concentrações de sal, à acidez e ao tratamento térmico do leite (MUNDT, 1986; CUESTA et al., 1995).

Os enterococos têm sido utilizados como indicador de condições higiênicas, principalmente de águas e atualmente, tem se observado a presença de espécies não patogênicas em alguns produtos lácteos (ARIZCUN ET AL., 1997). Seu papel na maturação de queijos ainda não foi elucidado, mas, devido à atividade proteolítica e lipolítica e à capacidade de produção de diacetil e acetaldeído por determinadas espécies, alguns autores consideraram que os enterococos podem ter uma influência significativa no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos queijos (ARIZCUN et al., 1997; ZÁRATE et al. 1997).

Embora as populações presuntivas de *Streptococcus* sp. em ágar M17 incubado a 42°C tenha sido elevada nos queijos das quatro origens, níveis reduzidos de culturas isoladas desse meio foram identificadas nos queijos A (1,84%), B (0,86%) e D (0,38%), enquanto no queijo C nenhuma cultura foi identificada. De maneira idêntica, linhagens de *Lactococcus lactis* sp. foram identificadas em níveis menores (16% no queijo A, 13% no queijo B, 2% no queijo C e 18% no queijo D) em ágar M17 que aqueles verificados para os lactobacilos. Em menor proporção ainda, foi identificada culturas como sendo *Leuconostoc*, com 2% nos queijos A, C e D e 6% no queijo B.

Esses resultados comprovaram que as contagens elevadas de células viáveis no ágar M17 não eram de lactococos ou de estreptococos e que a presença de populações elevadas de NSLAB, principalmente de lactobacilos, dificultaram as interpretações, conforme constatado por BOUTON et al. (1999). BEUVIER et al. (1997) observaram no início da maturação uma diminuição na população de bactérias adicionadas e um aumento, após 3 semanas, fato explicado pelo desenvolvimento de lactobacilos termofílicos.

Esta etapa do estudo foi realizada com o intuito de verificar a presença de NSLAB durante a maturação dos queijos A, B, C e D. A metodologia utilizada foi adequada, permitindo a diferenciação dos principais gêneros de bactérias lácticas. Contudo, faz-se necessário ressaltar a discrepância observada entre a população inicialmente encontrada nos meios de cultivos e àquela confirmada bioquimicamente. Aproximadamente 50% das colônias isoladas do ágar M17 e do ágar MSE utilizados para o desenvolvimento de lactococos e leuconostoc, respectivamente, foram identificadas como lactobacilos.

Vários autores evidenciaram a falta de seletividade do ágar M17 para amostras contendo população elevada de lactobacilos. ZÁRATE et al. (1997) evidenciaram que 42% e 17% das culturas isoladas em ágar M17 e ágar MSE foram identificadas como lactococos e leuconostoc, respectivamente, e que esses dois meios haviam permitido um desenvolvimento elevado de enterococos (33% no ágar M17 e 62% no ágar MSE). LYNCH et al. (1996) demonstraram um declínio da população de lactococos durante o primeiro mês de maturação de queijo Cheddar, a partir do qual, segundo os autores, não foi possível monitorar o número dessa população em virtude do desenvolvimento de lactobacilos no ágar M17 utilizado. MANNU et al. (2000), observaram que 20% das colônias isoladas em ágar M17 eram de lactobacilos. BOUTON et al., (1997) identificaram linhagens de *Strep. thermophilus*, *Pediococcus* sp. e *Enterococcus* sp. isolados de ágar M17 incubado a 42°C.

Por outro lado, ágar Rogosa revelou alta seletividade, visto que praticamente 100% das colônias isoladas, nesse estudo, foram identificadas como lactobacilos. Estes resultados foram superiores aos de ZÁRATE et al. (1997) que identificaram 70% dos isolados nesse meio como sendo lactobacilos.

Outro fator a ser destacado relaciona-se com a ambigüidade dos testes fenotípicos utilizados para a diferenciação dos gêneros *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp. e *Lactococcus lactis* sp. em decorrência de vários fatores limitantes, destacando-se entre eles a capacidade que determinadas linhagens de lactococos tem de se desenvolver a pH 9,6 e em presença de 6,5% de NaCl (CORROLER et al., 1998; ESTEPAR, 1999). A indução da autólise a 45°C em determinadas linhagens bacterianas se constitui em outro importante fator limitante na identificação de espécies termofílicas (FERNÁNDEZ-MURGA et al., 1995).

Esta parte do estudo permitiu conhecer os principais gêneros envolvidos na microbiota e sua evolução ao longo da maturação de queijo Prato de quatro origens. Esses dados revestem-se de importância na medida em que o queijo Prato, mesmo sendo o mais consumido dos queijos maturados ainda não apresenta qualidade uniforme. Deve-se ressaltar que uma mesma marca comercial pode apresentar variações ao longo do ano. Soma a isso o fato dos queijos serem colocados no mercado antes do período mínimo de maturação, impossibilitando que o produto apresente suas qualidades típicas. Portanto, o conhecimento da microbiota significativa no processo de maturação, poderia levar ao desenvolvimento de fermentos lácticos com características específicas para melhorar a qualidade do produto.

4.2 DETERMINAÇÃO DA AUTÓLISE DA MICROBIOTA DURANTE A MATURAÇÃO

4.2.1 Atividade de aminopeptidases e dipeptidil-aminopeptidases

A Tabela 3 apresenta a atividade específica das aminopeptidases Pep Q (Leu), Pep G (Ala), Pep X (Gli), Pep N (Arg) Pep C (Lis), Pep A (Glu) e Pep I (Pro) nos extratos de queijos A, B, C e D durante a estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$. As dipeptidil-aminopeptidases PepX (Gli-pro) e ácido-piro-glutâmico (Piro-glu) mesmo não sendo consideradas aminopeptidases no senso estrito do termo, têm sido incluídas neste grupo por vários pesquisadores (GONZÁLES et al., 1996). Observa-se que, com exceção da atividade da Pep I sobre o substrato prolina nos queijos A e B e da Pep A e da Pep X, respectivamente, sobre a glutamina e a glicina, no queijo C, a atividade específica das outras aminopeptidases e dipeptidil-aminopeptidases, com intensidades diferentes dependendo da origem do queijo.

Analisando-se o conjunto de dados apresentados na Tabela 3, verificam-se variações nos valores de atividade específica de aminopeptidases de uma mesma enzima tanto entre as diferentes origens dos queijos quanto ao longo da maturação. O queijo D apresentou maior atividade, com valores que variaram, no início e final da maturação, respectivamente, de 4,28 a 364,14U, seguido do queijo C, com 4,58 a 192,23U, do queijo B, com 1,66 a 108,78 Ue do queijo A, com 1,21 a 14,59U. Essas constatações tornam-se mais evidentes ainda quando a avaliação é realizada com base na atividade média das aminopeptidases detectadas nos

queijos ao longo de 45 dias de maturação: o queijo D apresentou 153,39U, o queijo C, 71,23U, o queijo B, 16,5U e o queijo A, 5,62U.

Devido à comprovação da localização intracelular das peptidases identificadas em bactérias lácticas, vários pesquisadores relacionaram a atividade mais elevada de aminopeptidases com a autólise bacteriana mais intensa em outras variedades de queijo (LAW et al., 1974; BIKERLAND et al. 1992; CHAPOT-CHARTIER, 1994; O'DONOVAN et al, 1996; KIERNAN et al., 2000). Portanto, pode-se concluir que ocorreu autólise mais intensa no queijo D e, em menor intensidade, no queijo C e fraca autólise nos queijos A e B.

As Figuras 20 e 21 apresentam as variações nos valores de atividade de aminopeptidases ao longo da maturação dos queijos A e B e dos queijos C e D, respectivamente. Observa-se que determinadas aminopeptidases apresentam um aumento progressivo dos valores de atividade, outras foram detectadas em níveis mais elevados no início, enquanto em outras, a atividade oscilou durante a maturação, independentemente da especificidade, da origem do queijo e do tempo de maturação.

As variações de atividades observadas ao longo da maturação podem ser atribuídas às diferentes proporções dessas enzimas encontradas durante a multiplicação bacteriana (LANGSRUD et al., 1987), a instabilidade ou degradação da enzima nas condições da maturação (FERNANDEZ-MURGA et al., 1994; ØSTLIE et al., 1995b) e/ou inibição da atividade pelo NaCl (WILKINSON et al., 1994a).

BOUTROU et al. (1998a) encontraram uma relação entre os picos de atividade da PepX e o decréscimo da população bacteriana e definiram os picos de atividade enzimática no início da maturação como sendo autólise prematura e aqueles que ocorrem no final como autólise tardia. Analisando-se os resultados da Tabela 3 e das Figuras 20 e 21, observa-se, dependendo da especificidade enzimática, atividade mais elevada desde o início da maturação em todos os queijos. Para determinadas especificidades, se observam picos levemente mais elevados entre 15 e 25 dias de estocagem. Esses resultados indicam a ocorrência de autólise prematura nesses queijos.

Tabela 3 - Atividade específica de aminopeptidases e dipeptidil aminopeptidases nos queijos A, B, C e D durante o período de estocagem a $12\pm 2^\circ\text{C}$.

Peptidase	Substrato	Origem	Unidade de atividade enzimática nos diferentes dias de estocagem				
			5	15	25	35	45
PepA	Glu- ρ -nA ²	A	ND ³	1,93	ND	5,1	ND
		B	1,42	ND	ND	ND	5,5
		C	ND	ND	ND	ND	ND
		D	30,89	49,16	45,3	51,19	44,2
PepN	Arg- ρ -nA	A	5,22	1	ND	4,19	1,58
		B	4,52	10,07	6,88	5,59	3,54
		C	175,58	215,20	192,72	161,1	142,83
		D	249,62	296,92	546,69	393,17	334,314
PepQ	Leu- ρ -na	A	0,55	2,62	0,47	ND	ND
		B	2,75	4,60	3,14	2,45	3,25
		C	111,01	125,07	132,81	106,84	98,22
		D	133,41	189,15	247,22	214,15	199,71
PepG	Ala- ρ -na	A	11,99	2,39	4,87	3,54	6,22
		B	3,72	0,52	2,83	0,171	1,08
		C	71,52	75,67	59,03	56,27	44,64
		D	122,78	143,28	156,87	114,82	115,93
PepC	Lis- ρ -nA	A	ND	4,48	3,85	ND	0,78
		B	2,39	15,89	15,9	13,07	11,96
		C	206,88	224,93	207,8	180,57	140,92
		D	276,15	378,15	432,95	352,38	328,43
PepI	Pro- ρ -nA	A	ND	ND	ND	ND	ND
		B	ND	ND	ND	ND	ND
		C	6,81	ND	ND	ND	ND
		D	5,66	7,91	2,99	3,7	1,16
PepX	Gli- ρ -nA	A	11,81	12,94	10,3	4,85	0,48
		B	ND	0,09	ND	3,08	6,67
		C	ND	ND	ND	ND	ND
		D	3,67	7,98	2,93	7,58	ND
PepX	Gli-pro- ρ -nA	A	ND	11,81	14,86	13,79	17,88
		B	39,89	83,85	214,68	81,35	124,13
		C	19,13	36,8	84,44	78,79	199,8
		D	311,7	266,6	313,93	237,96	416,54
PCP	Piro-Glu- ρ -nA	A	1,92	7,87	9,67	6,06	3,20
		B	9,84	8,03	7,57	3,70	3,75
		C	5	6	5,53	2,39	3,99
		D	8,49	8,19	8,02	4,37	10,78

¹ A unidade de atividade específica foi definida pela relação entre o número de unidades da atividade enzimática por miligrama de proteína no extrato enzimático (0,01 U.min⁻¹.mg de proteína).

² - ρ -na = ρ -nitroanilida;

³ ND= Não detectado.

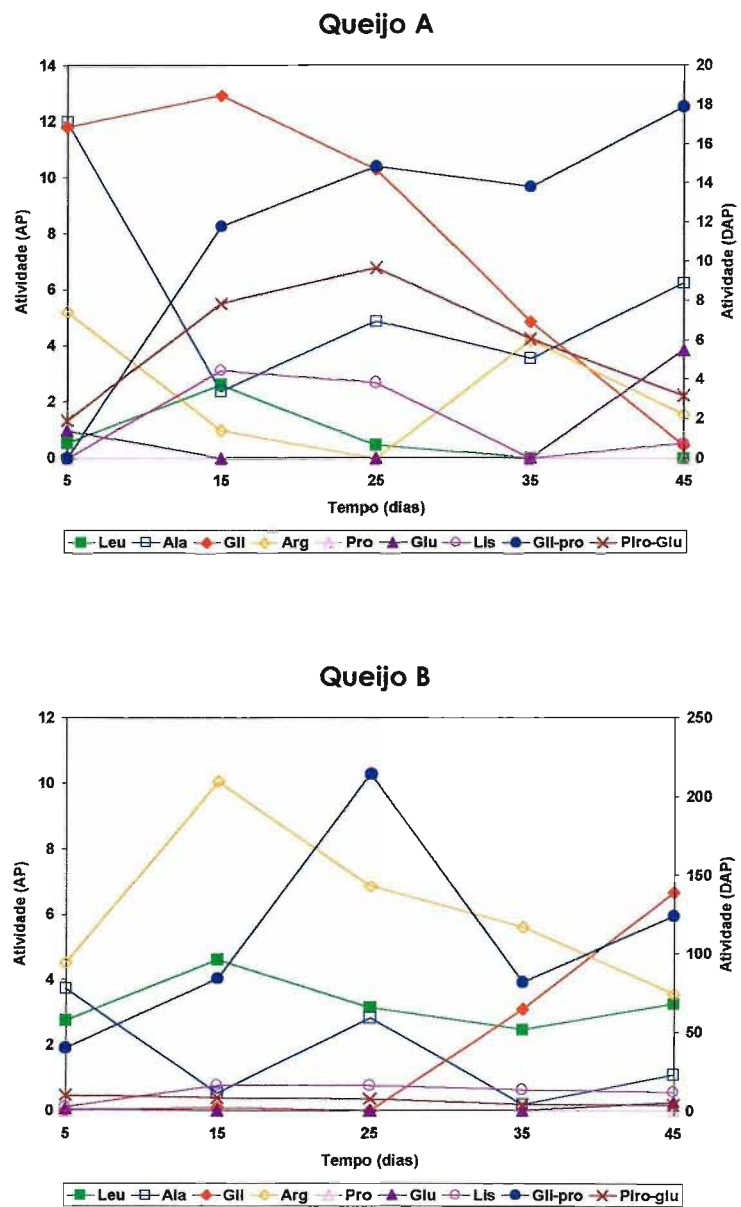


Figura 20 - Variação de atividade específica de aminopeptidases (AP) e dipeptidil aminopeptidases (DAP) nos queijos Prato A e B durante a estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

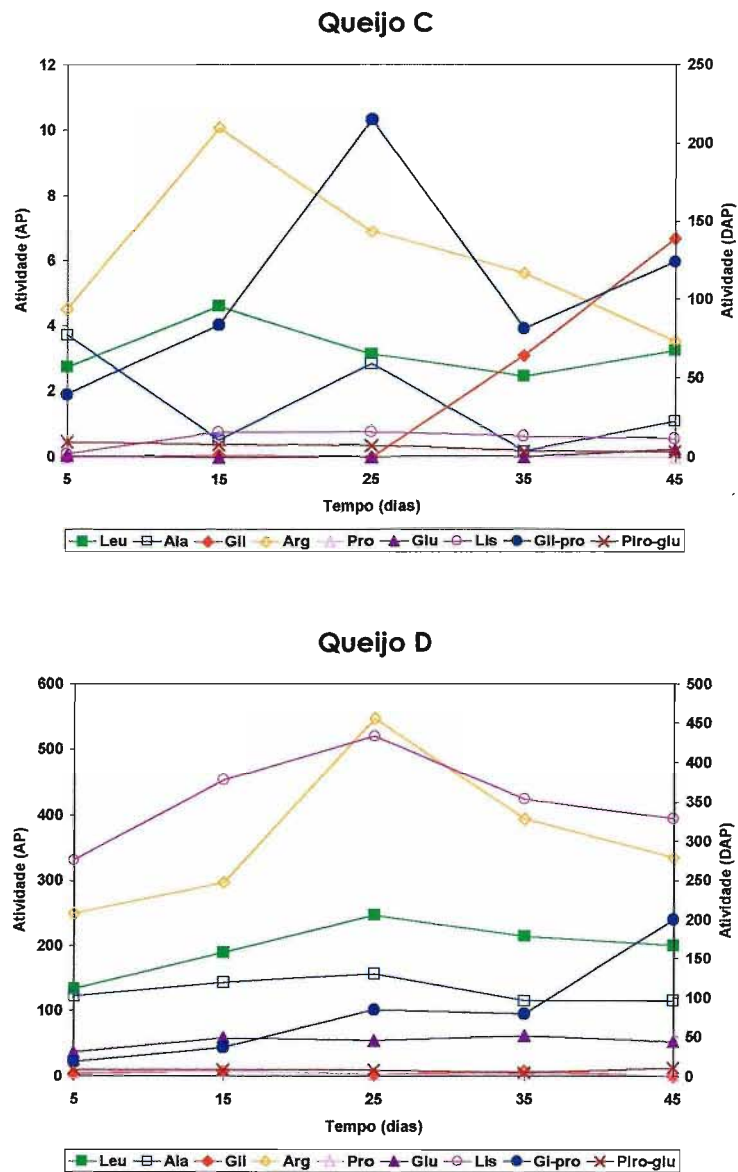


Figura 21 - Variação de atividade específica de aminopeptidases (AP) e dipeptidil aminopeptidases (DAP) nos queijos Prato C e D durante a estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

Em virtude da complexidade do sistema enzimático das bactérias lácticas, é muito difícil relacionar uma determinada especificidade enzimática com uma espécie bacteriana em particular. Isto é evidenciado principalmente para os lactococos, que apresentam poucas diferenças em seu sistema enzimático (LAW et al., 1974). No entanto, existe um consenso de que os lactobacilos apresentam atividade peptidásica maior que a dos lactococos, dependendo da linhagem. DAKO et al (1995) observaram que determinadas espécies de *Lab. casei* sp. apresentavam níveis de atividade 5 a 100 vezes maiores que *Lac. lactis* sp. e *Ped. acidilactici*. Também, MACEDO et al. (2000) observaram que uma linhagem de *Lab. paracasei* exibia maior atividade aminopeptidásica que *Leuc. mesenteroides* e *Lac. lactis* sp.

Avaliando-se o perfil de atividade de aminopeptidases da Figura 22, verificam-se diferenças de especificidade entre alguns dos queijos. Os queijos A e B apresentaram perfis similares em termos de especificidade, mas o queijo B apresentou maior liberação de lisina. Os perfis dos queijos C e D foram similares entre si e diferentes daqueles apresentados pelos queijos A e B. Porém, o queijo D apresentou atividade específica 2,2 vezes maior que a do queijo C.

COURTIN et al. (2002) demonstraram que o sistema enzimático uma linhagem de *Lac. lactis* sp. foi muito pobre em peptidases que liberam prolina e que linhagens geneticamente melhoradas com algumas peptidases de *Lactobacillus* sp. promoveram um efeito positivo na proteólise de um queijo modelo, aumentando o teor de aminoácidos totais em 3 vezes, principalmente quando peptidases específicas de prolina (Pep X, PepQ ou PepW) estavam presentes.

Uma vez que se demonstrou que somente as aminopeptidases foram capazes de degradar peptídeos amargos durante a maturação (BARTELS et al., 1987; ARDÖ et al., 1989; BAANKREIS, 1992), torna-se evidente que, além da tendência à forte autólise no período inicial da maturação, as culturas devem apresentar sistema enzimático ativo nas condições de maturação para o desenvolvimento do "flavour".

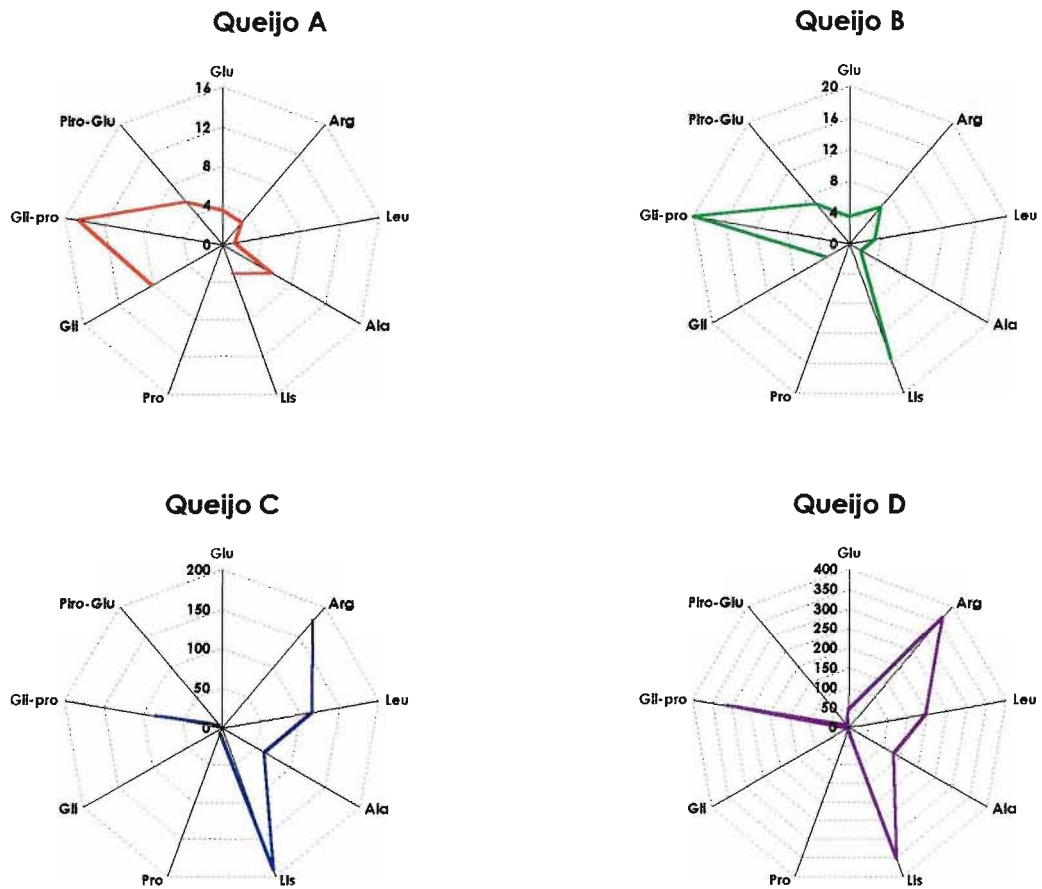


Figura 22 - Perfil de aminopeptidases e dipeptidil aminopeptidases nos queijos Prato A, B, C e D durante a estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2.2 Detecção de autolisinas livres por zimogramas

A pesquisa de autolisinas livres por zimogramas mostrou que a atividade dessas enzimas foi dependente das condições de renaturação utilizadas. Não foram evidenciadas bandas de atividade lítica nos extratos aquosos dos queijos A e B nas três condições examinadas: pH 8,0 e 44°C; pH 7,4 e 44°C; pH 6,8 e 42°C. Nos queijos C e D foram detectadas bandas líticas variáveis em número e intensidade em apenas duas dessas condições (pH 7,4 e 44°C; pH 6,8 e 42°C).

A Figura 23 apresenta os perfis de autolisinas dos queijos C e D com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de maturação. Verifica-se na condição de renaturação a pH 7,4 e 44°C, uma banda de peso molecular de aproximadamente 30 KDa, de fraca intensidade no queijo C e de maior intensidade no queijo D, e outra exclusiva do queijo D, de aproximadamente 40 KDa e de fraca intensidade.

A Figura 24 apresenta os perfis de autolisinas obtidos nos zimogramas a pH 6,8 e 42°C dos queijos C e D com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de maturação. Nesta condição de renaturação, verifica-se uma banda de aproximadamente 37KDa, de intensidade fraca no queijo C e forte no D. Além desta, observa-se mais duas bandas líticas no queijo D, de pesos moleculares mais elevados, aproximadamente 60KDa e 100KDa e de fraca intensidade.

Uma vez que somente as autolisinas capazes de se renaturar nas condições utilizadas nesta pesquisa e que apresentam atividade contra *Mic. luteus* foram reveladas, não se pode excluir a existência de enzimas líticas nos queijos A e B. Da mesma forma, o perfil de bandas líticas visualizadas nos zimogramas dos queijos C e D não representam necessariamente o número de autolisinas presentes. Segundo LECLERC e ASSELIN (1989), uma banda pode, de acordo com seu peso molecular, representar um produto de degradação de uma banda maior ou ainda de um precursor. GOVINDASAMY-LUCEY et al. (2000) relacionaram uma banda de 37KDa a um produto de degradação da autolisina AcmA.

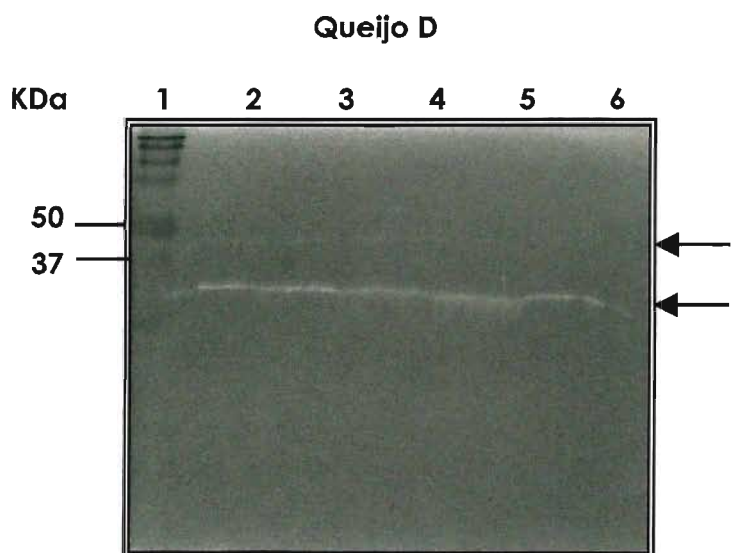
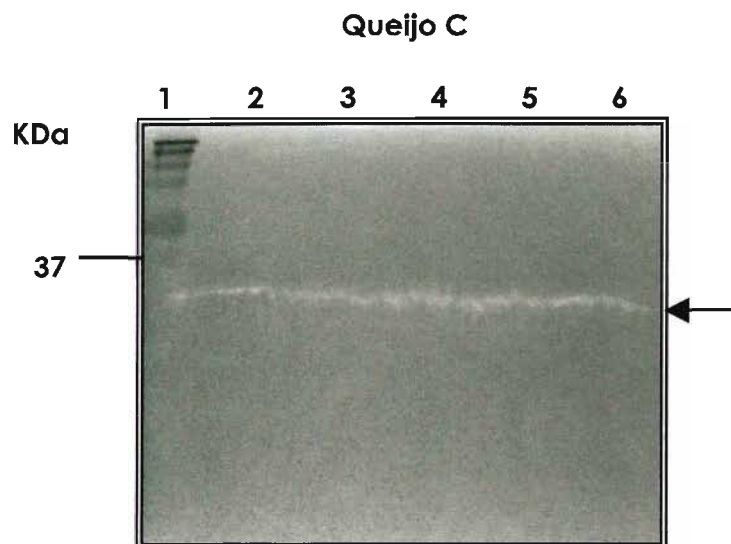


Figura 23 – Perfil de autolisinas a pH 7,4 e 44°C dos queijos C e D durante a estocagem a 12±2°C. Linha 1: padrão de peso molecular. Linhas 2 a 6: extratos de queijos com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de estocagem a estocagem a 12±2°C

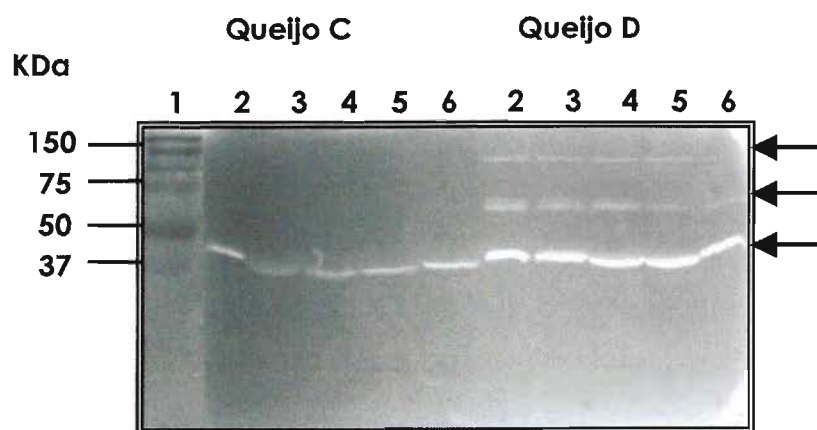


Figura 24 - Perfil de autolisinas a pH 6,8 e 42°C dos queijos C e D durante a estocagem a 12±2°C. Linha 1: padrão de peso molecular. Linhas 2 a 6: extratos de queijos após 5, 15, 25, 35 e 45 dias de estocagem.

Segundo LORTAL et al. (1997), cada espécie bacteriana apresenta o mesmo perfil de hidrolases do peptídeo glicano, em termos de número e peso molecular, diferindo somente quanto à intensidade. *Lac. lactis* sp. apresentou perfil constituído de 2 a 5 bandas com o substrato *M. luteus*, sendo uma delas de 47KDa e de alta intensidade, presente em todas as culturas (ØSTLIE et al., 1995a). *Lab. helveticus* ISLC5 e outras 30 linhagens desta mesma espécie apresentaram uma banda de 42KDa e outras 6 com pesos moleculares similares compreendidos entre 29 e 33 KDa com *M. luteus* ou *Lab. helveticus* (VALENCE & LORTAL, 1995). *Lab. casei* apresentou 4 bandas com peso molecular de 77, 71, 55 e 49KDa (VALENCE e LORTAL, 1995). Espécies de *Enterococcus* apresentaram autolisinas de alto peso molecular, entre 130KDa e 87KDa (CHAPOT-CHARTIER, 1996).

Uma vez que o perfil de autolisinas para determinada espécie pode variar dependendo das condições de renaturação e substrato utilizados, é muito difícil comparar os resultados obtidos nesta pesquisa com os desses autores.

4.2.3 Detecção imunológica de marcadores de lise por "immunoblotting"

A Figura 25 apresenta os resultados das análises de "immunoblotting" para a detecção de enzimas intracelulares de *Lac. lactis* sp. nos queijos A, B, C e D com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizando-se o antisoro anti-LC, que apresenta um perfil constituído de várias bandas, de 100, 75, 50, 43 e 40KDa.

Nos extratos aquosos dos queijos A e B não se visualiza nenhuma banda de reação positiva correspondente àquela revelada com o citoplasma bruto da linhagem referência *Lac. lactis* subsp. *lactis*, usada como controle positivo. Esses resultados foram coerentes com aqueles dos zimogramas, onde não foi detectada a presença de autolisinas nas condições de renaturação utilizadas.

Ao contrário, nos queijos C e D (Figura 25), verifica-se um sinal de reação de 100KDa correspondente ao sinal positivo no citosol de *Lac. lactis* sp., presente em todos os períodos de maturação (5 a 45 dias). Também se verificam outros sinais de reação positiva, porém, não específicos da espécie estudada.

As bandas com sinais de reação positiva e não específicas da espécie estudada são atribuídas às proteínas das espécies homólogas que reagem com o

antisoro anti-LC, levando às reações cruzadas. Normalmente, *Lact. lactis* sp. apresenta reação cruzada fraca com espécies de lactobacilos termofílicos e forte com *Leuconostoc* sp. e *Str. termophilus* (VALENCE, 1999).

A Figura 26 apresenta os resultados das análises de "imunoblotting" para a detecção de enzimas intracelulares de *Lab. helveticus* nos queijos A, B, C e D com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de maturação, utilizando-se o anti-soro D-lactato desidrogenase (anti-D-LDH). Nos extratos aquosos dos queijos A e B não se visualiza nenhum sinal de reação positiva, correspondente à banda de 37KDa revelada com o citoplasma bruto da linhagem referência *Lab. helveticus*.

Em contraposição, nos extratos dos queijos C e D (Figura 26), verifica-se a presença de um sinal de reação positiva de forte intensidade e relativo à banda de peso molecular de aproximadamente 37KDa, correspondente à proteína D-LDH, indicando a lise de *Lab. helveticus*. A lise foi detectada desde o início (5 dias) e manteve-se constante em todo o período de maturação. Este marcador é bem específico e apresenta reação cruzada somente com as subespécies de lactobacilos termofílicos, *Lab. delbrueckii* sp. e *Lab. lactis* sp. (VALENCE, 1999).

VALENCE e LORTAL (1998), atribuíram os sinais fracos de reação positiva, revelada por uma banda com um peso molecular um pouco menor do que aquele do antisoro PepD de *Lb. helveticus*, a uma reação cruzada com *Lab. lactis*, uma vez que uma banda de peso molecular similar havia sido identificada nessa espécie.

Por constituir-se em um método qualitativo, a ausência de bandas detectáveis pelo marcador é atribuída a uma lise muito fraca. O perfil de reação positiva da espécie estudada é definido pelo número e intensidade de bandas reveladas e, sobretudo, pelo peso molecular (VALENCE, 1999). Assim, mesmo que algumas das bandas reveladas com o antisoro anti-Lc, principalmente nos queijos C e D, apresentassem peso molecular similar àquele da referência, por estarem presentes em número inferior e com menor intensidade às aquelas reveladas com o citoplasma bruto de *Lac. lactis* subsp. *lactis* (controle positivo) não podem ser consideradas específicas de lactococos.

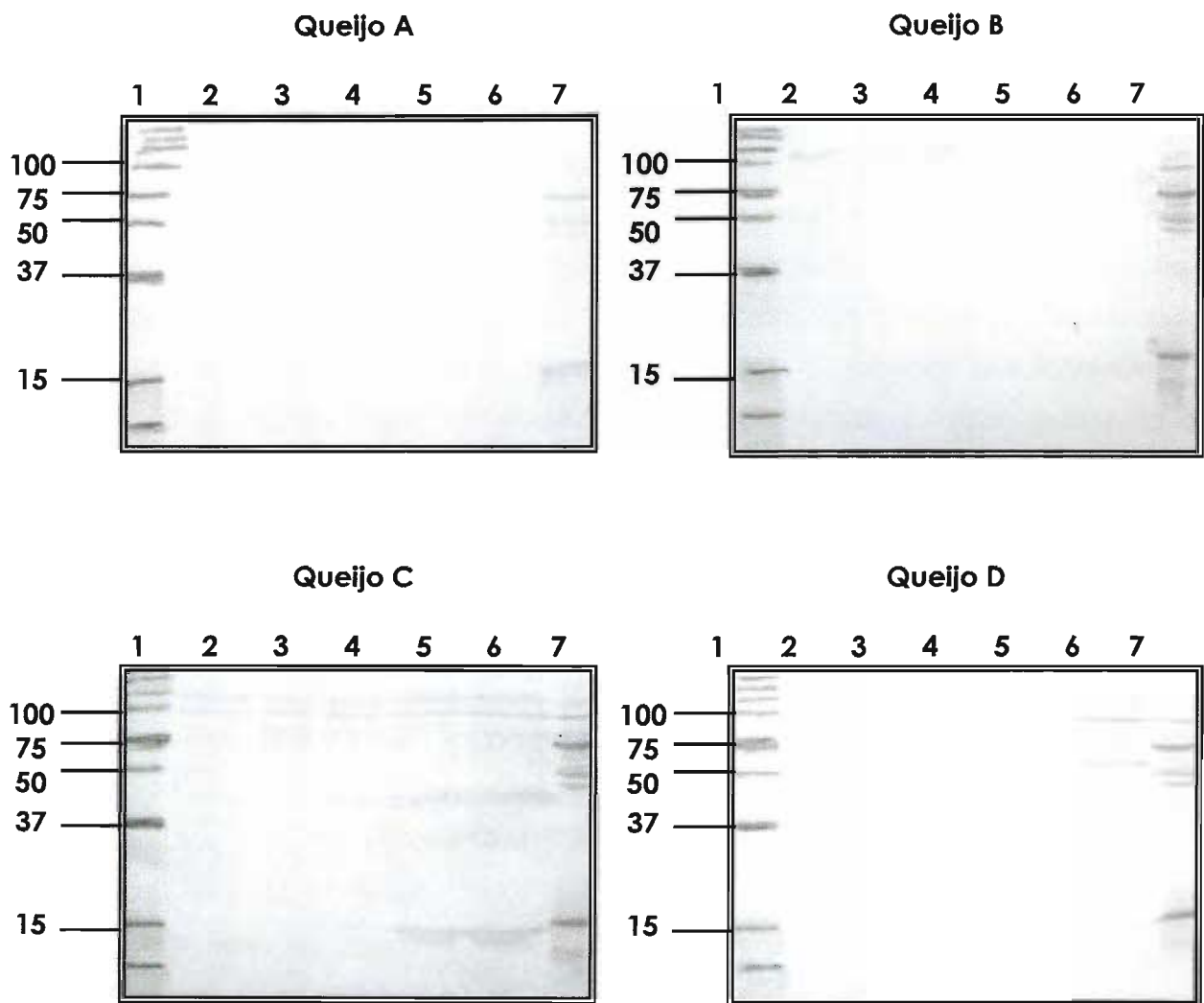


Figura 25 - Intensidade de autólise de *Lac. lactis* sp. nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$. Linha 1: padrão de massa molecular de proteínas. Linhas 2 a 6: queijos com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de maturação. Linha 7: citoplasma bruto de *Lac. lactis* subsp. *lactis* sp. usado como referência.

Concluiu-se, portanto, que a autólise de *Lc. lactis* spp. foi praticamente inexistente nos queijos das quatro origens. Uma vez que *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lac. lactis* subsp. *cremoris* e *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* fazem parte do fermento láctico utilizado para o processamento do queijo Prato, a fraca autólise dessas subespécies foi um resultado não esperado.

Como neste estudo foram analisados queijos provenientes de laticínios de quatro regiões diferentes e, portanto, com matéria-prima de diferentes composições físico-químicas e de processos de fabricação distintos, torna-se difícil definir quais foram os fatores responsáveis pela inibição da autólise dos lactococos nesses queijos. Todavia, pode-se pressupor que os lactococos adicionados na fabricação do queijo Prato das quatro origens apresentaram maior resistência à autólise, em decorrência da degradação das autolisinas, principalmente da AcmA por proteinases, pois a origem desses fermentos constituiu-se, provavelmente, no único fator em comum entre todos os queijos examinados.

Esta hipótese tem como base as constatações de que a autolisina AcmA de *Lac. lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 foi susceptível à degradação enzimática por proteinases localizadas na na parede celular da própria linhagem (MARTINEZ-CUESTA et al., 1970, por proteinases do tipo PI (BUIST et al., 1998) e pela lactostepicina I (BUIST et al., 1998). As mesmas constatações foram feitas por GOVINDASAMY-LUCEY et al. (2000) ao observarem a degradação da autolisina AcmA em seis linhagens comerciais de *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, que apresentavam a lactostepcina I (EC 3.4.21.96) e que o mesmo na culturas derivadas lactostepcina-negativas.

A degradação da autolisina AcmA nos queijos A, B, C e D, explicaria, em parte, os resultados dos zimogramas dos queijos A e B, onde não se verificou a presença de bandas líficas. BUIST et al. (1998) constataram, pela análise em zimogramas, que as bandas de atividade lífica da AcmA, de 46KDa e 41KDa, correspondentes às formas precursora e madura, desapareciam após incubação com uma proteinase do tipo PI. Contudo, outros fatores ainda não determinados podem ter sido responsáveis pela inibição da autólise de *Lac. lactis* sp. nos queijos das quatro origens.

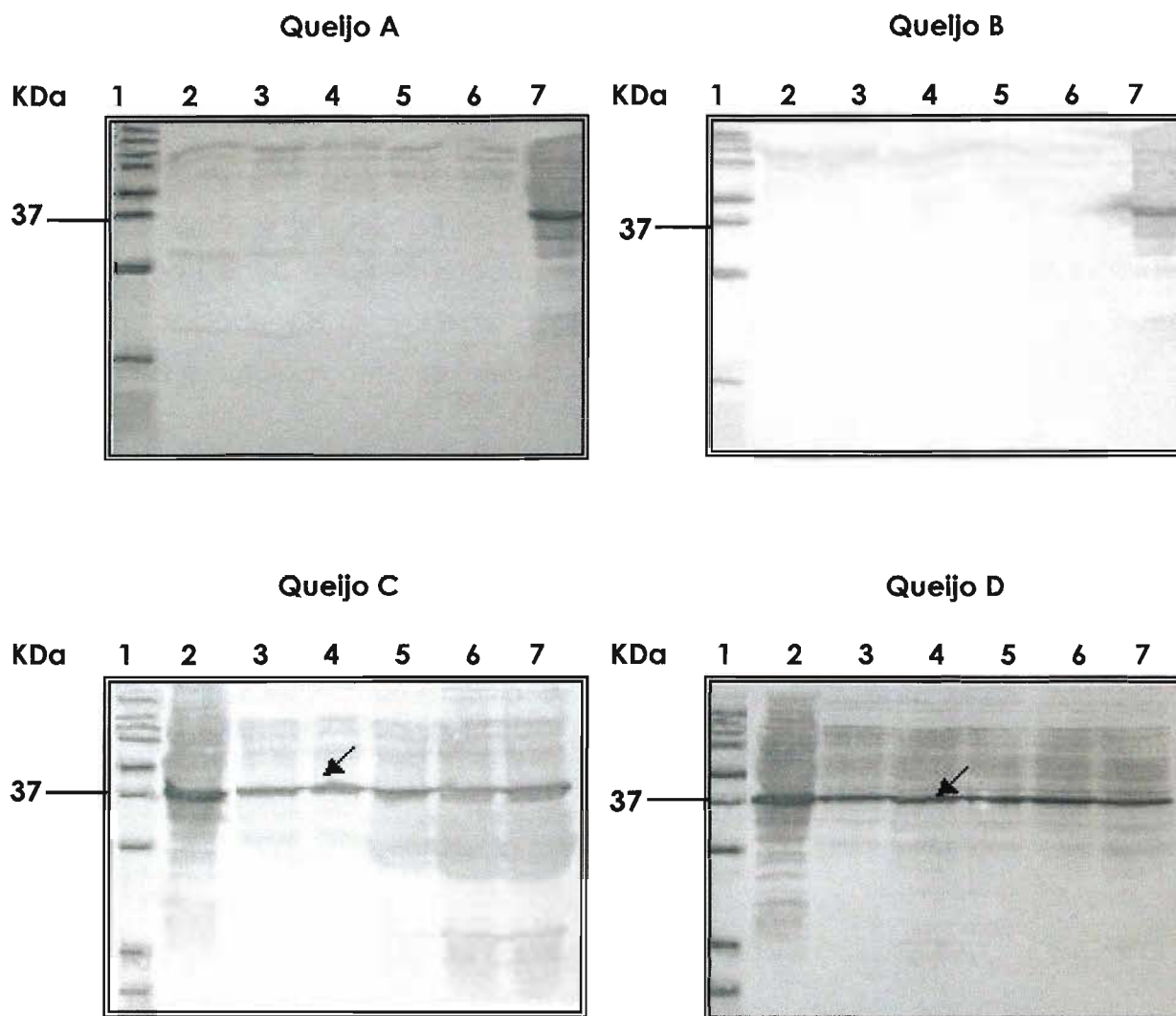


Figura 26 - Intensidade de autólise de *Lb. helveticus* nos queijos A, B, C e D durante estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$. Linha 1: padrão de massa molecular de proteínas. Linhas 2 a 6: queijos após 5, 15, 25, 35 e 45 dias de maturação. Linha 7: citoplasma bruto de *Lab. helveticus* usado como referência.

Comparando-se os resultados obtidos no "immunoblotting" com os dos zimogramas, verificou-se uma similaridade entre a autolisina de massa molecular de 37KDa, detectada no zimograma, com o sinal de reação positiva no "Immunoblotting" nos extratos dos queijos C e D. As outras bandas dos zimogramas não correspondentes àquelas de reação imunoenzimática podem ter surgido pela sensibilidade entre os dois métodos, pela presença de uma proteína que perdeu sua capacidade de reconhecer o anti-soro ou ainda pela presença de outras autolisinas imunologicamente distintas, conforme ponderado por PILLIGGE et al. (2002).

Independentemente do número e da intensidade das bandas, nota-se que as autolisinas foram liberadas nos extratos dos queijos C e D no período inicial da maturação (5 dias), resultados que sugerem que a autólise de *Lab. helveticus* ocorreu durante a etapa de processamento ou pelo choque térmico causado pela alteração brusca da temperatura de fabricação (30°C) para a de estocagem (12°C). Considerando-se as constatações de que *Lab. helveticus* apresentou autólise intensa em temperatura entre 40 a 45°C (LORTAL et al., 1991) e de que 95% de células de uma linhagem desta mesma espécie se autolisava a 40°C (EL-KHOLY et al., 1998), pode-se aventar a hipótese de que a temperatura de cozimento da massa, efetuada durante o processamento do queijo Prato, pode ter induzido a autólise dessa espécie nos queijos C e D.

VALENCE et al. (1998) constataram a autólise de *Lab. helveticus*, que ocorreu no final da etapa prensagem de fabricação de queijo Emental, levando um impacto positivo na proteólise. Esse fato também foi observado nas espécies termofílicas, *Lab. delbrueckii* subsp. *lactis* em queijo Gruyère (MEYER e SPAHNI, 1998), *Propionibacterium* sp. (VALENCE et al., 1998) e *Str. thermophilus* em queijo Emental (DEUTSCH et al., 2002).

KLEIN-IBLED (2001) constatou que *Lab. helveticus* tem um sistema de peptidases muito eficiente e que a utilização desta espécie na fabricação de queijos teve um efeito positivo na extensão da proteólise, principalmente na formação de aminoácidos livres. EL-KHOLY et al. (1998) verificaram que uma linhagem dessa mesma espécie apresentou maior atividade de aminopeptidases e dipeptidil-aminopeptidases que lactobacilos mesofílicos, *Lab. plantarum* e *Lab. casei*. COURTIN et al. (2002) indicaram que o sistema proteolítico dos lactobacilos é composto por um número maior de peptidases e elas apresentam maior nível de

expressão, comparativamente ao *Lac. lactis*. Além disso, ao menos duas peptidases (APII e APIV) foram relacionadas à degradação de peptídeos amargos (PROST e CHAMBA, 1994). Portanto, a lise de *Lab. helveticus* constatada nos queijos C e D nesta pesquisa, corroborada pela maior liberação de aminopeptidases e dipeptidil aminopeptidases, permite supor que ocorra uma proteólise mais intensa e portanto uma maior liberação maior de aminoácidos livres nesses queijos.

Os resultados obtidos nesta pesquisa mostram as primeiras evidências da fraca autólise de *Lac. lactis* sp. em queijos provenientes de laticínios de quatro diferentes regiões brasileiras e a autólise intensa de *Lab. helveticus* em dois desses laticínios, São Paulo (C) e Minas Gerais (D), já no início e mantendo-se constante em todo o período de maturação. Assim, no sentido de averiguar a influência da lise de lactococos nos queijos A e B e da forte lise de *Lab. helveticus* nos queijos C e D, as taxas de proteólise e os níveis de aminoácidos livres desses queijos foram determinados.

Conclui-se que a autólise é um fenômeno complexo e influenciado por vários fatores e que mais estudos são necessários para defini-los. A fraca lise de lactococos nos queijos A e B constituiu-se em um fator limitante para proteólise. Mas, nos queijos C e D, a presença de *Lab. helveticus* pode acelerar a proteólise e principalmente intensificar o "flavour" desses queijos, uma vez que constatou-se neles uma maior atividade de aminopeptidases.

4.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS QUEIJOS

Além de influenciarem o desenvolvimento da microbiota dos queijos, as propriedades físico-químicas são importantes para as reações desenvolvidas na maturação, principalmente a proteólise. Assim foram determinados os parâmetros pH, atividade de água (Aa), umidade, extrato seco total, gordura, gordura no extrato seco total, cinzas, lactose, sal, sal na umidade, nos queijos A, B, C e D após 5, 15, 25, 35 e 45 dias de estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

Analisando-se os resultados demonstrados nas Tabelas 4 e 5, pode-se observar que todos os parâmetros analisados nos queijos das quatro origens no início da maturação (5 dias), estavam de acordo com os dados da literatura (BALDINI, 1997; SILVA, 1998) e com a legislação vigente brasileira (BRASIL, 1997).

Contudo, pequenas diferenças observadas para os parâmetros umidade e a relação sal/umidade (S/U) podem ter influenciado a ocorrência da autólise e, consequentemente a proteólise, com impacto direto no “flavour” dos queijos.

Os queijos A, B e D apresentaram valores mais adequados de pH (Tabela 4) para o desenvolvimento da proteólise que o do queijo C, uma vez que ela se torna mais lenta em pH abaixo de 5,5 (FURTADO e LOURENÇO-NETO, 1979; SCOTT, 1986; FARKYE e FOX, 1990). A utilização de uma etapa de pré-maturação do leite, fermento láctico mais ativo e/ou lavagem da massa insuficiente durante a fabricação podem ter levado ao menor valor de pH no queijo C, o que pode ter afetado a atividade das aminopeptidases e, como resultado, pode ter reduzido a proteólise durante a maturação (MÉNENDEZ et al., 2000).

Segundo a literatura, o pH do queijo tende a aumentar com o avanço da maturação em decorrência da formação de compostos nitrogenados solúveis que tendem a neutralizar a acidez da massa, além do catabolismo do ácido láctico pelas NSLAB (FARKYE e FOX, 1990). Entretanto, deve-se considerar que a proteólise do queijo Prato não é tão intensa quanto à de outros tipos de queijos.

Analisando-se os dados da Tabela 8 observa-se, ao longo da maturação, uma tendência progressiva de queda de 0,2 unidade no queijo A e oscilações de aproximadamente $\pm 0,2$ unidade em diferentes períodos. Pequenas variações de pH foram constatadas por alguns autores. MINUSSI et al (1995) encontraram uma evolução normal de +0,2 unidade após 60 dias de maturação. MENEZES et al., (1976) analisando 20 amostras de queijo Prato fabricadas com diferentes coagulantes, também verificaram pequenas variações de pH de -0,3 a +0,4 unidade durante 5 semanas de maturação. Uma outra explicação pode ser o fato do queijo representar um sistema dinâmico (FOX, 1987), o que explicaria as diferenças de pH observadas neste trabalho.

Embora a Aa (Tabela 4) no queijo C tenha sido menor que nos queijos A, B e D (0,993), todos os valores foram próximos do requerimento mínimo para atividade metabólica e multiplicação de *Lc. lactis* (0,965), *Str. thermophilus* (0,984) e *Lab. helveticus* (0,962) (BERESFORD et al., 1991).

Tabela 4 - Valores médios de pH e atividade de água (Aa) dos queijos Prato das origens A, B, C e D durante o período de estocagem a 12±2°C.

Determinação	Origem	Valores médios nos diferentes dias de estocagem				
		5	15	25	35	45
PH ¹	A	5,57	5,65	5,38	5,40	5,37
	B	5,63	5,71	5,52	5,76	5,45
	C	5,34	5,55	5,37	5,48	5,49
	D	5,57	5,50	5,42	5,69	5,43
Aa ²	A	0,992	0,994	0,991	0,990	0,990
	B	0,993	0,994	0,991	0,993	0,990
	C	0,986	0,989	0,987	0,987	0,987
	D	0,993	0,991	0,989	0,992	0,989

¹ Análise realizada apenas uma vez.

² Resultados calculados.

No início da maturação (5 dias) foram observadas variações significativas ($p < 0,05$) na concentração de lactose (Tabela 5) entre todos os queijos. O queijo C apresentou maior concentração, seguido dos queijos B, A e D. Estas concentrações são dependentes de fatores inerentes ao processo de fabricação como remoção de parte do soro, do tipo de salga, da lavagem da massa, bem como da atividade acidificante do fermento láctico utilizado (ACCOLAS et al., 1977).

Ao longo da maturação, a lactose remanescente foi consumida pelas bactérias lácticas adicionadas e NSLAB presentes nesses queijos (WILLIAMS et al., 2000), sendo detectadas em concentrações insignificativas após 45 dias. Os substratos para as NSLAB, detectadas em níveis elevados nos queijos das quatro origens, podem ter sido originados a partir das células lisadas (galactose e ribose) e lactato (WILLIAMS et al., 2000), embora nem todos os lactobacilos sejam capazes de utilizá-los como fonte de energia (LINDGREN et al., 1990; MARTLEY e CROW, 1993; WILLIAMS et al., 2000).

Embora os padrões legais vigentes estabeleçam teor máximo de umidade igual a 45% (BRASIL, 1997), o queijo C estava significativamente ($p < 0,05$) mais úmido que os outros queijos. Os queijos B e D apresentaram menor umidade (Tabela 5). Essas variações podem ser decorrentes de diferenças no processo de fabricação, como tamanho dos grânulos, tempo de agitação, teor de sal e atividade acidificante do fermento láctico, que determinaram a consistência dos queijos e podem influenciar na proteólise durante o período de maturação (ACCOLAS et al., 1977).

O teor de sal no início da maturação (5 dias) (Tabela 5) foi significativamente ($p < 0,05$) mais elevado no queijo C do que nos queijos A e B, que não diferiram entre si. Menor teor foi detectado no queijo D. Essas variações revelaram possíveis diferenças no procedimento de salga, o que pode interferir nas características organolépticas, no desenvolvimento das culturas lácticas, bem como no teor final de umidade dos queijos, afetando sua textura. Em virtude dessas diferenças e daquelas do teor de umidade, os resultados da relação sal na umidade (S/U) diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre os queijos das quatro origens (Tabela 5). O queijo C apresentou o valor mais elevado, seguido do queijo B, A e D.

A umidade mais elevada no queijo C (Tabela 5), que era mais ácido e apresentava maior teor de sal na umidade do que os outros queijos, pode ser decorrente de diferenças tecnológicas, como maturação do leite antes da coagulação, maior tempo de salga ou salmoura mais concentrada, corte da massa em tamanho um pouco maior, ponto da massa um pouco mais cedo ou maior pressão de prensagem final (PEREIRA, 1975).

Com relação ao parâmetro teor gordura no extrato seco (GES) (Tabela 5), os valores encontrados para os queijos A e B foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que para os queijos C e D. Mas, todos se situaram de acordo com a legislação vigente brasileira, que estabelece teor de gordura no extrato seco na faixa de 45 a 59% (BRASIL, 1997) e coerentes com os dados citados da literatura, que apresentam valores entre 47,7 a 51% (FURTADO e WOFSCHOON-POMBO, 1979; SCHIFTAN e KOMATSU, 1980). As variações do teor de GES detectadas entre os queijos podem ser atribuídas às diferenças de composição do leite e formas de tratamento da massa, como por exemplo, o corte prematuro (ACCOLLAS et al, 1977).

Analisando-se os teores de proteínas totais (Tabela 5) dos queijos das quatro origens, verificou-se que o valor do queijo B foi significativamente maior ($p < 0,05$) que os dos queijos A, C e D, que não diferiram entre si. Além da composição do leite, a forma de tratamento da massa durante a fabricação dos queijos pode interferir na concentração de proteína. Uma agitação muito violenta e/ou corte do coágulo antes do ponto acarretam a perda de proteínas para o soro. Segundo MENDES (1997), um queijo de massa semi-dura como o Prato deve apresentar em sua composição média cerca de 23 a 26% de proteína. Valores de 20,46% a 26,19% são também encontrados na literatura (LEITE et al., 2002).

Verificou-se que não houve variação do teor de cinzas (Tabela 5) no início da maturação dos queijos das quatro origens, os quais encontram-se de acordo com os dados citados na literatura (BALDINI, 1998; SILVA, 1998).

Numa avaliação geral, observa-se uma falta de uniformidade na composição dos queijos, principalmente os valores de pH e os teores de sal na umidade (S/U) do queijo C, que pode ser influenciada pela tecnologia de fabricação e composição físico-química do leite. Essas variações podem influenciar nas reações de proteólise, desde que alguns autores constataram que a atividade peptidásica é fortemente influenciada pelo pH e concentração de NaCl (ARORA e LEE, 1992; BAANKREIS, 1992; LAAN et al., 1998; LAAN et al., 1998).

Tem-se observado que o pH ótimo para atividade da PepN, PepA, PepX, PCP e da prolil-iminopeptidase de diferentes espécies de bactérias lácticas situou-se entre 6,5 e 8,0 (ARORA e LEE, 1992; BAANKREIS, 1992). Uma redução do pH de 7,0 para 5,2 afetou negativamente a atividade de aminopeptidases sobre os substratos lisina, alanina, prolina, asparagina e ácido piroglutâmico (LAAN et al., 1998). Concentração de NaCl acima de 3% reduziu a atividade de aminopeptidases de *Lc. lactis* sp. (LAAN et al., 1998). A atividade diminuiu com a redução do pH de 7,5 para 5,2 em presença de 125mM de CaCl₂. Por outro lado, as aminopeptidases de *Lactobacillus* spp. retiveram 80% de atividade a concentrações de 4% de NaCl (DAKO et al., 1995). Um aumento do nível de sal na umidade nos queijos de 0,4 para 5% foi acompanhado pelo aumento da atividade da LDH e G6PDH (LAAN et al., 1998).

Como a influência do pH e NaCl na atividade enzimática é fortemente dependente da linhagem e da especificidade enzimática, pode-se concluir que, embora tenha sido detectada a autólise de *Lab. helveticus* no queijo C, a atividade enzimática foi cerca de 50% menor que a do queijo D, devido ao menor valor de pH neste queijo em adição ao maior teor de S/U. Outro fator a ser destacado é que esses parâmetros também podem ter apresentado um efeito negativo na atividade das autolisinas. Segundo EL-KHOLY et al. (1998a), a autólise de *Lab. helveticus* foi fortemente influenciada pelo fator pH: a autólise diminuiu de 87% para 57% com a redução do pH de 5,5 para 4,5.

Tabela 5 - Valores médios das análises de composição química dos queijos Prato das origens A, B, C e D durante o período de estocagem a 12±2°C.

Determinação	Origem	Valores nos diferentes dias de estocagem					dms
		5	15	25	35	45	
Lactose (%)	A	0,25±0,00 A ⁴ C ⁵	0,15±0,00 Ba	0,04±0,00 Cc	0,02±0,00 Dd	0,02±0,02 Db	0,01
	B	0,31±0,00 Ab	0,29±0,00 Bb	0,17±0,00 Ca	0,08±0,00 Da	0,03±0,00 Eb	0,01
	C	0,53±0,00 Aa	0,46±0,02 Ba	0,06±0,00 Cb	0,06±0,06 Cb	0,04±0,00 Da	0,02
	D	0,07±0,00 Ad	0,07±0,07 Ad	0,07±0,00 Ab	0,04±0,00 Bc	0,03±0,00 Bab	0,01
	dms	0,02	0,01	0,11	0,01	0,30	
Umidade (%) ¹	A	41,40± Ab	59,75± Bc	59,03± Bc	58,40± Bc	59,86± Ac	0,57
	B	38,64± Ba	61,61± Ba	61,50± Ba	62,32± Aa	60,86± Cb	0,28
	C	44,41± Bc	56,73± Ad	55,69± Bd	56,47± Ad	55,68± Cd	0,73
	D	38,29± Aa	61,35± Ab	63,23± ABb	61,32± ABb	61,73± Bc	1,42
	dms						
EST (%)	A	58,60±0,01 Ab	59,75±0,06 Ac	59,03±0,04 Ac	58,40±0,30 Ac	59,86±0,07 Ac	1,67
	B	61,37±0,02 Ba	61,61±0,01 Ba	61,50±0,06 Bb	62,32±0,14 Aa	60,86±0,04 Cb	0,28
	C	55,57±0,00 Bc	56,73±0,03 Ad	55,69±0,07 Bd	56,47±0,06 Ad	55,68±0,39 Cd	0,73
	D	61,71±0,59 Aba	61,35±0,11 Ab	63,23±0,29 Ab	61,32±0,42 ABb	61,73±0,04 Ba	1,42
	dms	1,20	0,19	0,86a	0,73	0,85	
Sal (%)	A	1,25±0,02 Ab	1,11±0,04 ABC	1,12±0,00 Bc	1,16±0,03 Bc	0,94±0,00 Cd	0,09
	B	1,29±0,04 Ab	1,27±0,00 Ab	1,30±0,00 Ab	1,31±0,03 Ab	1,31±0,02 Ab	0,10
	C	1,88±0,02 Aa	1,85±0,00 Aa	1,78±0,02 Ba	1,86±0,02 Aa	1,81±0,02 Ba	0,07
	D	1,02±0,02 Bc	1,03±0,00 Abd	1,05±0,02 Abc	1,08±0,00 Ac	1,07±0,02 Ac	0,07
	dms	0,11	0,08	0,09	0,09	0,08	
S/U ³	A	3,02±0,00 Ac	2,76±0,10 Bc	2,72±0,00 Bc	2,81±0,08 ABC	2,34±0,02 Cd	0,24
	B	3,33±0,09 Ab	3,31±0,00 Ab	3,37±0,04 Ab	3,47±0,08 Ab	3,36±0,04 Ab	0,24
	C	4,23±0,05 Aa	4,28±0,00 Aa	4,01±0,04 Aa	4,28±0,04 Aa	4,08±0,08 Aa	0,20
	D	2,45±0,06 Bd	2,55±0,00 Abd	12,57±0,06 Abc	2,61±0,02 Ac	2,71±0,00 Ac	0,15
	dms	0,26	0,19	0,16	0,25	0,20	
GES (%) ²	A	55,07±0,01 Aa	54,01±0,05 Bc	54,66±0,04 Ac	55,18±0,28 Ab	53,91±0,06 Bc	0,54
	B	55,10±0,02 Ba	54,88±0,00 Bb	54,93±0,05 Bb	54,25±0,12 Cc	55,55±0,04 Ab	0,25
	C	49,50±0,00 Ac	48,51±0,03 Bd	49,42±0,06 Ad	48,73±0,05 Bd	49,93±0,35 Dd	0,65
	D	52,29±0,01 Ab	52,87±0,06 Ba	51,60±0,04 Aa	52,52±0,31 Aa	51,36±0,06 Ca	0,58
	dms	0,05	0,16	0,21	0,90	0,74	
Cinzas (%)	A	3,24±0,03 Aa	3,18±0,00 Bb	3,07±0,00 Cb	3,23±0,00 Ab	3,25±0,00 Aa	0,53
	B	2,97±0,03 Aa	2,98±0,04 Ac	2,84±0,05 Ac	2,94±0,02 Ac	2,88±0,05 Ab	0,17
	C	3,24±0,03 Aa	3,18±0,00 Bb	3,67±0,00 Cb	3,23±0,00 Ab	3,25±0,00 Aa	0,05
	D	3,24±0,16 Aa	3,41±0,00 Aa	3,50±0,01 Aa	3,40±0,02 Aa	3,42±0,15 Aa	0,42
	dms	0,37	0,08	0,11	0,06	0,33	
Proteína (%)	A	22,45±0,05 Ab	21,70±0,09 Aa	21,88±0,80 Aa	22,04±0,00 Aa	23,00±0,83 Aa	2,09
	B	23,29±0,09 Ba	22,51±0,06 Da	22,47±0,13 Da	23,48±0,02 Aa	23,04±0,04 BCa	0,31
	C	22,01±0,12 Ab	23,63±1,16 Aa	22,47±0,13 Aa	21,78±0,99 Aa	23,05±0,19 Aa	2,78
	D	22,03±0,23 Cb	23,05±0,15 Bca	22,99±0,13 Ba	23,11±0,12 Aba	23,72±0,01 Aa	0,58
	dms	0,01	2,38	1,70	2,05	1,76	

Teor de gordura: A: 32,27; B: 33,81; C: 27,52; D: 34,92

¹EST: Extrato seco total.

²GES: Gordura em base seca.

³S/U Relação sal/umidade.

⁴As amostras (média ± desvio padrão) seguidas de letras maiúsculas (A, B, C, D) diferentes na mesma linha diferem significativamente ao nível de erro de 5% para o fator tempo.

⁵As amostras (média ± desvio padrão) seguidas de letras minúsculas (a, b, c, d) diferentes na mesma coluna diferem significativamente ao nível de erro de 5% para os queijos.

4.4 EVOLUÇÃO DA PROTEÓLISE DURANTE A MATURAÇÃO

Vários pesquisadores evidenciaram um impacto positivo da autólise no desenvolvimento da proteólise, principalmente com relação à liberação de aminoácidos livres, à redução do sabor amargo, e à intensificação do "flavour" nos queijos (CROW et al., 1995; LEPEUPLE et al., 1998; MEYER et al., 1998).

A Tabela 6 apresenta os valores de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6) e nitrogênio não protéico (NNP) nos queijos A, B, C e D com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de estocagem a 12°C. No início da maturação, o valor de NT do queijo B foi significativamente maior ($p < 0,05$) que os dos queijos A, C e D, que não diferiram entre si. No final da maturação, não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores de NT entre os queijos das diferentes origens. Todos os valores estavam de acordo com àqueles citados na literatura (BALDINI, 1998; SILVA, 1998).

Com relação ao teor de NS-pH 4,6 (Tabela 6) não foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os queijos no início da maturação (5 dias). Porém, ao longo da maturação, observou-se um aumento gradual desses valores, da ordem de 106%, 115%, 124% e 141% para os queijos A, B, C e D, respectivamente. No final da maturação, o queijo D apresentou valor significativamente maior ($p < 0,05$) do que os dos queijos B e C, que não diferiram entre si. O queijo A apresentou o menor valor. Os resultados apresentados pelos queijos B, C e D foram similares àqueles descritos por BALDINI (1998), 0,32 e 0,50% para queijo Prato com 7 e 40 dias de maturação, respectivamente.

No ponto isoelétrico, as caseínas intactas e aquelas levemente degradadas que se encontram na solução do queijo, são precipitadas. Peptídeos de alto peso molecular, peptídeos de cadeia curta e aminoácidos encontram-se nessa solução (CHRISTENSEN et al., 1991). A formação de NS-pH 4,6 se deve principalmente à ação do coagulante residual sobre a α_{s1} -caseína e, em menor proporção, à ação da plasmina sobre a β -caseína e daquelas de bactérias lácticas sobre a α_{s1} -caseína e β -caseína (WOFSCHOON-POMBO, 1983; GRIPON et al., 1985; ZEVACO e DESMAZEAUD, 1980; FARKIE, 1992). O acompanhamento destes dados num queijo permite conhecer melhor o índice de aproveitamento dos elementos do leite na

coalhada, a atividade proteolítica do coalho, das culturas lácticas e das enzimas nativas do leite (BALDINI, 1998).

Analisando-se os resultados de NNP (Tabela 6) no início da maturação (5 dias), verificou-se valor significativamente mais elevado ($p < 0,05$) no queijo D do que nos queijos B e C, que não diferiram entre si. O queijo A apresentou o menor valor. Ao longo da maturação, observou-se um aumento gradual desses valores, da ordem de 200%, 160%, 133% e 200% para os queijos A, B, C e D, respectivamente. No final da maturação, verificou-se valor significativamente mais elevado ($p < 0,05$) no queijo D do que nos queijos B e C, que não diferiram entre si. O queijo A apresentou o menor valor.

A fração solúvel em TCA 12% contém peptídeos pequenos (2 a 20 resíduos) e aminoácidos, enquanto os peptídeos grandes e médios são precipitados (KUCHROO e FOX, 1982b; REVILLE e FOX, 1978; YVON et al., 1989), sendo, portanto, usada como indicador da maturação dos queijos (VENEMA et al., 1987). A formação de nitrogênio não protéico (NNP) se deve à ação das proteinases e peptidases bacterianas que hidrolisam os peptídeos de alto e médio peso molecular, formados predominantemente pela ação do coagulante. A formação de compostos solúveis de peso molecular abaixo de 500Da é responsável pela intensidade de "flavour" no queijo, incluindo os peptídeos pequenos e aminoácidos, bem como os produtos de degradação de cada um deles (BRURNENBERG et al., 1997; CHRISTENSEN et al., 1991).

Os valores de NNP nos queijos A e B, no período inicial e final da maturação, foram similares àqueles citados por BALDINI (1998), de 0,09% e 0,26% para o queijo Prato com 1 e 40 dias de maturação, respectivamente. Ao contrário, os valores encontrados para o queijo D foram similares àqueles evidenciados para queijo Prato com proteólise acelerada pela adição de uma neutrase: de 0,21% com 7 dias e 0,46% após 40 dias de maturação, respectivamente.

4.4.1 Índices da maturação

Relacionando-se o nitrogênio solúvel em pH-4,6 e o nitrogênio não protéico com o nitrogênio total, obtêm-se, respectivamente, os índices conhecidos como extensão e profundidade da maturação, muito utilizados no controle analítico da

proteólise em queijos. A proteólise secundária também pode ser determinada pelo teor de aminoácidos totais expressos como porcentual do nitrogênio total (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989).

As curvas representando a evolução dos índices de extensão (%NS-pH 4,6/NT) e de profundidade (% NNP/NT) nos queijos A, B, C e D com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$ são apresentadas na Tabela 6 e Figura 27. No início da maturação, não foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos índices de extensão entre os queijos A, B, C e D. Porém, ao longo da maturação, os incrementos desses índices foram da ordem de 101%, 118%, 120% e 120% com 45 dias. No final da maturação (45 dias), o índice de extensão foi significativamente maior ($p < 0,05$) no queijo D que nos queijos C e B, que não diferiram entre si. O queijo A apresentou o menor índice.

Com relação ao índice de profundidade (%NNP/NT), que vem sendo considerado mais efetivo que o NS-pH 4,6 na avaliação da proteólise (GOBBETTI et al., 1999), os resultados da Tabela 6 e Figura 27 mostraram que também não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os queijos A, B, C e D no início da maturação. Esses índices evoluíram ao longo da maturação, com incrementos da ordem de 192%, 163%, 140% e 186%. Após 45 dias de estocagem, foram observadas variações significativas ($p < 0,05$) entre todos os queijos, sendo maior para o queijo D, seguido dos queijos C, B e A.

Interessante destacar que a evolução do índice de profundidade foi muito mais rápida para o queijo D, que com 25 dias já havia alcançado valor similar ao do queijo C e maior que os dos queijos A e B com 45 dias de maturação.

A evolução do índice de profundidade da maturação encontrados neste estudo para o queijo D (4,34% a 12,4%) é superior àqueles evidenciados por outros autores. BALDINI (1998), encontrou valores de 2,7% no início da maturação (7 dias) e 7,26% no final (40 dias), enquanto SILVA (1997) evidenciou valores de 2,82% a 6,27% para queijos com 1 dia e 40 dias, respectivamente. WOLFSCHOON-POMBO (1983) relataram valores para queijos comerciais, que variaram entre 5,1 a 8,2% para queijos com 4 dias e entre 11,9 a 14% para 30 dias de maturação.

A evolução deste índice para o queijo D, de 4,34% a 12,4% ($\Delta=8,1$) foi similar àquela evidenciada por SILVA (1997) e por MINUSSI et al. (1995) para queijo Prato com maturação acelerada. SILVA (1997) encontrou uma evolução de 5,80% a 12,5%, após 40 dias ($\Delta=6,7$) para queijo adicionado da enzima Neutrase, enquanto MINUSSI et al. (1995), de 2,94% a 11,67%, após 45 dias ($\Delta=8,63$), utilizando cultura em meio hidrolisado.

ORDOÑEZ et al. (1998) estudaram queijo Idiazábel maturado por três meses, encontrando valores de IEM de 16,6% e de IPM de 14,5%. Os pesquisadores consideraram esse queijo como de baixa proteólise.

4.4.2 Teor de tirosina

O teor de tirosina é considerado muito adequado para a estimativa da extensão da maturação em queijos, além de ser um método rápido. Analisando-se os resultados da Tabela 6 e Figura 27, verifica-se, no início da maturação, diferenças significativas ($p<0,05$) entre todos os queijos. O valor obtido para o queijo D foi mais elevado que os dos outros queijos. Os valores dos queijos B e C não diferiram entre si. O queijo A apresentou o menor valor. Esses teores iniciais aumentaram com o desenvolvimento da proteólise, sendo da ordem de 112% para o queijo A, 180% para o queijo B, 54% para o queijo C e 58% para o queijo D. No final da estocagem, foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$) entre os queijos A, B, C e D, sendo maior no queijo D, seguido dos queijos C, B e A. Assim como verificado para o índice de profundidade, o teor de tirosina no queijo D alcançou valores máximos com 25 dias de maturação.

Segundo VAKALERIS e PRICE (1959), a concentração de tirosina está estreitamente relacionada com a porcentagem de nitrogênio solúvel em pH-4,6, ou seja com a extensão da maturação, sendo, portanto, uma consequência da ação das enzimas das bactérias lácticas e do coalho.

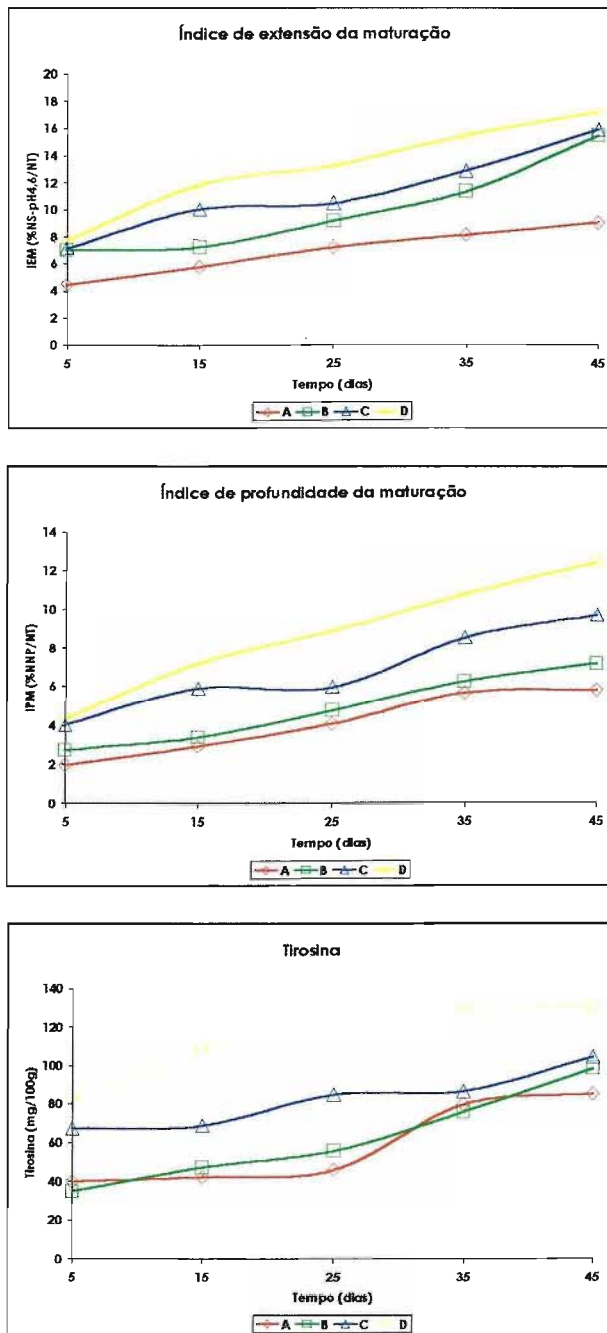


Figura 27 - Evolução dos índices de extensão e de profundidade da maturação e do teor de tirosina nos queijos A, B, C e D durante a estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabela 6 - Valores médios das análises de nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6) e o nitrogênio solúvel em 12% de ácido tricloroacético (TCA) (nitrogênio não protéico - NNP) obtidos para os queijos A, B, C e D durante o período de estocagem a 12±2°C.

Determinação	Origem	Valores nos diferentes dias de estocagem					
		5	15	25	35	45	dms
NT ¹ (%)	A	3,52±0,01 A ³ b ⁶	3,40±0,01 Ab	3,43±0,13 Aa	3,54±0,00 Aa	3,61±0,13 Aa	0,33
	B	3,65±0,01 ABa	3,53±0,01 Da	3,57±0,02 CDa	3,68±0,00 Aa	3,61±0,01 BCa	0,05
	C	3,45±0,07 Ab	3,55±0,03 Aa	3,52±0,01 Aa	3,41±0,01 Aa	3,61±0,02 Aa	0,30
	D	3,45±0,01 Cb	3,60±0,01 Ba	3,61±0,01 Ba	3,62±0,01 Ba	3,62±0,01 Aa	0,09
	Dms ⁴	0,09	0,10	0,27	0,32	0,27	
NS-pH4,6 ² (%)	A	0,16±0,01 aD	0,20±0,01 CD	0,25±0,01 BC	0,29±0,02 AB	0,33±0,01 cA	0,06
	B	0,26±0,01 aD	0,27±0,01 D	0,33±0,02 C	0,43±0,00 B	0,56±0,01 bA	0,05
	C	0,25±0,07 aC	0,36±0,03 BC	0,37±0,01 BC	0,44±0,01 AB	0,56±0,02 bA	0,14
	D	0,27±0,01 aE	0,43±0,06 D	0,48±0,00 C	0,56±0,07 B	0,65±0,01 aA	0,03
	dms	0,14				0,06	
NNP ³ (%)	A	0,07±0,00 Cb	0,10±0,00 BCd	0,14±0,01 ABc	0,20±0,04 Ab	0,21±0,00 Ad	0,07
	B	0,10±0,00 Db	0,12±0,00 Dc	0,17±0,01 Cc	0,23±0,00 Bb	0,26±0,00 Ac	0,02
	C	0,15±0,04 Bb	0,19±0,00 Bb	0,21±0,02 Bb	0,29±0,02 ABb	0,35±0,00 Ab	0,09
	D	0,24±0,07 Ca	0,26±0,00 Ba	0,32±0,00 ABa	0,39±0,00 ABa	0,45±0,00 Aa	0,14
	dms	0,17	0,00	0,05	0,09	0,01	
NS-pH4,6/NT (%)	A	4,54±0,37 Da	5,88±0,33 CDb	7,28±0,11 BCc	8,19±0,68 Bc	9,14±0,01 Ac	1,52
	B	7,12±0,18 Da	7,36±0,31 Db	9,24±0,58 Cb	11,38±0,01 Ab	15,51±0,36bCb	0,05
	C	7,24±1,96 Ca	10,14±0,84 Ca	10,52±0,34 Cb	12,90±0,21ABb	15,95±0,76 Ab	0,14
	D	7,83±0,37 Ea	11,94±0,09 Da	13,29±0,04 Ca	15,47±0,27 Bb	17,22±0,31 Aa	0,03
	dms	4,14	1,94	1,39	1,53	0,06	
NNP/NT (%)	A	1,99±0,05 Ba	2,94±0,07 Bd	4,08±0,41 ABc	5,65±1,12 Ac	5,82±0,24 Ad	2,20
	B	2,74±0,01 Da	3,40±0,01 Dc	4,76±0,30 Cc	6,25±0,09 Bcb	7,20±0,01 Ac	0,02
	C	4,05±1,26 Ba	5,92±0,07 Bb	5,97±0,49 Bb	8,50±0,41 ABab	9,70±0,12 Ab	0,09
	D	4,35±2,15 Ca	7,22±0,05 Bac	8,86±0,04 Aba	10,77±0,05Aba	12,43±0,08 Aa	0,13
	dms	5,07	0,22	1,45	2,46	0,89	
Tirocina (mg/100g)	A	40,08±0,46 Dc	42,44±0,64 Dd	46,13±2,81 Cd	79,77±0,23 Bc	85,09±0,47 Ad	5,40
	B	35,07±0,84 Ed	47,36±1,22 Dc	55,86±1,07 Cc	75,85±0,84 Bd	98,35±0,00 Ac	3,60
	C	67,48±0,84 Eb	68,94±0,84 Db	84,65±0,61 Cb	86,48±0,61 Bb	104,23±0,61 Ab	2,85
	D	82,31±0,00 Ca	107,94±0,61Ba	128,30±0,00Aa	129,30±1,45Aa	129,76±0,00Aa	2,82
	dms	1,81	3,04	2,23	3,71	5,43	

¹ NT: nitrogênio total;

² NS-pH 4,6: nitrogênio solúvel pH 4,6;

³ NNP: nitrogênio não protéico;

⁴ dms: diferença mínima significativa;

⁵ ABCD: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças $P < 0,05$ para análise dms entre tempos de maturação pelo teste de Tuckey;

⁶ abcd: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam $P < 0,05$ para análise dms entre os queijos de diferentes origens pelo teste de Tuckey.

MÉNENDEZ et al. (2001), encontraram IEM e IPM maiores em queijos processados com lactobacilos que naqueles com lactococos. Um estudo comparativo sobre a atividade proteolítica de várias espécies de bactérias lácticas em vários substratos revelou que muitas linhagens de *Lab. helveticus* apresentavam maior atividade que outras espécies (ORDOÑEZ et al., 1998). Utilizando a metodologia de superfície e reposta GOBBETTI et al. (1999), mostraram que a atividade aminopeptidásica de NSLAB era maior que a de lactococos e que os queijos com atividade elevada de aminopeptidases e dipeptidases apresentavam contagens elevadas de NSLAB, identificadas como *Lb. plantarum*, *Lab. curvatus* e *Lab. paracasei* subsp. *paracasei*.

Comparando-se os índices de profundidade dos queijos C e D (Tabela 6, Figura 27) observa-se uma evolução mais lenta no queijo C, que alcançou no final da maturação (45 dias) os mesmos valores encontrados no queijo D com 25 dias de maturação. Portanto, a menor taxa de proteólise no queijo C, comparativamente ao queijo D, pode estar relacionada ao menor valor de pH e ao maior teor de sal na umidade (S/U) (pH= 5,34, S/U=4,21%) comparativamente ao queijo D (pH=5,57, S/U=2,45%). Esses fatores podem ter afetado tanto a atividade das peptidases quanto a das autolisinas, retardando a proteólise do queijo C.

Essas suposições foram feitas com base nos dados de vários autores que constataram que valores de pH ótimos para a atividade das autolisinas situam-se ao redor da neutralidade, sendo dependentes do meio (FERNANDES-MURGA et al., 1981; SANDHOLM e SARIM, 1981; RIEPE et al., 1997). Uma variação do pH de 5,5 para 4,5 causou uma diminuição de 87% na taxa de autólise de diferentes espécies de *Lactobacillus* (KHOLY et al., 1998). Com relação à ação das peptidases, KLEIN-IBLED (2001) observou que concentrações de 2 a 4% de NaCl inibiram em 88% a atividade de peptidases de *Lab. helveticus*. Além disso, uma pequena diminuição do pH, de 5,7 para 5,2, diminuiu a taxa de proteólise de *Lactobacillus* sp. (COURTIN et al., 2002).

4.5 AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DAS CASEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (URÉIA-PAGE)

Uma vez que os índices de maturação não refletem a totalidade das transformações que as proteínas sofrem durante a maturação, empregou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida, uma técnica analítica muito útil para o acompanhamento da hidrólise de ligações individuais nas moléculas de caseína. Esta ferramenta analítica vem sendo usada de uma forma crescente, como método de escolha para evidenciar o tipo de proteólise que ocorre em queijos (BALDINI, 1998). A desnaturação foi feita em uréia, que oferece melhor resolução para peptídeos pequenos.

As Figuras 28 e 29 mostram o perfil eletroforético dos queijos nos vários estágios de maturação e revelam diferenças quantitativas entre as amostras. O perfil de separação obtido pode ser dividido em várias regiões: componentes que se movem mais rapidamente, ou seja, a α_{s1} -caseína, a β -caseína e os componentes de baixa mobilidade γ_3 -, γ_1 - e γ_2 -caseínas. A proteólise primária da caseína deve-se à atividade residual da quimosina, de proteinases nativas do leite, principalmente a plasmina e, em menor extensão, de proteinases do fermento láctico e NSLAB (FOX e McSWEENEY, 1996). A quimosina hidrolisa as ligações mais susceptíveis na α_{s1} -caseína (Phe₂₃-Phe₂₄) e na β -caseína (Leu₁₉₂ e Tyr₁₉₃), sendo muito mais intensa na α_{s1} -caseína, pois a hidrólise desta fração não é afetada em altas concentrações de NaCl (5%), sendo α_{s2} - e κ -caseína totalmente resistentes à degradação pela renina (VISSER et al., 1993).

Analisando-se os perfis eletroforéticos das Figuras 28 e 29, o desdobramento gradual da α_{s1} -caseína pela ação da quimosina pode ser claramente observado pelo aparecimento de uma banda de maior intensidade, correspondente à α_{s1} -I-caseína (f24-199), um polipeptídeo de alto peso molecular, de caráter mais ácido, e mobilidade eletroforética ligeiramente maior que a que a α_{s1} -caseína. Também é relativamente resistente à hidrólise posterior e, por essa razão, aparece em grandes quantidades na maioria dos queijos. Houve um aumento no desdobramento desta fração durante o período de maturação, evidenciado pela maior intensidade da banda correspondente a α_{s1} -I-caseína.

Por sua vez, a plasmina hidrolisa mais rapidamente a β -caseína que a α_{s1} -caseína, produzindo γ -caseínas e proteose-peptonas, sendo as γ_1 -, γ_2 - γ_3 - caseínas correspondentes, respectivamente, aos resíduos 29-209, 29-209 e 108-209 da β -caseína. A α_{s1} -caseína é hidrolisada, mas os peptídeos ainda não foram identificados. Já a α_{s2} -caseína é hidrolisada em vários peptídeos (FOX e STEPANIAK, 1993). Em queijo Gouda, a β -caseína foi hidrolisada mais rapidamente que em queijo Cheddar, devido aos maiores valores de pH e ao conteúdo de umidade, que favorecem a atividade da plasmina (CREAMER, 1975). Segundo VISSER (1977), a plasmina contribui menos que a quimosina e as proteinases do fermento láctico, não sendo, portanto, responsável pela formação de peptídeos amargos.

Os resultados da eletroforese mostram (Figuras 28 e 29) uma quebra progressiva da β -caseína, com o aparecimento de bandas de γ -3, γ -1 e γ -2, já visíveis com 1 dia de maturação, evidenciando uma possível ação da plasmina. Estes resultados estão de acordo com aqueles observados por FARKYE et al. (1991). Entretanto, não se verificou um decréscimo nos níveis de β -caseína. Alguns fatores são relacionados com a inibição da plasmina residual na maturação do queijo: substituição de parte do soro por água no processamento, como ocorre no queijo Gouda e Prato, pode remover os ativadores do plasminogênio, uroquinase ou ativadores endógenos, (FARKIE e FOX, 1990); e uma pequena alteração do pH, de aproximadamente, 0,2 unidade (MÉNENDEZ et al., 2000).

Com relação às proteinases do fermento láctico, segundo MÉNENDEZ et al. (2001), a α_{s1} -caseína foi a principal fonte de peptídeos e aminoácidos para a proteólise secundária, principalmente em queijos processados com lactobacilos. EL SODA e DESMAZEAUD (1982) observaram que a capacidade de degradar as caseínas foi dependente da espécie: *Lab. lactis* e *Lab. bulgaricus* hidrolisaram ambas, α_{s1} - e β -caseínas; *Lab. helveticus* hidrolisou somente a β -caseína e *Lab. acidophilus* somente a α_{s1} -caseína.

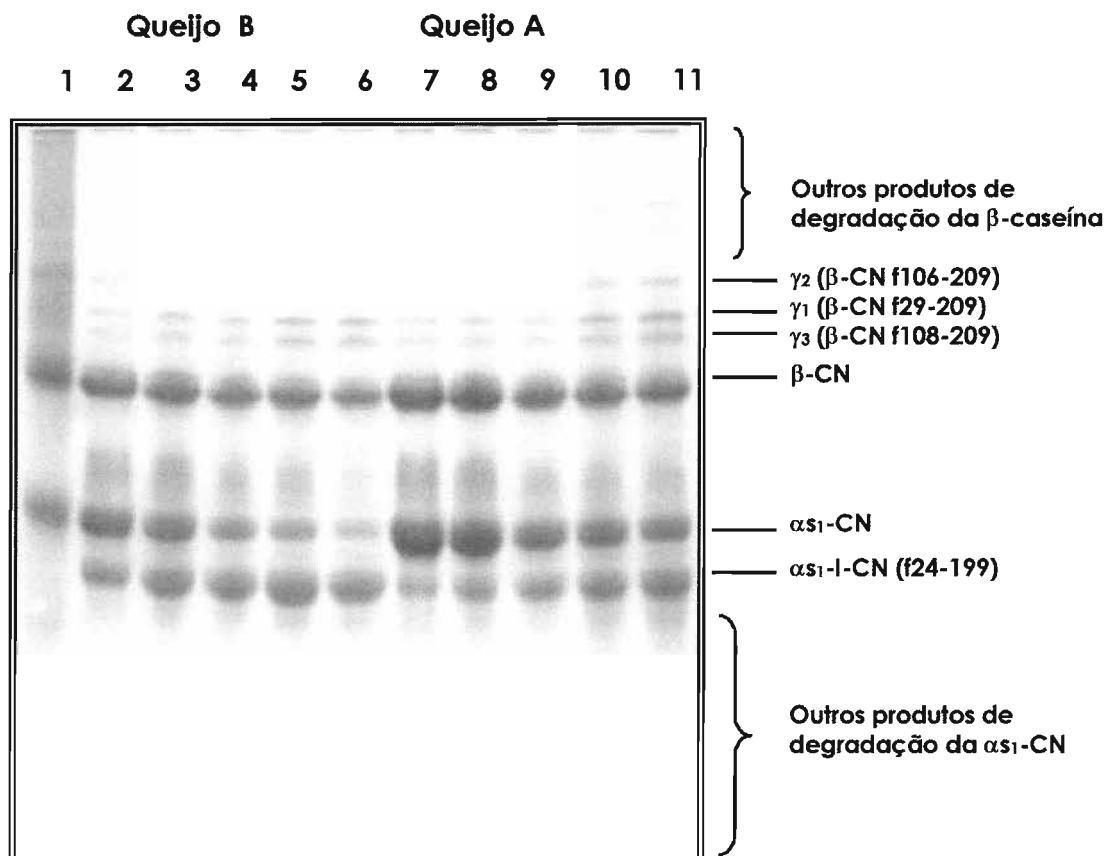


Figura 28 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) do queijo tipo Prato. Linha 1: Caseinato de sódio; linhas 2 a 6, queijo B com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de maturação; linhas 7 a 11, amostra A no mesmo período.

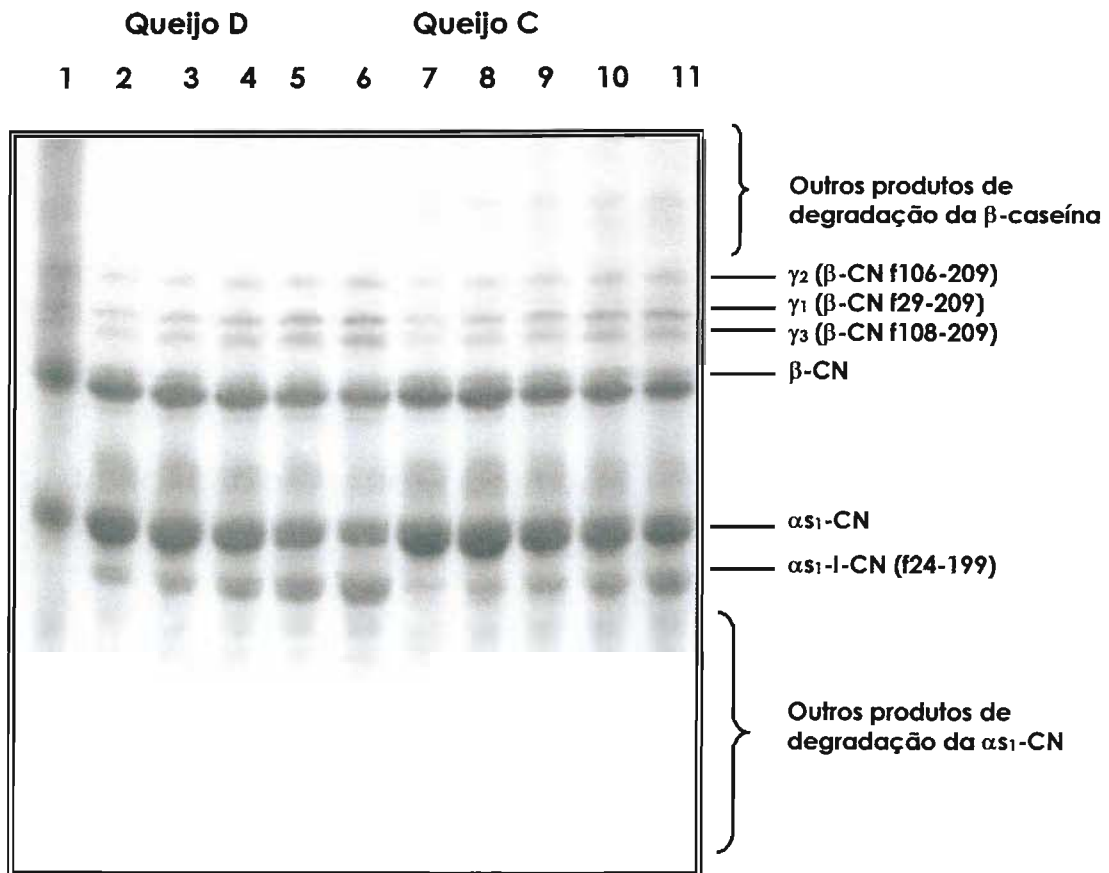


Figura 29 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) do queijo tipo Prato. Linha 1: Caseinato de sódio; linhas 2 a 6, queijo D com 5, 15, 25, 35 e 45 dias de maturação; linhas 7 a 11, amostra C no mesmo período.

Qualitativamente, os eletroforetogramas dos queijos A, B, C e D são similares e mostram que o coagulante e a plasmina foram os responsáveis pela degradação inicial das caseínas. O queijo D apresentou maior degradação de α_{s1} -caseína durante o período de maturação, demonstrado pelo aumento na concentração de α_{s1} -I caseína, quando comparada com as demais amostras. A taxa de degradação da α_{s1} -caseína apresentou a seguinte ordem: $D > C \geq B > A$. O mesmo comportamento foi seguido pela β -caseína, onde se verificou maior degradação na amostra D. O queijo A apresentou menor degradação de α_{s1} - e β -caseína, com o aparecimento de α_{s1} -I caseína bem discreto do 5º até o 15º dia de maturação, mostrando um aumento um pouco maior no final do período, porém bem menor que as demais amostras.

6.6 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES

A Figura 30 apresenta o acúmulo em aminoácidos totais nos queijos A, B, C e D durante a maturação a $12 \pm 2^\circ\text{C}$. Pode-se verificar, no início da maturação (5 dias), uma maior concentração de aminoácidos livres no queijo D (734,65mg/g), seguido dos queijos C (141,66mg/g), B (127,72mg/g) e A (47,26mg/g). Devido à fragmentação das proteínas, também se verificou uma elevação do total de aminoácidos com o decorrer do período de maturação. Os valores iniciais aumentaram 5, 4, 9 e 3 vezes nos queijos A, B, C e D, respectivamente, alcançando no final da maturação concentrações de 225,08 mg/g no queijo A, 557,94mg/g no queijo B, 1240,90mg/g no queijo C e 2037,69mg/g no queijo D.

Esses resultados demonstrando o acúmulo mais rápido de aminoácidos no queijo D no período inicial de maturação comprovaram que a autólise de *Lb. helveticus*, detectada por "immunoblotting", promoveu uma proteólise secundária mais intensa no início do período de maturação. As diferenças de composição físico-química, principalmente pH e teor de sal na umidade, influenciaram o desenvolvimento da proteólise no queijo C que, mesmo apresentando autólise dessa espécie, teve o seu acúmulo em aminoácidos retardado em 5 vezes em relação ao queijo D.

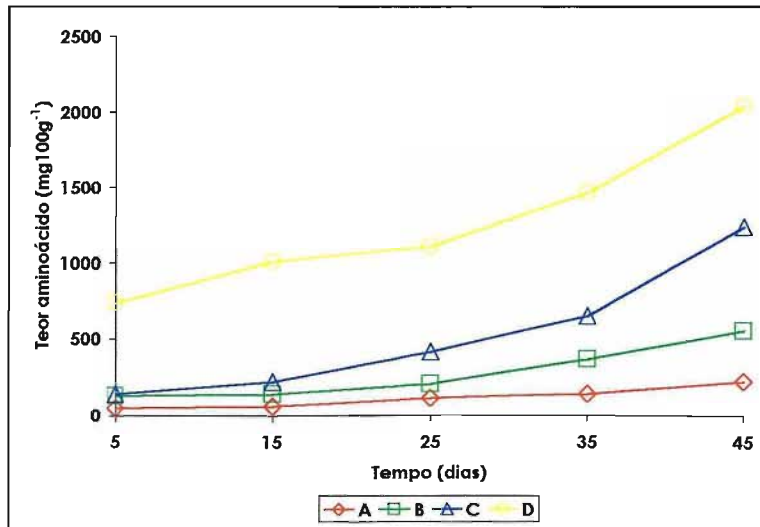


Figura 30 - Teor de aminoácidos totais nos queijos Prato A, B, C e D durante o período de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Alguns autores (LANE et al., 1996; LYNCH et al., 1997, 1999) evidenciaram que lactobacilos usados como adjuntos aumentou o conteúdo de aminoácidos livres em queijo Cheddar e em queijos de massa lavada com um período de maturação curto. As diferenças nos teores totais de aminoácidos livres foram dependentes principalmente da linhagem usada. ARDÖ et al. (2002) evidenciaram o considerável acúmulo de aminoácidos em queijo Dambo processado com cultura adjunta, mais efetivamente com células atenuadas por aquecimento.

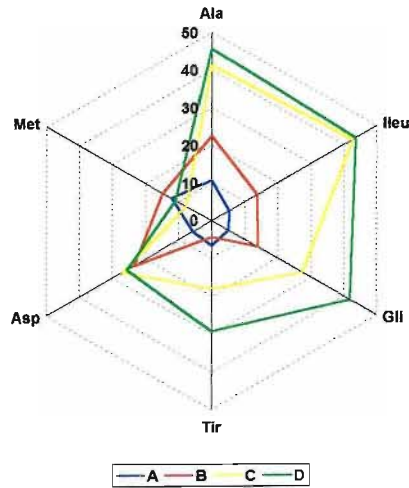
A Tabela 7 apresenta a composição de aminoácidos livres individuais nos queijos A, B, C e D durante o período de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$. Observa-se que não houve liberação de cisteína nos queijos das quatro origens. O ácido aspártico, glicina, alanina, isoleucina, tirosina e arginina foram os aminoácidos encontrados em menor concentração. Treonina + serina, ácido glutâmico, prolina, valina, leucina, fenilalanina, lisina, histidina apareceram em maiores concentrações, contribuindo com aproximadamente 80% dos aminoácidos totais nos queijos A, B, C e D.

As caseínas apresentam uma abundância dos resíduos ácido glutâmico, leucina e prolina e, ao contrário, a cisteína é encontrada em baixas proporções e somente nas α_{s2} - e κ -cadeínas: 1 e 1,2%, respectivamente (BRULÉ e LENOIR, 1986). A aminopeptidase cisteína tem sido menos freqüentemente identificada em bactérias lácticas e, juntamente com a serina aminopeptidase, representa menos que 20% das peptidases (GONZÁLES e ROBERT-BAUDOUIY, 1996), o que explicaria a ausência desse aminoácido nos queijos das quatro origens.

Analisando-se a evolução dos aminoácidos individualmente durante a maturação observa-se na Tabela 7 que, proporcionalmente, prolina e histidina nos queijos A e B, prolina e alanina no queijo C e alanina e arginina no queijo D foram os aminoácidos que sofreram maiores incrementos. Esses resultados foram diferentes daqueles obtidos por BALDINI (1998) para queijo Prato, que encontraram que a glicina e a metionina foram os que sofreram maiores variações.

Com base no acúmulo de aminoácidos livres no final da maturação (45 dias), observa-se na Figura 31 uma certa similaridade no perfil de aminoácidos dos queijos A, B, C e D, com variações de concentrações.

Até 50 mg/100g



Até 400 mg/100g

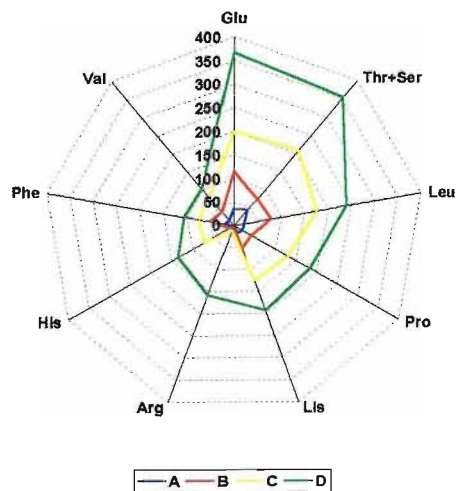


Figura 31 - Perfil de aminoácidos livres individuais no queijo Prato A, B, C e D com 45 dias de maturação a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Embora presente em níveis elevados nas moléculas de caseínas, a prolina não foi considerada um substrato adequado para as transaminases, identificadas como as responsáveis pela primeira etapa da conversão de aminoácidos em compostos de aroma e por outras possíveis vias de conversão enzimática ainda não foram identificadas em bactérias lácticas. O papel deste aminoácido no "flavour" do queijo ainda não foi determinado (YVON e RIJNEN, 2002).

Segundo CHRISTENSEN et al. (1995), é muito difícil correlacionar a concentração de aminoácidos com o desenvolvimento de um "flavour" específico, uma vez que diferentes variedades de queijos, como Cheddar, Gouda e Edam, apresentaram proporções similares de aminoácidos, mas com diferentes perfis de "flavour".

Ainda com base nas concentrações relativas de aminoácidos livres nos queijos A, B, C e D, pode-se observar que a concentração de ácido aspártico, valina e metionina oscilou em todos os períodos da maturação dos queijos A, B, C e D. Treonina + serina, fenilalanina, ácido glutâmico e glicina aumentaram no queijo A e oscilaram nos queijos B, C e D. Prolina, lisina, histidina e arginina diminuíram no queijo A e oscilaram nos queijos B, C e D. Alanina diminuiu nos queijos A, C e D e oscilou no queijo B. Isoleucina aumentou no queijo B e oscilou nos queijos A, C e D. Leucina aumentou nos queijos A, B e C e oscilou no queijo D. Treonina diminuiu nos queijos A e B e oscilou nos queijos C e D.

A variação de aminoácidos livres nos queijos constitui-se no mais expressivo indicador da proteólise promovida por bactérias lácticas. Porém, a quantidade mensurada em um determinado período não representa necessariamente a concentração produzida pela proteólise, uma vez que muitos dos aminoácidos são convertidos a compostos de "flavour" (proteólise terciária) ou utilizados para síntese de proteínas por células viáveis remanescentes nos queijos. A lise bacteriana estimula a superprodução de todos os aminoácidos, alterando o balanço durante a maturação (ARDÖ et al., 2002; BOUTROU et al., 1998a).

Tabela 7 - Composição de aminoácidos livres individuais nos queijos Prato A, B, C e D durante o período de estocagem a 12±2°C.

Aminoácido	Origem	Concentração nos diferentes dias de estocagem					Aminoácidos	Origem	Concentração nos diferentes dias de estocagem				
		5	15	25	35	45			5	15	25	35	45
Ácido Aspártico	A	0,65 ¹	0,67	2,92	4,17	5,50	Melionina	A	0,92	3,43	5,48	7,40	11,97
	B	4,24	4,78	9,22	15,33	23,36		B	3,43	4,01	6,43	9,42	14,83
	C	1,39	2,73	6,18	14,21	26,94		C	1,55	2,92	1,78	2,07	7,70
	D	8,78	11,62	11,76	15,74	25,49		D	4,42	5,30	ND	ND	10,96
Treonina + Serina	A	5,60	8,78	18,15	25,20	44,03	Isoleucina	A	1,25	1,77	2,41	2,73	5,22
	B	17,84	18,31	31,70	50,02	74,27		B	2,96	3,23	5,19	7,98	13,64
	C	21,33	38,01	82,52	118,25	208,43		C	2,30	4,83	12,12	20,62	42,75
	D	121,24	180,07	207,30	256,93	353,93		D	16,61	22,36	26,44	31,76	43,62
Ácido Glutâmico	A	5,85	8,26	17,10	23,06	36,13	Leucina	A	1,79	2,96	7,32	10,28	21,91
	B	22,75	26,09	34,87	76,82	115,87		B	10,23	11,98	23,08	42,37	77,39
	C	16,01	31,15	56,25	88,32	202,45		C	11,74	21,13	50,91	86,05	176,68
	D	135,14	183,38	206,80	259,69	367,11		D	81,43	119,60	149,16	197,01	239,12
Prolina	A	10,71	8,92	13,95	15,37	20,54	Tirosina	A	2,02	2,32	3,95	4,50	6,54
	B	15,54	16,73	7,21	30,65	41,22		B	4,33	3,81	4,57	5,32	4,30
	C	27,94	34,75	40,62	66,44	130,07		C	2,06	3,05	6,16	8,45	17,92
	D	66,34	88,05	104,64	126,42	183,99		D	9,44	11,07	14,87	19,81	29,22
Glicina	A	0,52	1,10	2,06	2,71	4,87	Fenilalanina	A	2,21	4,22	8,77	11,32	18,67
	B	2,62	2,95	5,07	8,62	13,81		B	9,45	11,47	19,86	31,75	48,76
	C	2,75	3,45	7,80	12,61	27,28		C	6,05	10,68	27,99	39,03	74,00
	D	10,89	18,37	24,4	31,89	41,80		D	30,32	44,52	59,48	80,11	106,20
Alanina	A	4,03	5,22	7,80	8,79	10,84	Lisina	A	6,85	7,79	11,68	12,79	17,24
	B	5,95	6,24	9,40	14,19	22,48		B	14,53	17,06	26,08	39,32	52,09
	C	14,98	17,79	22,79	28,86	41,39		C	16,41	25,22	51,19	79,55	124,52
	D	26,17	32,32	32,14	37,48	45,75		D	76,10	102,73	119,55	147,02	193,53
Cisteína	A	ND ²	ND	ND	ND	ND	Histidina	A	2,90	2,77	3,69	3,90	4,57
	B	ND	ND	ND	ND	ND		B	5,93	5,21	6,65	12,97	12,67
	C	ND	ND	ND	ND	ND		C	7,16	11,24	22,39	36,59	71,85
	D	ND	ND	ND	ND	ND		D	46,02	50,41	56,90	66,42	134,75
Valina	A	1,32	3,47	7,44	10,13	15,060	Arginina	A	0,64	0,43	0,45	0,77	1,98
	B	8,19	8,96	14,29	24,22	28,763		B	ND	ND	ND	ND	3,74
	C	7,96	12,34	23,47	38,04	78,422		C	1,58	2,41	4,06	9,34	11,50
	D	33,78	42,45	ND	73,47	104,528		D	67,98	91,01	93,32	117,98	157,69

¹ Concentração: mg/100g

² ND: Não detectado

Assim, os aminoácidos encontrados em maior concentração podem indicar a existência de um sistema enzimático mais ativo e que os mesmos não foram catabolizados a compostos aromáticos e nem consumidos para a síntese protéica pela microbiota do queijo. Para aqueles presentes em menores concentrações (alanina, glicina, tirosina, ácido aspártico e metionina), pode-se deduzir que foram catabolisados a compostos aromáticos ou utilizados para o desenvolvimento bacteriano durante a maturação. Para se ter uma idéia, as exigências em aminoácidos para *Lac. lactis* subsp. *cremoris* varia de 6 mg/ml para a leucina à 40 mg/ml para o ácido glutâmico (DESMAZEAUD, 1994).

Os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano), os de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) e a metionina são os maiores precursores dos compostos aromáticos (YVON e RIJNEN, 2001). Segundo COURTIN et al. (2002), dentre todos os aminoácidos, o incremento de metionina é particularmente interessante, uma vez que ele é um importante precursor dos compostos típicos de aroma sulfurosos. Além disso, um dos aminoácidos raros, liberado em quantidades reduzidas, o que se constitui uma limitação. Também é essencial para o desenvolvimento de bactérias lácticas (DESMAZEAUD, 1994).

7.7 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE AROMA

Os compostos voláteis presentes em vários tipos de queijos têm sido identificados (BOSSET e GAUCH, 1993; ENGELS, 1997; THIERRY e MAILLARD, 2002), pois muito pouco se conhece a respeito desses componentes determinantes das características sensoriais dos queijos (MARCHISIO et al., 1999), principalmente para o queijo Prato.

Foram detectados 65 compostos voláteis, dos quais 54, 50, 52 e 47 estavam presentes respectivamente nos queijos A, B, C e D, concluindo-se que todos estes queijos contém basicamente os mesmos compostos voláteis, mas em quantidades distintas. O fato de ter sido encontrado como compostos majoritários, principalmente os álcoois e os ésteres nos queijos A e B e o benzaldeído, o 3-metil-2-butanal e o hexanal nos C e D, não significa que estes compostos sejam determinantes nesses queijos, pois a formação do "flavour", que envolve reações extremamente complexas, depende de um perfeito equilíbrio entre os numerosos

compostos presentes no queijo maturado (MARCHISIO et al., 1999; McSWEENEY et al., 1999; BOSSET e GAUCH, 1993).

Os principais grupos de compostos voláteis de aroma, álcoois, cetonas, ésteres, aldeídos e compostos sulfúricos, identificados nos queijos maturados das quatro origens e as quantidades (valores de áreas dos picos) relativas à cada um deles são apresentados na Tabela 8 e Figura 32. Verificam-se a presença de 1-pentanol, 1-butanol, 1-penteno-3-ol, 2-metil-1-butanol, 2-butanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, álcool isopropil e etanol nos queijos A, B, C e D, de 1-propanol nos queijos A, B e C, de 2-pentanol nos queijos B, C e D e de 3-metil-butanol nos queijos C e D. Os álcoois 3-metil-butanol e 2-metil-butanol podem ser originários da leucina e valina, respectivamente (CRHISTENSEN et al., 1999).

Dependendo do tipo de álcool, quantidades mais elevadas estavam presentes nos queijos A e B, principalmente etanol que, juntamente com outros álcoois primários alifáticos (1-butanol, 1-pentanol e 1-hexanol), contribuem para a formação de aroma de fruta e de noz, que em determinadas variedades de queijos como o Gouda e o Cheddar são considerados defeitos, enquanto o 3-metil-1-butanol fornece aroma agradável de queijo fresco (ENGELS, 1997). O queijo B apresentou quantidades mais elevadas de 2-butanol que os outros queijos. Este álcool secundário é formado a partir da butanona, a qual por sua vez é originada a partir do diacetil (URBACH, 1993).

É difícil comparar os resultados deste trabalho com os obtidos para outros tipos de queijos, devido às variáveis fermento láctico, bactérias NSLAB e tecnologia de fabricação. Porém, levando-se em consideração que o queijo Prato é originário do Gouda, dados obtidos por GROUX e MOINAS (1974) indicam a presença de etanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-heptanol-2, tendo o 2-butanol representado aproximadamente 1/3 dos constituintes daquele tipo de queijo. ENGELS (1997) comparando vários tipos de queijos encontraram no Gouda, etanol 1-butanol, 1-pentanol, 2-butanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 2-propanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-3-buteno-1-ol e metanol, dos quais etanol, 1-butanol, 3-metil-1-butanol como componentes majoritários.

As cetonas são comumente encontradas em produtos de laticínios. Como pode ser observado na Tabela 8 e Figura 32, com exceção da 2-nonanona e acetona nos queijos A, B e C e da 6-metil-hepteno-2-ona no queijo A, esses

componentes foram detectados em todos os queijos. Os queijos C e D apresentam quantidades mais elevadas de 2-heptanona que os queijos A e B, enquanto a 2-nonanona e acetona foram identificadas somente no queijo D. Por sua vez, os queijos A e B apresentam mais 2,3-butanodiona que os queijos C e D. A redução desta molécula leva a formação de acetoína, um composto com aroma de madeira úmida (MOIO et al, 1993). A redução subsequente dele resulta no aparecimento da 2-butanona (URBACH, 1993), composto presente nos queijos das 4 origens, sendo mais elevada no B, cuja contribuição ao “flavour” ainda não foi estabelecida. Outros diferentes tipos de cetonas são encontrados em todos os queijos, sendo a 2,3-butanodiona, composto que apresenta um “flavour” de manteiga semelhante a noz, um dos mais importantes (ENGELS, 1997). Todos esses componentes foram identificados em queijo Gouda (ENGELS, 1997).

Muitos ésteres e principalmente o de etila, são reconhecidos por seu importante papel na formação de aroma de frutas doces. Analisando-se a Tabela 8 e Figura 32 verifica-se a presença de acetato de etila e butanoato de etila nos queijos A, B, C e D, acetato de butila e hexanoato de etila nos queijos A, B e D e butanoato de etila somente no queijo A. A quantidade mais elevada de ésteres foi encontrada nos queijos A e B. Butanoato de etila estava presente somente no queijo A, que também apresentou ácido acético butil éster em maior quantidade que os outros queijos. De todos esses componentes, somente o butanoato de etila foi identificado em queijo Gouda por ENGELS (1997).

Com relação aos aldeídos (Tabela 8 e Figura 32) detectou-se a presença de 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, benzaldeído, heptanal e pentanal em todos os queijos, hexanal nos queijos C e D e octanal nos queijos B e D. Os queijos C e D apresentam maior quantidade de 3-metil butanal que os outros queijos, enquanto o hexanal é encontrado somente nos queijos C e D. O 3-metil butanal é formado a partir da isoleucina e foi relacionado com o “flavour” impuro e áspero de queijo Cheddar (ENGELS, 1997; CHRISTENSEN et al., 1999). Benzaldeído, composto freqüentemente encontrado em produtos de laticínios e derivado da conversão do triptofano ou fenilalanina (MAARSE et al., 1994; ENGELS, 1997) também estava presente em maior quantidade nos queijos C e D que nos queijos A e B. Esse composto tem sido encontrado em vários tipos de queijos, contribuindo positivamente no “flavour”. Em queijo Gouda, foram encontrados 3-metil-butanal,

pentanal, hexanal, heptanal, enquanto benzaldeído e octanal não estavam presentes (ENGELS, 1997).

Os produtos de degradação dos aminoácidos sulfurosos como sulfitos de hidrogênio e metanotiol, são oxidados a dimetil-disulfetos (DMDS) e dimetil-trissulfetos (DMTS), importantes compostos que conferem o "flavour" de queijo maturado, principalmente o DMDS (ENGELS, 1997). Observa-se na Tabela 8 e Figura 32, quantidades mais elevadas de DMDS nos queijos D e B, seguido dos queijos A e C. Muitos compostos que lembram os vegetais (terpenos) foram encontrados nos queijos das quatro origens. O limoneno, um composto importante por apresentar característica de fruta cítrica (WELSH et al., 1989), estava mais presente no queijo A (Tabela 8 e Figura 32). ENGELS (1997) encontrou limoneno em queijo Gouda, enquanto o DMDS não estava presente.

KLEIN e IBLED (2001) reportaram que 6 linhagens de *Lab. helveticus* produziam 2-metil-propanol, DMDS e concentração elevada de benzaldeído. Estas constatações juntamente com os resultados da intensidade de autólise deste estudo, fornecem evidências da contribuição de *Lab. helveticus* no desenvolvimento de "flavour" nos queijos C e D. Vários estudos mostraram que *Lab. helveticus* produz concentrações elevadas de alguns aldeídos e cetonas em leite, mas as vias metabólicas ainda permanecem desconhecidas (IMHOF et al., 1995). Produz ainda acetaldeído de treonina (HICKEY et al., 1983), metanotiol de metionina (DIAS e WEINER, 1998), bem como "off-flavours" do triptofano (GUMMALA e BROADBENT, 1999). Por sua vez, *Lb. plantarum* produz benzaldeído a partir da fenilalanina (GROOP e BOND, 1998).

Os componentes voláteis de queijo Prato estão sendo relatados pela primeira vez neste estudo. As diferenças encontradas entre os queijos dos diferentes laticínios dependem da microbiota, conforme demonstrado em estudos realizados com o intuito de avaliar a capacidade de degradação de aminoácidos a compostos aromáticos por diferentes linhagens de *Lactobacillus* (YVON e RIJNEN, 2001). Como células intactas também são necessárias para este fim, é importante a definição da taxa células lisadas/células integrais para a obtenção dos efeitos almejados (KLEIN e IBLED, 2001; SABOYA et al., 2002).

Atualmente, com o uso de métodos analíticos que combinam a cromatografia a gás e a olfmetria, estão sendo observados que metade dos odorantes mais fortes de queijos resultam principalmente da fermentação da lactose ou da degradação do citrato e poucos da lipólise, enquanto a outra metade resulta da degradação da leucina e metionina. Os principais produtos formados a partir da metionina são metanotiol e seus produtos de degradação como DMDS e DMTS, enquanto o ácido ivoalérico e o 3-metil butanal resultam da degradação da leucina (YVON e RIJNEM, 2001).

4.8 PERFIL DE TEXTURA DOS QUEIJOS MATURADOS

O queijo é considerado um material viscoelástico, o que significa que suas características reológicas podem variar de elástico a viscoso, dependendo do tipo (duro, semi-duro, mole). O queijo Prato, um tipo semi-duro (36 a 46% de umidade) e de massa semi-cozida, não amolece durante a maturação, da mesma forma como ocorre com os queijos de altos teores de umidade, mas sofrem as mesmas mudanças estruturais (DE JONG, 1978), uma vez que a taxa de conversão da α_{s1} -caseína para α_{s1} -I é a mesma para queijos com teores de umidade de 40 a 60% (DE JONG, 1976).

Durante a maturação ocorrem várias alterações que podem ser importantes no desenvolvimento da textura: a) a estrutura e composição tornam-se mais uniformes, devido à fusão dos grãos de coalhada e redução dos gradientes de sal, umidade e pH principalmente nos estágios iniciais; b) os queijos perdem água por evaporação e pelo avanço da sinérese (principalmente próximo às extremidades) e pela proteólise; c) a maturação implica no rompimento parcial da rede de paracaseinato e causa também um ligeiro aumento do pH, devido à formação de grupamentos alcalinos e da degradação do lactato (CREAMER e OLSON, 1982; LAWRENCE et al., 1987).

Tabela 8 - Compostos voláteis identificados nos queijos Prato A, B, C e D após 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Composto volátil	Origem			
	A	B	C	D
Álcoois				
1-pentanol	7,53	10,24	6,78	4,72
1-butanol	12,36	15,56	8,48	4,73
1-penteno-3-ol	1,02	2,66	1,11	1,87
1-propanol	9,40	81,23	25,67	ND
2-metil-1-butanol,	14,59	8,59	1,98	2,81
2-butanol	5,13	1018,34	331,19	137,47
2-metil-1-propanol,	21,01	12,14	10,05	9,80
2-pentanol	ND ²	8,77	13,20	1,99
3-metil-1-butanol,	43,64	52,09	8,92	9,57
3-metil-buteno-1-ol,	ND	ND	0,65	1,90
Álcool isopropil	38,92	138,09	103,81	41,80
Etanol	9807,72 ¹	3529,58	1727,42	2202,93
Cetonas				
2,3-butanodiona (diacetil)	884,42	605,04	147,66	227,47
2,3-pentanediona	9,48	8,68	8,85	4,81
2-butanona	289,69	1526,73	590,95	229,94
2-heptanona	39,77	35,65	75,98	71,16
2-nonanona	ND	ND	ND	2,36
2-pentanona	42,46	47,67	46,75	56,75
5-hepteno-2-ona 6-metil	ND	3,62	2,58	3,16
Acetona	ND	ND	ND	35,28
Ésteres				
Acetato de butila	4,99	2,92	ND	0,96
Acetato de etila	23,14	25,97	8,07	15,03
Butanoato de etila	156,05	36,13	6,53	7,63
Butanoato de metila	3,93	ND	ND	ND
Hexanoato de etila	5,73	3,30	ND	1,09
Aldeídos				
2-metil-butanal	4,72	6,32	13,70	11,16
3-metil-butanal	9,54	33,16	65,41	57,29
Benzaldeído	3,01	3,50	11,74	13,27
Heptanal	9,27	5,40	7,15	8,40
Hexanal	ND	ND	13,04	20,46
Octanal	ND	1,61	ND	3,19
Pentanal	37,43	8,91	13,15	12,94
Compostos sulfúricos e outros				
Dissulfito de metila (DMDS)	6,03	10,93	3,64	9,94
Terpenos				
α -pinene	51,31	17,59	11,62	13,51
Limonene	35,86	4,81	11,47	11,85

¹ Média dos valores de picos de áreas.

² ND= não detectado

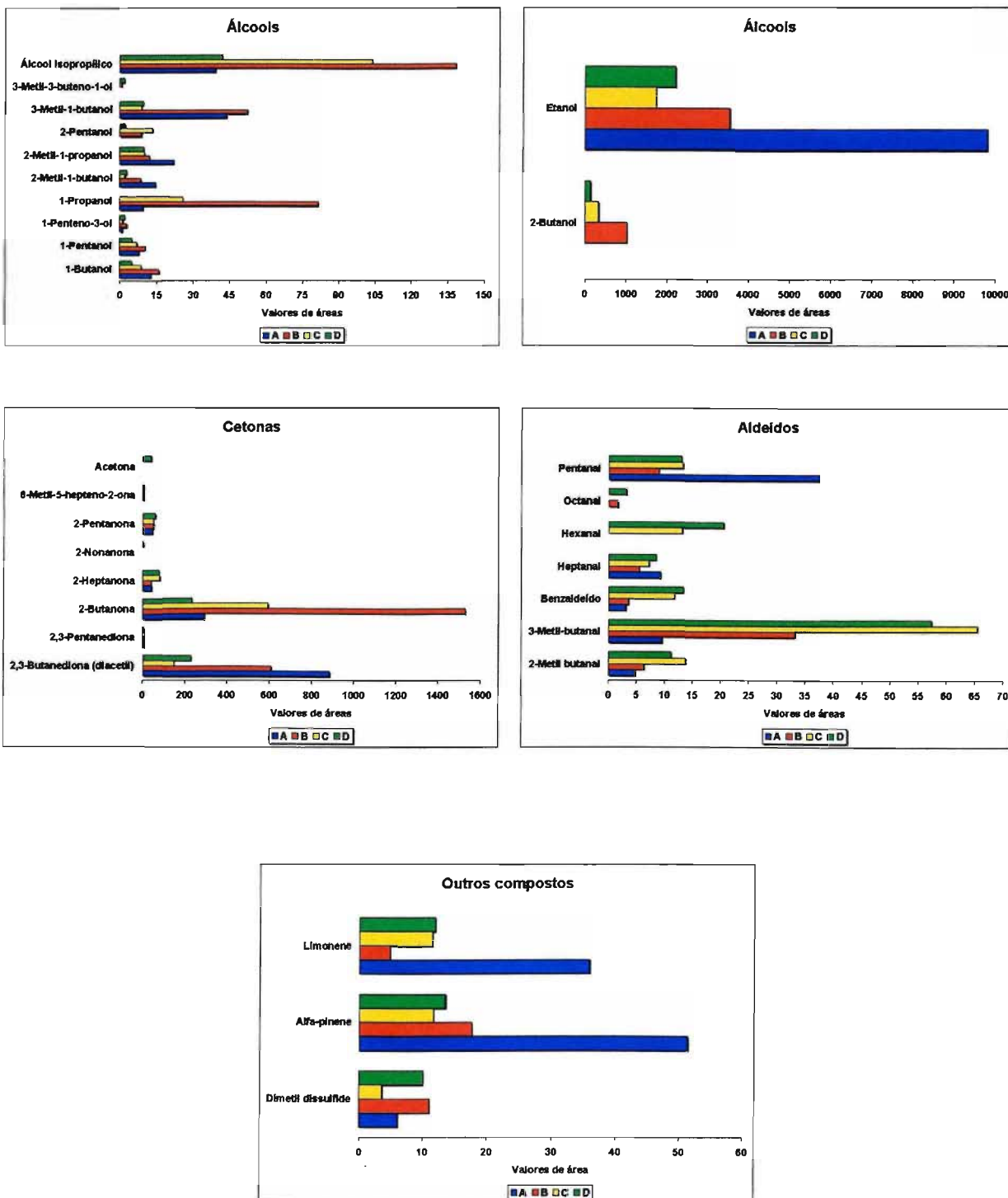


Figura 32 - Compostos voláteis identificados nos queijos Prato A, B, C e D com 45 dias de estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

A Tabela 9 e Figura 33 apresentam os resultados da análise do perfil de textura dos queijos A, B, C e D com 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$. Para os parâmetros firmeza e adesividade, houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre alguns dos queijos, enquanto para a elasticidade e coesividade os valores, não foram estatisticamente diferentes.

A firmeza é definida como a força necessária para que a amostra atinja uma força de deformação, ou força para ocasionar sua compressão. Comparando-se os valores médios (Tabela 19) de firmeza das amostras pode-se observar que o queijo B foi significativamente ($p < 0,05$) mais firme que os outros queijos.

Tabela 9 - Parâmetros de textura do queijo Prato A, B, C e D com 45 dias de estocagem a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Queijo	Parâmetro			
	Firmeza (g ²)	Adesividade (g.s ³)	Elasticidade*	Coesividade*
A	602,167 \pm 57,048 bc	-16,302 \pm 7,318 ab	0,4842 \pm 0,020 a	0,630 \pm 0,023 a
B	1026,151 \pm 151,67 a	-39,567 \pm 18,233 b	0,409 \pm 0,057 a	0,608 \pm 0,044a
C	550,119 \pm 267,74 c	-8,858 \pm 3,677 a	0,413 \pm 0,072 a	0,624 \pm 0,036 a
D	695,117 \pm 247,36 b	-17,553 \pm 11,786 b	0,425 \pm 0,103 a	0,609 \pm 0,080 a

*Parâmetro adimensional

2 g: gramas

g.s: gramas x segundo

A consistência de um queijo depende principalmente de seu teor de umidade, gordura e componentes protéicos insolúveis (WOLFSCHONN-POMBO & LIMA, 1989). Pequenas variações na relação caseína e umidade resultam em grandes alterações na umidade disponível, uma vez que a maior parte da umidade encontra-se ligada à caseína e aos seus produtos de degradação. Como o teor de renina residual em relação à caseína é menor em queijos de baixa umidade, a variação da textura, neste caso, será mais lenta. Quanto menor for essa relação, umidade/caseína (U/C), mais firme será a matriz do queijo (LAWRENCE et al., 1987).

Assim, com base nos valores de umidade e de proteínas obtidos para os queijos A, B, C e D, calculou-se os índices de umidade na caseína (U/C), que apresentaram a seguinte ordem: C (2,01%) > A (1,84%) > A > D (1,74%) > B (1,66%), sendo, portanto, coerentes com os resultados obtidos por análise instrumental, que demonstraram ser o queijo C menos firme que os demais.

Considerando-se que quanto mais cálcio estiver ligado à caseína mais firme será a estrutura dos grãos; que quanto maior a produção de ácido láctico, maior será a perda de cálcio no soro e que quanto maior o teor de sal, mais baixo será o teor de umidade, menos cálcio estará ligado à proteína e menos firme será a massa do queijo (LOURENÇO-NETO, 2002). Portanto, pode-se supor que a menor firmeza apresentada pelo queijo C também foi consequência de sua maior acidez (Tabela 9) e do maior teor de sal (Tabela 9) em relação aos outros queijos. Além disso, o queijo C também apresentou o menor teor de gordura (Tabela 9).

A adesividade é o trabalho a ser simulado para sobrepor as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície do elemento de prova ("probe" ou punção) que está em contato com a mesma. Quando a adesividade é maior que a coesividade, a amostra ficará aderida ao "probe". Pelos resultados da Tabela 9 e Figura 19, evidenciou-se que o queijo C foi significativamente mais adesivo que os demais.

A elasticidade é a medida da distância de deformação do queijo, que ao ser comprimido pelo "probe", volta à condição original logo após ser retirada a força aplicada. Conforme pode ser observado na Tabela 9 e Figura 33 não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores de coesividade entre os queijos A, B, C e D.

A coesividade é um parâmetro adimensional, cuja medida se correlaciona com a adesividade do queijo, observando-se que quando a adesividade é menor que a coesividade o "probe" permanece limpo. Extrapolando-se para um sistema real, a amostra não ficaria aderida aos dentes. Não se detectaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de coesividade entre os queijos A, B, C e D.

Uma das maiores dificuldades na determinação do perfil de textura consiste na obtenção de amostras representativas, principalmente para os queijos que apresentam olhaduras que causam problema com relação à homogeneidade (FARKIE e FOX, 1990).

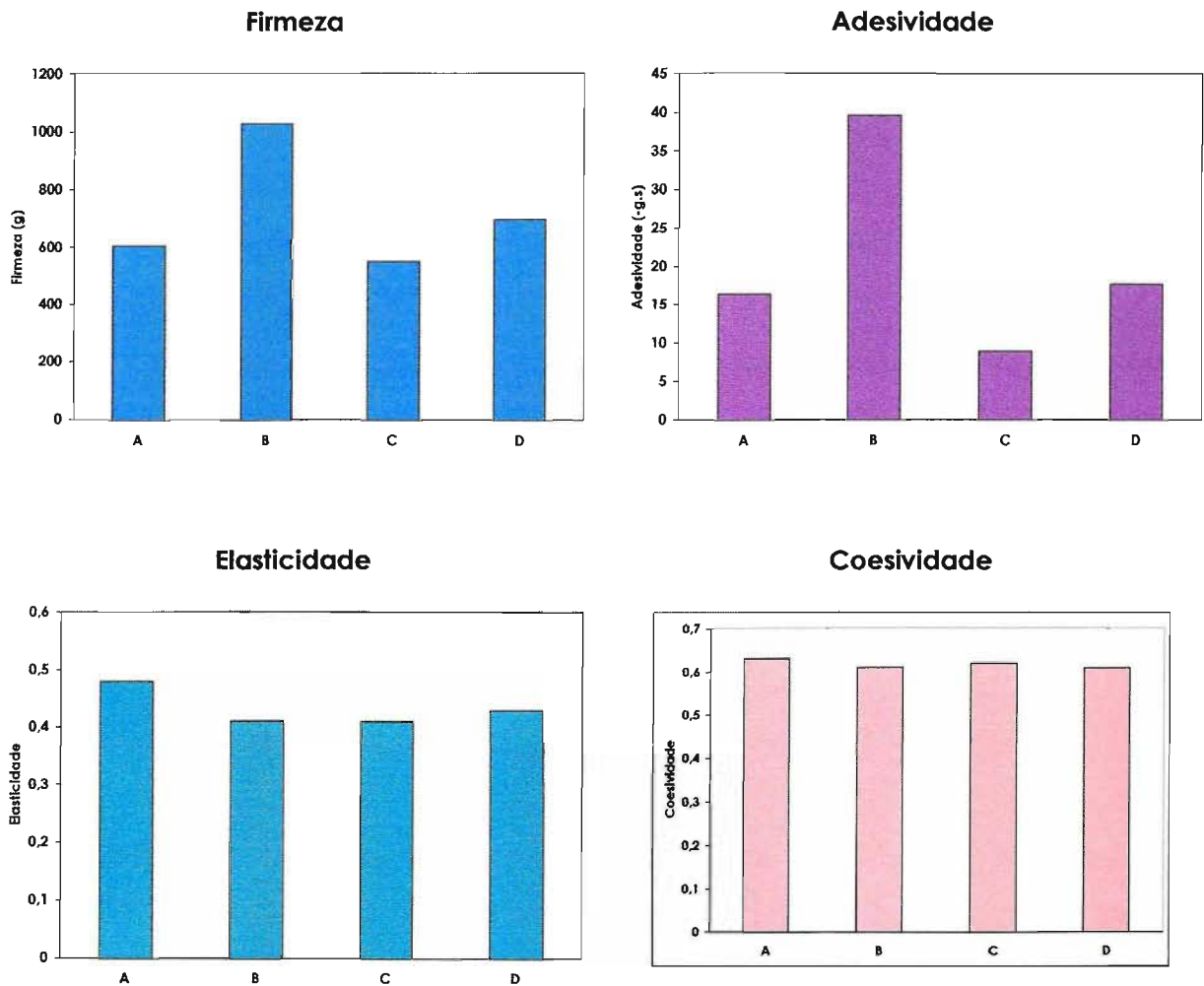


Figura 33 - Atributos de firmeza, adesividade, elasticidade e coesividade dos queijos Prato A, B, C e D com 45 dias de estocagem a $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

A coesividade foi relacionada com a proteólise primária em queijos Cheddar (LANE et al., 1997), tendo sido maior para queijo Emental com maior teor de proteína (33%) que Comté (21,6%) e Beaufort (19%) (GRAPIN et al., 1999), que se apresentavam mais deformáveis e elásticos que os outros. Essas diferenças foram relacionadas com a temperatura de aquecimento, bem como a relação S/U e suas consequências sobre a atividade da quimosina e plasmina (GRAPIN et al., 1999). Temperaturas mais elevadas de cozimento provocam uma diminuição ou supressão da atividade da quimosina, enquanto estimula a da plasmina.

Até o momento, os padrões de textura do queijo Prato não se encontram definidos e quase não existem informações a esse respeito na literatura nacional. SILVA (1998) comparando queijo Prato obtido por processo convencional e acelerado com a adição de enzima Neutrase, obteve valores de firmeza de 281 no queijo tradicional e de 255 no modificado para o parâmetro firmeza. Para a adesividade obteve 13,67g.s para o queijo tradicional e 20,67g.s.

4.9 ANÁLISE SENSORIAL DOS QUEIJOS MATURADOS

Ficou bem evidente neste estudo que a forte autólise de *Lab. helveticus*, evidenciada pela análise em "imunoblotting" nos queijos C e D, teve um impacto positivo na proteólise, levando a uma maior liberação de aminoácidos livres nesses queijos, e que, pequenas alterações na composição físico-química no queijo C retardou esse processo no queijo C. Devido a tais constatações, a análise sensorial foi realizada no sentido de se avaliar os efeitos da presença ou não dessa espécie nas propriedades sensoriais do queijo Prato.

A Tabela 10 apresenta os resultados médios obtidos na avaliação da análise sensorial descritiva e quantitativa dos queijos A, B, C e D com 45 dias de estocagem a $12 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Observa-se que somente o atributo aroma ácido não diferiu significativamente, ao nível de erro de 5%, entre os queijos das quatro origens. As diferenças observadas com relação aos demais atributos refletem a variabilidade de todos os fatores que influenciam a fabricação de queijos, principalmente a microbiota do leite e a composição físico-química dos queijos.

Avaliando-se os atributos de aparência dos queijos (Tabela 10), a análise da cor mostrou que o queijo B apresentou valor significativamente maior ($p < 0,05$) para a cor amarela do que os queijos A e C, que não diferiram entre si. O queijo D apresentou o menor valor. O queijo D apresentou-se mais característico com relação à presença de olhaduras, com valores significativamente ($p < 0,05$) mais elevados do que os queijos B, C e A.

Para os atributos de textura (Tabela 10) constatou-se que o valor de elasticidade do queijo A foi significativamente ($p < 0,05$) maior e o do queijo A foi o mais baixo. Os queijos A e C apresentaram valores mais elevados ($p < 0,05$) de flexibilidade que os dos queijos B e D. Os queijos A, B e D apresentaram valores mais elevados para firmeza ($p < 0,05$) e foram mais resistentes à mastigação ($p < 0,05$) do que o queijo C.

Com relação aos atributos de aroma, verificou-se que os valores de aroma de manteiga, intimamente relacionado com o diacetil e importante para o queijo Prato, foram significativamente ($p < 0,05$) mais elevados nos queijos B e C e D do que no queijo A. O queijo D apresentou valor mais elevado ($p < 0,05$) de aroma característico de maturado que os demais. Não houve diferença significativa ($< 0,05$) entre os queijos para o aroma ácido.

Quanto aos atributos de sabor (Tabela 10), os queijos A, B e C apresentaram valores superiores ($p < 0,05$) que os queijos A e C para o sabor característico de queijo Prato maturado. O queijo C apresentou o maior valor ($p < 0,05$) para o sabor salgado e o menor valor ($p < 0,05$) foi verificado para o queijo D. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os queijos A, B e C, considerados menos ácidos que o queijo D. Para o sabor doce, o valor do queijo D foi mais elevado ($p < 0,05$) que os dos queijos B e C, que não diferiram entre si. O queijo A apresentou o menor valor para este atributo. O queijo A apresentou o maior valor ($p < 0,05$) para o sabor amargo e residual que os queijos B, C e D. Os valores para o sabor picante não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os queijos A, B e C, que foram mais elevados que o do queijo D.

Tabela 10 - Valores médios para os atributos sensoriais das amostras de queijo Prato A, B, C e D com 45 dias de maturação a 12±2°C.

Atributo	Queijo				dms ¹
	A	B	C	D	
Aparência					
Cor amarela	4,0±1,3 b ²	7,1±1,2 a	4,5±1,4b	3,1±0,2 c	0,77
Olhaduras	1,9±1,1 d	4,8±2,0 b	3,1±1,4 c	7,0±0,2 a	0,70
Textura					
Elasticidade	5,5±1,3 a	4,6±1,5 b	5,3±1,1 ab	5,0±1,0 ab	0,90
Flexibilidade	5,6±1,6 a	4,8±1,4 b	5,7±1,2 a	5,2±0,6 ab	0,81
Firmeza	3,5±1,4 a	4,4±1,4 a	3,1±0,7 b	4,2±0,5 a	0,59
Resistência à mastigação	3,4±1,3 a	4,4±1,0 a	3,1±1,1 b	4,2±0,3 a	0,63
Aroma					
Manteiga	3,8±1,7 b	4,8±1,4 a	4,8±1,3 a	5,0±0,4 a	0,84
Ácido	3,4±1,5 a	3,4±1,4 a	3,5±1,1 a	3,0±0,3 a	0,64
Característico	4,3±1,9 c	5,6±1,6 b	5,3±1,3 b	7,0±0,5 a	0,79
Sabor					
Característico ³	3,8±1,5 a	3,9±1,2 a	4,3±1,1 a	2,9±0,3 b	0,48
Salgado	3,8±1,6 a	3,5±1,4 ab	3,7±1,2 a	3,0±0,3 b	0,54
Ácido	2,3±1,0 b	2,6±0,9 b	2,5±1,0 b	3,8±0,8 a	0,45
Doce	4,2±2,0 c	5,8±1,5 b	5,3±1,4 b	7,6±1,0 a	0,70
Amargo	3,4±1,8 a	2,8±1,2 ab	2,4±1,2 b	2,1±0,5b	0,75
Picante	3,1±1,5 a	2,8±1,1 a	2,9±1,2a	2,0±0,3 b	0,50
Residual	5,8±1,6 a	4,4±1,3 b	4,6±1,2 b	4,1±0,6 b	0,66

¹d.m.s: diferença mínima significativa ao nível de erro de 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey.

²As amostras (média±desvio padrão) seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ao nível de erro de 5%.

³ Sabor característico de queijo Prato maturado

Na Figura 34 são apresentados os resultados obtidos na análise de componentes principais realizada nas amostras de queijos, com relação aos atributos de aroma, sabor, textura e aparência. O primeiro componente principal, eixo x, explica 38,19% da variabilidade entre as amostras. Os dois componentes principais 1 e 2 dos atributos sensoriais juntos explicam 61,93% da variação entre as amostras.

O queijo A foi caracterizado pela maior intensidade de elasticidade e flexibilidade, sabores residual, amargo, picante, de queijo Prato maturado e salgado e aroma ácido. O queijo B foi caracterizado pela maior intensidade de cor amarela, resistência à mastigação, firmeza, aroma de manteiga. O queijo C foi caracterizado pela maior intensidade de flexibilidade, sabor característico de queijo Prato moderado, sabor salgado, e sabor picante. O queijo D foi caracterizado pela maior intensidade de olhaduras, aroma de queijo Prato, aroma de manteiga, sabor ácido e sabor doce muito intenso.

Em resumo, embora com variações quantitativas nas populações dos diferentes grupos de microrganismos isolados, os perfis microbiológicos dos queijos A, B, C e D foram similares, apresentando as culturas lácticas adicionadas, *Lactococcus lactis* sp. e *Leuconostoc* sp. e NSLAB, *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Aerococcus* sp., *Tetragenococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Destes, *Lactobacillus* sp. foi o gênero predominante na maturação dos queijos provenientes de quatro regiões brasileiras, Santa Catarina, Goiás, São Paulo e Minas Gerais. O queijo C diferiu dos demais por não apresentar *Pediococcus* sp. e *Streptococcus* sp.

A propriedade autolítica que essa microbiota apresentou durante a maturação foi dependente das espécies presentes, o que foi demonstrado pela ocorrência de autólise fraca de *Lac. lactis* sp. nos queijos das quatro origens e pela autólise intensa de *Lb. helveticus* nos queijos C e D. Esses resultados foram obtidos com a utilização de marcadores específicos de enzimas intracelulares por "Immunoblotting" e foram corroborados pela observação da maior liberação de aminopeptidases nos queijos C e D do que nos queijos A e B é também pela detecção, por zimogramas, de autolisinas livres nos queijos C e D e a ausência destas nos queijos A e B.

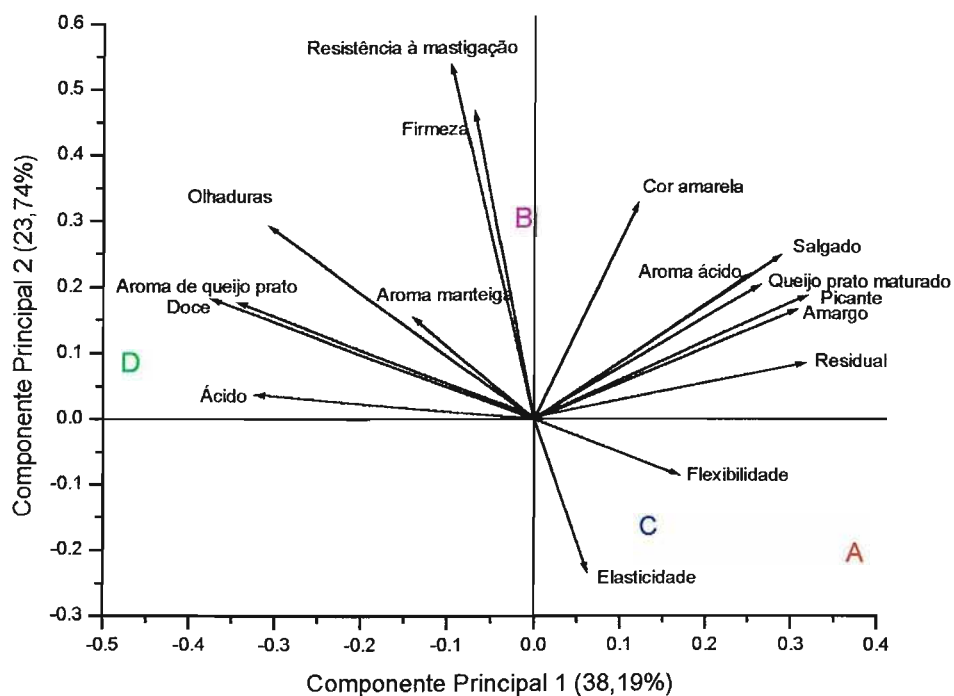


Figura 34- Representação gráfica por meio de vetores dos resultados da avaliação dos atributos de aparência, textura, aroma, sabor e sabor residual das amostras obtida por meio da técnica de componentes principais.

Os resultados mostraram claramente a existência de uma relação positiva entre a autólise de *Lab. helveticus* e o desenvolvimento da proteólise no queijo D, fato comprovado pelos maiores índices de proteólise e pelo perfil eletroforético deste queijo nos vários estágios de maturação. A degradação da α_{s1} -I caseína e da β -caseína foi maior nesse queijo, levando ao maior acúmulo de aminoácidos livres, desde o início da maturação.

A concentração de aminoácidos livres nos queijos constituiu-se no mais expressivo indicador da proteólise por bactérias lácticas, sendo este indicador fortemente dependente da autólise. Além da capacidade autolítica da linhagem, é importante a presença de um sistema peptidásico ativo. Nos queijos C e D, que apresentaram forte autólise de *Lab. helveticus*, a liberação de aminoácidos livres foi muito maior do que nos queijos A e B. A detecção do teor mais elevado de aminoácidos livres no queijo D no início da maturação comprovou a ocorrência de autólise dessa espécie durante a etapa de fabricação do queijo, com a conseqüente liberação de aminopeptidases.

No entanto, no queijo C, a evolução da proteólise foi mais lenta do que no queijo D, indicando que a autólise por si só não se constituiu num fator determinante na aceleração da proteólise. Pequenas variações existentes entre as propriedades físico-químicas do queijo C quando comparado ao D, especialmente com relação ao pH e ao conteúdo de sal na umidade, derivadas provavelmente de modificações tecnológicas podem ter tido um forte impacto na atividade das aminopeptidases do queijo C, resultando na baixa evolução da proteólise.

A autólise de *Lab. helveticus* no queijo D acelerou a proteólise, diminuindo o período de maturação em 45% e isto não afetou negativamente o desenvolvimento de "flavour" e nem da textura. Os queijos B, C e D apresentaram-se mais característicos, mas o aroma de manteiga e sabor doce, atributos desejáveis para o queijo Prato, foi mais acentuado no queijo D. Os resultados obtidos na análise sensorial mostraram que o queijo A era o mais descaracterizado e apresentou a maior intensidade de defeitos de "flavour" (residual e margor) e que os queijos B, C e D apresentaram-se os mais característicos, sendo o sabor doce e o aroma de manteiga mais acentuadas no queijo D. O sabor doce intenso observado no queijo D pode ser decorrentes da maior atividade enzimática de *Lab. helveticus* presente. Os queijos não apresentaram diferenças quanto à elasticidade e coesividade. Pequenas alterações na sua composição físico-química, principalmente nos teores

de umidade e de caseína, podem ter influenciado nos parâmetros de firmeza e adesividade.

Houve diferenças quantitativas entre os queijos das quatro origens no perfil de aminoácidos livres e de compostos aromáticos formados. Eles continham basicamente os mesmos compostos voláteis, mas em quantidades distintas. Os álcoois e ésteres foram os compostos majoritários nos queijos A e B e benzaldeído, 3-metil butanal-2 e hexanal nos C e D. Interessante destacar que benzaldeído tem sido identificado como um dos compostos voláteis produzidos por *Lb. helveticus*.

Neste estudo foi demonstrada pela primeira vez a autólise fraca de *Lac. lactis* sp. em queijo Prato de quatro origens e a autólise de *Lab. helveticus* em dois deles, C e D. A forte autólise dessa espécie teve um impacto positivo na proteólise, levando a uma maior liberação de aminoácidos livres nesses queijos. As diferenças na evolução da proteólise entre os queijos C e D, que foi mais lenta no queijo C, mesmo apresentando autólise de *Lab. helveticus* foram atribuídos à falta de uniformidade na composição físico-química, principalmente pH e os teores de sal na umidade (S/U).

O fato de não ter sido detectada a autólise de *Lac. lactis* sp. nos queijos das quatro origens, não significa necessariamente que estas espécies não tenham uma participação na formação de compostos aromáticos. Pesquisas recentes indicaram a necessidade de um equilíbrio entre células intactas e células lisadas para o desenvolvimento das propriedades sensoriais do queijo.

5 CONCLUSÕES

A análise quantitativa da população de bactérias lácticas durante a maturação mostrou perfis microbiológicos similares para todas as amostras de queijos examinadas. Após 5 dias de maturação, lactococos e estreptococos estavam presentes em números mais elevados do que lactobacilos mesofílicos e termofílicos, leuconostoc e fermentadores de lactato. Contudo, essas populações aumentaram consideravelmente no final do processo de maturação. Enterococos e fermentadores de citrato permaneceram em números relativamente reduzidos ao longo da maturação.

A análise qualitativa mostrou a predominância de “non starter lactic acid bactéria” (NSLAB) nos queijos das quatro origens, principalmente de *Lactobacillus* sp. Outros gêneros foram identificados em menor proporção: *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Aerococcus* sp., *Tetragenococcus* sp. e *Streptococcus* sp. O queijo C diferiu dos demais por não apresentar *Pediococcus* sp. e *Streptococcus* sp. As culturas lácticas adicionadas *Lactococcus lactis* sp. e *Leuconostoc* sp. também estavam presentes em populações menores.

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a autólise quase inexistente de *Lac. lactis* sp. em queijo Prato de quatro origens bem como a ocorrência de autólise de *Lab. helveticus* em dois dos queijos analisados, queijos C e D. A pronunciada autólise dessa espécie teve um impacto positivo na proteólise, que resultou no aumento da concentração de aminoácidos livres nesses queijos.

As diferenças na evolução da proteólise observada entre os queijos C e D, com taxas mais baixas no queijo C, independentemente da autólise pronunciada de *Lab. helveticus* foram atribuídas à falta de uniformidade na composição físico-química dos queijos, principalmente pH e os teores de sal na umidade (S/U).

Portanto, a autólise de *Lab. helveticus* no queijo D acelerou a proteólise, diminuindo o período de maturação em 45% e não afetando negativamente o desenvolvimento de “flavour” e nem a textura. Os queijos B, C e D apresentaram características mais típicas de queijo Prato, independentemente do fato de que o aroma de manteiga e o sabor doce serem mais acentuados no queijo D. O queijo A foi classificado como tendo as menores características de queijo Prato e apresentou maior nível de defeitos de “flavour”, principalmente residual e amargor. Os queijos

avaliados não apresentaram diferenças significativas quanto à elasticidade e coesividade. Pequenas alterações na composição físico-química dos queijos, principalmente os teores de umidade e de caseína, influenciaram nos parâmetros como a firmeza e a adesividade.

Com raras exceções, os queijos das quatro origens continham os mesmos compostos voláteis, embora em quantidades distintas. Os álcoois e ésters foram os compostos majoritários nos queijos A e B e benzaldeído, 3-metil-butanal-2 e hexanal nos C e D.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCOLAS, J.P., BLOQUEL, R., DIDENNE, R., REGNIER, J. Acid producing properties of thermophilic lactic bacteria with respect to yogurt making. **Lait**, Paris, v.57, n.561, p.1-23, 1977.
- ACTON, G.H. The determination of lactose in milk. **Aust. J. Dairy Technol.**, Highett, v. 32, n. 2, p. 11, 1977.
- ALBENZIO, M., CORBO, M.R., REHMAN, S.U., FOX, P.F., DE ANGELIS, M., CORSETTI, A., SEVI, A., GOBBETTI, M. Microbiological e biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 67, p. 35-48, 2001.
- ALBUQUERQUE, L.C. **Queijos no Brasil**. Juiz de Fora: EPAMIG/CEPE/ILCT, 1986. 140p.
- ALTING, A.C., ENGELS, W.J.M., VAN, S.S., EXTERKATE, F.A. Purification and characterization of cystathionine β -lyase from *Lactococcus lactis* subsp, *cremoris* B78 and its possible role in flavor developmente in cheese. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 61, p. 4037-4042, 1995.
- ALVES, G. **Parâmetros físico-químicos envolvidos na padronização e no rendimento de queijo prato**: modelagem matemática. Londrina, 1995. (Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Londrina).
- ANDREWS, A.T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 50, n. 1, p. 45-55, 1983.
- ANTONSSON, M., ARDÖ, Y., MOLIN, G. A comparison between the microflora of Herrgård cheese from three different dairies. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 11, p. 285-291, 2001.
- ARDÖ, Y., THAGE, B.V., MADSEN, J.S. Dynamics of free amino acid composition in cheese ripening. **Aust. J. Dairy Technol.**, Highett, v. 57, n. 2, p.109-115, 2002.

- ARIZCUN, C., TORRE, B.P. Identification and characterization of proteolytic activity of *enterococcus* spp. isolated from milk and roncal and idiazábal cheese. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 38, p. 17-24, 1997.
- ARORA, G., LEE, B.H., LAMOUREAUX, M. Characterization of enzyme profiles of *Lactobacillus lactis* species by a rapid API ZYM systems. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 73, p. 264-273, 1990.
- ASCHAFFENBURG, R., DREWRY, J. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. *In: International Dairy Congress, 1959. London. Proceedings...* London, International Dairy Federation, 1959. p. 1631-1637.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. **Produção Brasil-Queijos comuns em estabelecimentos sob inspeção federal em toneladas.** São Paulo, 1999.
- AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *In: SALMINEN, S. & von WRIGHT, A (Eds). Lactic acid bacteria.* New York: Marcel Dekker, 1993. Chap. 1, p.1-63.
- AYAD, E.H.E., VERHEUL, A., WOUTERS, J. T. M., SMIT, G. Application of wild starter cultures for flavour developmen in pilot plat cheese making. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 10, p. 169-179, 2000.
- AYAD, E.H.E., VERHEUL, A., WOUTERS, J. T. M., SMIT, G. Population dynamics of lactococci from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for gouda-type cheese. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 11, p. 51-61, 2001.
- BAANKREIS, R., SCHALKIJK, S.V., ALTING, A.C. The ocurrence of two intracellular oligoendopeptidases in *lactococcus lactis* and significance for peptide conversion in cheese. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 44, p. 386-392, 1995.
- BALDINI, V.L.S. **Proteólise em queijo prato durante a maturação.** São Paulo, 1998. 208p. (Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo).

- BARTELS, H. J., JOHNSON, M.E., OLSON, N.F. Accelerated ripening of Gouda cheese. 2. Effect of freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavor development. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 42, p. 139, 1987.
- BASSO, A., GOFFO, A., ROSSI, G., CONTERNO, N.A. Preliminary characterization of the microflora of Montasio cheese – occurrence of galactose fermenting strains in cheese and in natural starter cultures. **Microbiologie-Aliments-Nutrition**, Chatenay-Malabry, v.12, p. 139-144, 1994.
- BERESFORD, T.P., FITZSIMONS, N.A., BRENNAN, N.L., COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 11, p.259-274, 2001.
- BERTHIER, F., BEUVIER, E., DASEN, A., GRAPPIN, R. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 11, p. 293-305, 2001.
- BHOWMIK, T., MARTH, E. H. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 73, p. 859-866, 1990.
- BIE, R., SJÖSTRÖM, G. Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part I: material and methods. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 30, p. 653-657, 1975a.
- BIE, R., SJÖSTROM, G. Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part II: Experiments with fluid substrates and cheese. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 30, p. 739-747, 1975b.
- BIE, R., SJÖSTROM, G. Autolytic properties of some lactic bacteria used in cheese production. Part I: Material and methods. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 30, 653-657, 1975c.
- BIKERLAND, S.E., ABRAHAMSEN, R.K., LANGSRUD, T. Accelerated cheese ripening: use of Lac- mutants of *Lactococci*. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 59, p. 389-400, 1992.

- BLAKESLEY, R.W., BOEZI, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie Brilliant Blue G250. **Anal. Biochem.**, New York, v.82, p. 580-582, 1977.
- BOSSET, J.O., GAUCH. Comparison of the volatile flavour compound of six European "AOC" cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. **Int. Dairy J.**, Barking, v.3, p. 359-377, 1993.
- BOURNE, M.C. Texture profile analysis. **Food Technol.**, Chicago, v. 32, p. 62-72, 1978.
- BOUTON, Y., GUYOT, P., GRAPPIN, R. Preliminary characterization of microflora of Comté cheese. **Appl. Microbiol.**, Washington, v. 85, p. 123-131, 1998.
- BOUTROU, R., SEPULCRE, A., GRIPON, J.C., MONNET, V. Simple test for predicting the lytic behavior and proteolytic activity of lactococcal strain in cheese. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 81, n. 9, p. 2321-2328, 1998a.
- BOUTROU, R., SEPULCHRE, A., PITEL, G., DURIER, C., VASSAL, L., GRIPON, J. C. MONNET, V. Lactococcal lysis and curd proteolysis: two predictable events important for the development of cheese flavour. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 8, p. 609-616, 1998b.
- BROLAZO, E., LERAYER, A.L.S., MORENO, I., GRAEL, E.T.M. Caracterização de enterococos produtores de diacetil isolados de queijo Minas Frescal artesanal. In: Simpósio Latinoamericano de Ciência de Alimentos, 4., 2001. Campinas. **Anais...Campinas**, 2001.
- BROOME, M.C., KRAUSE, D.A., HICKEY, M.W. The use of non-starter lactobacilli in cheddar cheese manufacture. **Aust. J. Dairy Technol.**, Highett, p. 67-73, 1990.
- BRUINENBERG, P.G., DOESBURG, P., ALTING, A.C., EXTERKATE, F.A., DE VOS, W.M., SIEZEN, R.J. Evidence for a large dispensable segment in the subtilisin-like catalytic domain of the *Lactococcus lactis* cell-envelope proteinase. **Protein Eng.**, Oxford, v. 7, p. 991-996, 1994.

- BRUINENBERG, P.G., ROO, G., LIMSOWTIN, G.K.Y. Purification and characterization of cystathionine γ -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11: possible role in flavor compound formation during cheese maturation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, p. 561-566, 1997.
- BRULÉ, G., LENOIR, J. The coagulation of milk. In : ECK, A., MANN, E.J., THOMSON (Eds). **Cheesemaking: science and technology**. Paris: Lavoisier, 1996. p.1-32.
- BUIST, G., VENEMA, G., KOK, J. Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, n. 22, p. 5947-5953, 1998.
- BUIST, G., KARSENS, H., NAUTA, A., SINDEREN, D.V., VENEMA, G., KOK, J. Autolysis of *Lactococcus lactis* by induced overproduction of its major autolysin, AcmA. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, p. 2722-2728, 1997.
- BUIST, G., KOK, J., LEENHOUTS, J., DABROWSKA, M., VENEMA, G., HAANDRIKMAN, A.J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177, p. 1554-1563, 1995.
- BUNTHOLF, C.J., LEMEN, K., BREUWER, P., ROMBOUTS, F.M., ABEE, T. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, n. 5, 2001.
- CLARKE, A.J., DUPONT, C. O-acetylated peptidoglycan: its occurrence, pathobiological significance, and biosynthesis. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 38, p. 85-91, 1992.
- CLEVELAND, R.F., DANEO-MOORE, L., WICKEN, A.J., SHOCKMAN, G.D. Effect of lipoteichoic acid and lipids on lysis of intact cells of *Streptococcus faecalis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 127, p. 1582-1584, 1976.
- CLEVELAND, R.F., WICKEN, A.J., DANEO-MOORE, L., SHOCKMAN, G.D. Inhibition of wall autolysis in *Streptococcus faecalis* by lipoteichoic acid and lipids. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 126, p. 192-197, 1976.

- COGAN, T.M. Flavour production by dairy starters cultures. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 79, (Suppl.), p. 49S-64S, 1995.
- COGAN, T.M. History and taxonomy of starter cultures. In: COGAN, T.M., ACCOLAS, J.P. (Eds.). **Dairy starter cultures**. [s.l.]: VHC PUBLISHERS, 1996. p 1-11.
- COGAN, T.M., PEITERSEN, S. Starters systems. **Bull. Int. Dairy Fed.**, Brussels, n. 263, 1991.
- COYETTE, J., GHUYSEN, J.M. Structure of the walls of *Lactobacillus acidophilus* Strain 63 AM Gasser. **Biochemistry**, Easton, v. 9, p. 2935-2943, 1970.
- COURTIN, P., NARDI, M., WEGMANN, U., JOUTSJOKI, V., OGIER, J.C., GRIPON, J.C., PALVA, H.B., MONNET, V. Accelerating cheese proteolysis by enriching *Lactococcus lactis* proteolytic system with lactobacilli peptidases. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 12, p. 447-454, 2002.
- CREAMER, L.K., OLSON, N.F. Rheological evaluating of maturing cheddar cheese. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 47, p. 631-636, 1982.
- CROW, V.L., MARTLEY, F.G., COOLBEAR, T., GOPAL, T.P., MARTLEY, F.G., MCKAY, L.L., RIEPE, H. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 5, p. 855-875, 1995a.
- CROW, V., CURRY, B., CHRISTISON, M., HELLIER, K. Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. **Aust. J. Dairy Technol.**, Highett, V. 57, n. 2, p. 99-104, 2002.
- CROW, V.L., MARTLEY, F.G., COOLBEAR, T., ROUNDHILL, S.J. The influence of phage-assisted lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML 8 on cheddar cheese ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v.5, p.451, 1995b.
- CROW, V.L., COOLBEAR, T., GOPAL, P.K., MARTLEY, F.G., MCKAY, L.L., RIEPE, H. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 5, p. 855-875, 1995c.

- CROW, V.L., COOLBEAR, T., PRITCHARD, G.G., MARTLEY, F.G. Starters finishers properties relevant to cheese ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 3, p. 423-460, 1993.
- CHAPMAN, H.R., SHARPE, M.E. Microbiology of cheese. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 203-289.
- CHAPOT-CHARTIER, M.P., DENIEL, C., ROUSSEAU, M., VASSAL, L., GRIPON, J.C. Autolysis of two cultures of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 4, p. 251-269, 1994.
- CHAPOT-CHARTIER, M.P. Les autolysins des bactéries lactiques. **Lait**, Paris, v. 76, p. 91-101, 1996, 1996.
- CHICH, K., GRIPON, J.C. Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: Purification and characterization. **Int. Dairy J.**, Barking, v.7, p. 169-174, 1997.
- CHRISTENSEN, J.E., DUDLEY, E.G., PEDERSON, J.A., STEELE, J.L. Peptidases and amino acids catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, n. 76, p. 217-246, 1999.
- CHRISTENSEN, J.E., JONSON, M.E., STEELE, J.L. Productions of Cheddar cheese using a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 derivative with enhanced aminopeptidase activity. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 5, p. 367-379, 1995.
- CHRISTENSEN, J.E., STEELE, J.L. Characterization of peptidase-deficient *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 derivatives. **Symposium on Lactic Acid Bacteria**, 5., 1996. Veldhoven. Proceedings...Veldhoven, 1996.
- CHRISTENSEN, T.M.I.E., BECK, A.M., WERNER, H. Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation**. Bruxelles, 1991. n. 261, p.4-9.

- CORROLER, D., MANGIN, I., DESMASURES, N., GUEQUEN, M. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 64, p. 4729-4735, 1998.
- DAKO, E., EL SODA, M., VUILLEMARD, J.C., SIMARD, R.E. Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. **Food Res. Int.**, Ottawa, v. 28, n. 5, p. 503-509, 1995.
- DE JONG, L. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 3. The micellar structure of Meshanger cheese. **Neth. Milk Dairy J.**, Amsterdam, v. 32, n.1, p. 15-25, 1978.
- DE VOS, W.M., SIEZEN, R.J. Engineering pivotal proteins for lactococcal proteolysis. In: Andrews, A.T., Varley, J. (eds). **Biochemistry of milk products**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, [19-]. p. 56-71
- DELCOU, J., FERAIN, T., DEGHOIRAIN, M., PALUMBO, E., HOLS, P. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 76, p. 159-184, 1999.
- DELLAGLIO, F., TORRIANI, S., PATTARINI, F., RICCI, C., BUCCHIANICO, R. D. Identificazione e caratterizzazione tecnologica della microflora lattica naturale del formaggio Pecorino D' Abruzzo. **Sci. Tec. Latt. Casearia**, Parma, v. 46, n. 2, p. 82-97, 1995.
- DELLAGLIO, F., BOTTAZZI, V. Tassonomia dei batteri lattici. In: BOTTAZZI, V (Ed.). **Aggiornamento di microbiologia dei batteri lattici**. Piacenza, 1984. p. 7-56.
- DELLAGLIO, H., ROISSART, H., TORRIANI, S., CURK, M.C., JANSSENS, D. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: ROISSART, H., LUQUET, F.M. (Eds). **Bactéries Lactiques: aspects fondamentaux et technologiques**. Paris: Loriga, 1994. vol. 1, p. 25-139.

- DEL POZO, B.F., GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ-MARÍN., NÚÑEZ, M. Changes in chemical and rheological characteristics of La Serena ewe's milk during ripening. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 55, p. 457-464, 1988.
- DESMAZEAUD, M.J., GRIPON, J.C. General mechanism of protein breakdown during ripening. **Milchwissenschaft**, Amsterdam, v. 32, p. 731-734, 1977.
- DEUTSCH, S.M., FERAIN, T., DELCOUR, J., LORTAL, S. Lysis of lysogenic strains of *Lactobacillus helveticus* in swiss cheeses and concomitant *Streptococcus thermophilus* lysis. **Int. Dairy Fed.**, Brussels, v. 12, n. 591-600, 2002.
- DUN, H.C., LINDSAY, R.C. Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavours of cheddar cheese. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 68, p. 2859-2874, 1985.
- DYBING, S.T., WIEGAND, J.A., HUANG, E.A., CHANDAN, R.C. Effect of processing variables on the formation of calcium lactate crystals on cheddar cheese. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 71, p. 1701-1710, 1988.
- EL SODA, M. Control and enhancement of flavour cheese. In: LAW, B.A. (Ed.) **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. London: Chapman and Hall, 1997. p. 219-252.
- EL SODA, M., DESMAZEAUD, M. J., ABOUDONIA, S., BADRAN, A. Acceleration of cheese ripening by the addition of extracts from *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* to the cheese curd. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 37, p. 325-326, 1982.
- EL-KHOLY, W., EL-SODA, M., EZZAT, N., ELSHAFEI, H. Autolysis and intracellular enzyme from cheese related dairy lactobacilli. **Lait**, Paris, v. 78, p. 439-452, 1998.
- ELORTONDO, F.J.P., ALBISU, M., BARCINA, Y. Changes in the microflora of idiazábal cheese with the of commercial lactic starters. **Aust. J. Dairy Technol.**, Highett, v. 48, p. 10-13, 1999.

- ENGELS, W.J.M. **Volatile and non-volatile compounds in ripened cheese:** their formation and their contribution to flavor. Wageningen, 1997. 129p. (Thesis Doctor - Agricultural University, Wageningen, the Netherlands).
- ESTEPAR, J., SÁNCHEZ, M.M., ALONSO, L., MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal "Peñamellera" cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 9. p. 737-746, 1999.
- FARKIE, N.Y., FOX, P.F. Preliminary study on the contribution of plasmin to proteolysis in cheddar cheese: cheese containing plasmin inhibitor 6-aminohexanoic acid. **J. Agr. Food Chem.**, Easton, v. 39, n. 4, p. 786-788, 1991.
- FERNÁNDEZ-MURGA, M.L., RUIZ HOLGADO, A.P.R., VALDEZ, G.F. Influence of pH on the autolytic activity of *Lactobacillus acidophilus*. **Microbiologie-Aliments-Nutrition**, Chatenay-Malabry, v. 12, p. 423-428, 1994.
- FERNÁNDEZ-MURGA, M.L., RUIZ HOLGADO, A.P.R., VALDEZ, G.F. Influence of the incubation temperature on the autolytic activity of *Lactobacillus acidophilus*. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 78, p. 426-429, 1995.
- FLEET, G.H. Microorganisms in food ecosystems. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 50, p. 101-117, 1999.
- FOX, P.F. Cheese: an overview. In: FOX, P.F. (Ed.). **Cheese:** chemistry, physics and microbiology general aspects. London: Elsevier Applied Science, 1987. v. 1, p. 1-33.
- FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 72, n. 6, p. 1379-1400, 1989.
- FOX, P.F., O'COONOR, T.P., MCSWEENEY, P.L.H. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Adv. Food Nutr. Res.**, San Diego, v. 39, p. 165-328, 1996.

- FOX, P.F., LAW, J., McSWEENEY, P.L.H., WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P.F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology general aspects.** New York: Chapman & Hall, 1993. p. 389-438.
- FOX, P.F., LUCEY, J.A., COGAN, T.M. Glicolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Cleveland, v. 29, p. 237-253, 1990.
- FOX, P.F., MCSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry biochemistry.** London: Blackie Academic Professional, 1998. 476p.
- FOX, P.F., STEPANIAK, L. Application of enzymes in cheese technology. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 3, p. 509, 1993.
- FRANCO, I., PRIETO, B., URDIALES, R., FRESNO, J.M., CARBALLO, J. Study of the biochemical changes during ripening of Ahumado de Ávila cheese: a spanish traditional variety. **Food Chem.**, Oxford, 74, p. 463-469, 2001.
- FRANK, J.F., CHRISTEN, G.L., BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In: Robert T. Marshall (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy products.** 16.ed. [s.l.]: American Public Health, 1992. p. 271-286.
- FREITAS, A.C., SOUSA, M.J., MALCATA, F.X. Effect of ripening time and the combination of ewe goat milk on the microflora of picante cheese. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 4, p. 361-377, 1995.
- FREITAS, C., PINTADO, A.E., PINTADO, M.E., MALCATA, F.X. Role of dominant microflora of picante cheese on proteolysis and lipolysis. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 9, n. 9, p. 593- 603, 1999.
- FUGLSANG, C.C., JOHANSEN, C., CHRISTGAU, S., ADLER-NISSEN, J. Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v. 6., p.390-396, 1995.

- FURTADO, M.M., LOURENÇO-NETO, J.P.M. **Tecnologia de queijos**: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 112p.
- FURTADO, M.M., SOUZA, H.M., MUNCK, A.V. Controle de salga e umidade do queijo Prato pelo banho de água gelada. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 34, p. 9-14, 1979.
- FURTADO, M.M., WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Fabricação de queijo prato e minas: estudo do rendimento. Parte II: Determinação das cifras de transição. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 34, n. 3-19, 1979.
- FURTADO, M.M., WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Perda de umidade da coalhada durante a fabricação do queijo Prato. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 38, p. 3-19, 1983.
- FURTADO, M.M., WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Étude de quelques aspects de la fabrication des fromages brésiliens prato e minas. **Lait**, Paris, v. 58, p. 510-530, 1978.
- GAGNARE, V., LORTAL, S., LEONIL, J. Free active peptidases are detected in emmental juice extracted before ripening in the warm room. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 65, p. 119-128, 1998.
- GARCÍA, M.C., OTERO, A., GARCÍA, M.L., MORENO, B. Microbiological quality and composition of two types of spanish sheep's milk cheeses (manchego and burgos varieties). **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 54, p. 551-557, 1987.
- GARCIA, S. **Isolamento e seleção tecnológica de culturas lácticas para a fabricação de queijos**. Campinas, 1984. 89p. (Tese de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- GASSON, M.J. Lytic systems in lactic acid bacteria and their bacteriophages. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 70, p. 147-159, 1996.

- GAYA, P., BABÍN, M., MEDINA, M., NUÑEZ, M. Diversity among lactococci isolated from we's'raw and cheese. **Soc. Appl. Microbiol.**, Danvers, v. 87, p. 849-855, 1999.
- GHUYSEN, J.M., TIPPER, D.J., STROMINGER, J.L. Enzymes that degrade bacterial cell walls. **Meth. Microbiol.**, v.3, p. 685-669, 1966.
- GOBBETTI, M., LOWNEY, S., SMACCHI, E., BATTISTOTTI, B., DAMIANI, P., FOX, P.F. Microbiology and biochemistry of Tallegio cheese during ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 7, p. 509-517, 1997.
- GOBETTI, M., FOLKERTSMA, B., FOX, P.F., CORSETTI, A., SMACCHI, E., DE ANGELIS, M., ROSSI, J., KILCAWLEY, K., CORTINI, M. Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 7, p. 509-517, 1999.
- GOBETTI, M., FOX, P.F., STEPANIAK, L. Esterolytic and lipolytic activities of mesophilic and thermophilic lactobacilli. **Ital. Food Sci.**, Pinerolo, n. 2, p. 127-133, 1996a.
- GOBETTI, M., SMACCHI, E., CORSETTI, A. The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an amonipeptidase. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 62, p. 3220-3226, 1996b.
- GONZÁLES, T., ROBERT, B. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, n. 18, p. 319-344, 1996.
- GRAPPIN, R., RANK, T.C., OLSON, N.F. Primary proteolysis of cheese proteins ripening: a review. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 68, n. 3, p. 331-540, 1985.
- GRIPON, J.C., DESMAZEAUD, M.J., LE BARS, D., BERGERE, J.L. Étude du role des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II Influence de la pressure commerciale. **Lait**, Paris, v. 55, p. 502-515, 1975.
- GOVINDASAMY-LUCEY, S., GOPAL, P.K., SULLIVAN, P.A., PILLIDGE, C. Varying influence of the autolysin, N-acetyl muramidase, and the cell envelope

- proteinase on the rate of autolysis of six commercial *Lactococcus lactis* cheese starter grown in milk. **J. Dairy Res.**, Cambridge, n. 67, p. 585-596, 2000.
- GROUX, M., MOINAS, M. La flaveur des fromages. II. Etude comparative de la fraction volatile. **Lait**, Paris, n. 531-532, p. 44-52, 1974.
- GRUFFERTY, M.B., FOX, P.F. Factors affecting the release of plasmin activity from casein micelles. **New Zeal. J. Dairy Sci. Technol.**, Palmerston North, v. 23, p. 153-163, 1988b.
- HABIB-NAJAFI, M.B., LEE, B.H. Bitterness in cheese: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Cleveland, v. 36, p. 397-411, 1996.
- HARBOE, M.K., BUNDTZ, P. The production, action and application of rennet and coagulants. In: LAW, B. (Ed). **Technology of cheesemaking**. Sheffield: Sheffield Academic Press, 1999. p. 33-65.
- HARRIGAN, W.F., MCCANCE, E. **Laboratory methods in food and dairy microbiology**. London: Academic Press, 1976. 452p.
- HÉBERT, E. M., RAYA, R.R., TAILLIEZ, P., GIORI, G.S. Characterization of natural isolates of *Lactococcus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 59, p. 19-27, 2000.
- HEMME, D., BOUILLANNE, C., MÉTRO, F., DESMAZEAUD, M.J. Microbial catabolism of aminoacids during ripening. **Scie. Aliment.**, Paris, n. 2, p. 113-123, 1982.
- HORWITZ, W. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12.ed. Washington: AOAC, 1975. p. 284, (proc. 16223).
- HOSKEN, F.S., GAUDERETO, L.Q. Influência da cultura láctica na qualidade do queijo prato variedade lanche. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 28, p. 1-8, 1973.
- HUGENHOTZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 12, p. 165-178, 1993.

HUSSON-KAO, C., MENGAUD, J., GRIPON, J.C., BENBADIS, L., CHAPOT-CHARTIER, M.P. Characterization of *Streptococcus thermophilus* Strais that undergo lysis under un favourable enviromental conditions. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 55, p. 209-213, 2000.

HUSSON-KAO, C., MENGAUD, J., GRIPON, J.C., BENBADIS, L., CHAPOT-CHARTIER, M.P. The autolysis of *Streptococcus thermophilus* DN-001065 is triggered by several food-grade enviromental signals. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 9, p. 715-723, 1999.

HYNES, E., OGIER, J.C., DELACROIX-BUCHET, A. Proteolysis during ripening of miniature washed-curd cheeses manufacture with different strains of satarter bacteria and a *Lactobacillus plantarum* adjunct culture. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 11, p. 587-597, 2001.

IMHOF, R., BOSSET, J.O. Relations between micro-organisms and formation of aroma compounds in fermented dairy products (Review). **Z. Lebensm. Unters. Forch.**, Berlin, n. 198, p. 267-276, 1994.

IMHOF, R., GLÄTTLI, H., BOSSET, J.O. Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic single strain dairy starter cultures. **Z. Lebensm. Unters. Forch.**, Berlin, n. 28, p. 78-86, 1995.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IAL, 1985. v. 1, 371p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the protein content of processed cheese products. Bruxelas: FIL/IDF, 1964. 3p. (FIL/IDF, 25).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the protein total nitrogen content of milk by Kjeldahl method. Bruxelas: FIL/IDF, 1962. 3p. (FIL/IDF, 20).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the total solids content of cheese and processed cheese. Bruxelas: FIL/IDF, 1982. 2p. (FIL/IDF, 4A).

- JUILLARD, V., LAAN, H., KUNJI, E.R.S., STRATINGH, C.M.J., BRUINS, A.P., KONINGS, W.N. The extracellular p_i-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyses β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 177, p. 3472-3478, 1995.
- KANG, O.J., VEZINZ, L.P., LABERGE, S., SIMARD, R.E. Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 81, p. 639-646, 1998.
- KAO, C.H., MENGAUD, J., GRIPON, J.C., BENBADIS, L., CHAPOT-CHARTIER, M.P. The autolysis of *Streptococcus thermophilus* DN-001065 is triggered by several food-grade environmental signals. **Int. Dairy J.**, Barking, v.9, p. 715-723, 1999.
- KIERNAN, R.C., BERESFORD, T.P., O'CIUNN, G., JORDAN, K.N. Autolysis of *Lactobacilli* during cheedar cheese ripening. **Ir. J. Agr. Food Res.**, Dublin, v. 39, p. 95-106, 2000.
- KLEIN-IBLED, J.R., SCHICK, J., HENRICH, B., PLAPP, R. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290 *pepG* gene encodes a novel cysteine aminopeptidase. **Microbiol.**, New York, v. 143, p. 527-537, 1997.
- KLEIN-IBLED, N. **Cheese-related enzymatic activities of *Lactobacillus helveticus* and *Kluyveromyces lactis* and their potential use as attenuated starters.** Rennes, 2001. 107p. (These de Doctorat - L'École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes).
- KLEIN-IBLED, N., LORTAL, S. Attenuated starters, an efficient means to influence cheese ripening: a Review. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 9, p. 751-762, 1999.
- KOK, J., LEENHOUTS, K.J., HAANDRIKMAN, A.J., LEDEBOER, A.M., VENEMA, G. Nucleotide sequence of the cell wall-associated proteinase gene of *Streptococcus cremoris*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.54, p. 231-238, 1988.

- KOK, J., DE VOS, W.M. The proteolytic system of lactic acid bacteria. In: GASSON, M., DE VOS, W. (Eds.). **Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria**. London: Blackie and Professional, 1994. p. 169-210.
- KRANENBURG, R.V., KLEEREBEZEM, M., Vlieg, J.V.H., URSING, B.M., BOEKHORST, J., SMIT, B. A., AYAD, E.H.E., SMIT, G., SIEZEN, R.J. Flavour formation from amino acids by lactic bacteria: predictions from genome sequence analysis. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 12, p. 111-121, 2002.
- KUCHROO, C.N., FOX, P.F. Soluble nitrogen in cheddar cheese: comparison of extraction procedures. **Milchwissenschaft**, Munchen, v.37, p. 331-335, 1982.
- KUNJI, E.R.S., HAGTING, A., DE VRIES, C.J., JUILLARD, V., HAANDRIKMANS, A.J., POOLMAN, B., KONINGS, W.N. Transport of β -casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 270, p. 1569-11574, 1995.
- KUNJI, E.R.S., SMID, E.J., PLAPP, R., POOLMAN, B., KONINGS, W.N. Di-tripeptides and oligopeptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 2052-2059, 1993.
- KUNJI, E.R.S., MIERAU, I., HAGTING, A., POOLMAN, B., KONINGS, W.N. The proteolytic system of lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 70, p. 178-221, 1996.
- L'ANSON, K.J.A., MOVAHEDI, S., GRIFFIN, H.G., GASSON, M.J., MULHOLLAND, F. A non-essential glutamyl aminopeptidase is required for the growth of *Lactococcus lactis* MG1363 in milk. **Microbiol.**, New York, v. 141, n. 2873-2881, 1995.
- LAAN, H., KONINGS, W.N. Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 55, p. 3101-3106, 1989.

- LAAN, H., TAN, S.E., BRUINENBERG, P., LIMSOVTIN, G., BROOME, M. Aminopeptidase activities of starter and non-starter lactic acid bacteria under simulated Cheddar cheese ripening conditions . **Int. Dairy J.**, Barking, v. 8, n. 267-274, 1998.
- LANE, C.N., FOX, P.F. Role of starter enzymes during ripening of cheddar cheese made from pasteurized milk under controlled microbiological conditions. **Int. Dairy J.**, Barking, v.7, p. 55-63, 1997.
- LANGSRUD, T., LANDAAS, A., CASTBERG, H.B. Autolytic properties of different strains of group N streptococci. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 42, p. 556-560, 1987.
- LAW, B.A., CASTAÑON, M.J., SHARPE, M.E. The contribution of starter streptococci to flavour development in cheddar cheese. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v.43, n.2, p.301-311, 1976.
- LAW, B.A., KOLSTAD, J. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 49, p. 225-245, 1983.
- LAW, B.A., SHARPE, E., REITER, B. The release of intracellular dipeptidase from starter streptococci. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 41, p. 137-146, 1974.
- LAW, J., FITZGERALD, G.F., LOWE, T.U., DALY, C., FOX, P.F. The contribution of lactococcal starter proteinases to proteolysis in cheddar cheese. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.76, p. 2455-2467, 1993.
- LAW, J., FITZGERALD, G.F., DALY, C., FOX, P.F., FARKIE, N.Y. Proteolysis and flavor development in cheddar cheese made with the single starter strains *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* UC317 or *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 75, p. 1173-1185, 1992.
- LAWRENCE, R.A., CREAMER, L.K., GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 70, p. 1748-1760, 1987.

- LECLERC, D., ASSELIN, A. detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 35, p. 749-753, 1989.
- LEMÉE, R., LORTAL, S., CESSÉLIN, B., VAN HEIJENOORT, J. Involvement of an N-acetylglucosaminidase in autolysis of *Propionibacterium freundenreichii* CNRS 725. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 60, p. 4351-4358, 1994.
- LEPEUPLE, A.S., VASSAL, L., CESSÉLIN, B., DELACROIX-BUCHET, A., GRIPON, J.C., CHAPOT-CHARTIER, M.P. Involvement of a prophage in the lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 during cheese ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 8, p. 667-674, 1998a.
- LEPEUPLE, A., GEMERT, E.V., CHAPOT-CHARTIER, M. Analysis of the bacteriolytic enzymes of the autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AM2 by renaturing polyacrylamide gel eletrophoresis: identification of a prophage-encoded enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 64, n.11, p. 4142-4148, 1998b.
- LIMSOWTIN, G.K.Y., POWELL, I.B., PARENTE, E. Types of starters. In: COGAN, T.M., ACHOLAS, J.P. (Eds.). **Dairy starters cultures**. [s.l.]: VCH Publishers, 1996. p. 4-11.
- LITOPOULOU-TZANETAKI, E., GRAHAM, D.C., BEYATLY, Y. Detection of *Pediococci* and nonstarter organisms in american cheddar cheese. **J. Dairy Sci.**, n. 72, p. 854-858, 1989.
- LORTAL, S. **Autolysis of lactic acid bacteria**: mechanisms and technological importance ("in press", 2003).
- LORTAL, S. Autoysis of lactic acid bacteria: mechanisms and technological importance. **Tecnol. Láctea Latin.**, Buenos Aires, n. 7, p. 13-23, 1997.
- LORTAL, S. L'autolyse des bactéries, phénomène clé de láffinage? **Techno – Process**, v. 1111, p. 61-62, 1995.

- LORTAL, S., LEMÉE, R., VALENCE, F. autolysis of thermophilic lactobacilli and dairy propionibacteria: a review. **Lait**, Paris, v. 77, p. 133-150, 1997.
- LORTAL, S., ROUSSEAU, M., BOYAVAL, P., VAN HEIJENOORT, J. Cell wall and autolytic system of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 137, p. 549-559, 1991.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 193, n. 265-275, 1951.
- LYNCH, C.M., MCSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F., COGAN, T.M., DRINAN, F.D. Manufacture of cheddar cheese with and without adjunct *Lactobacilli* under controlled microbiological conditions. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 6, p. 851-867, 1996.
- LYNCH, C.M., McSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M., DRINAN, F.D. Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in cheddar cheese with a controlled microflora. **Lait**, Paris, n. 2, p. 441-449, 1997.
- MACEDO, A.C., VIEIRA, M., POÇAS, R., MALCATA, F.X. Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 10, p. 769-774, 2000.
- MALIK, A.C., REINBOLD, G.W., VEDAMUTHU, E.R. An evaluation of the taxonomy of *Propionibacterium*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 14, p. 1185-1191, 1968.
- MANNU, L., COMUNIAN, R., SCINTU, M.F. Mesophilic *Lactobacilli* in fiore sardo cheese: pcr-identification and evolution during cheese ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 10, p. 383-389, 2000.
- MARCOS, A. Water activity in cheese in relation to composition, stability and safety. In: FOX, P.F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. New York: Chapman & Hall, 1993. v. 1, p. 439-470.

- MARTINEZ-CUESTA, M.C., PELAÉZ, C., JUAREZ, M., REQUENA, T. Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. Cell Lysis Induced by a Crude Bacteriocin. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 38, p. 125-131, 1997.
- MARTINS, J.F.P., FIGUEIREDO, I.B., MORI, E.E.M., FERNANDES, A.G. Maturação do queijo Prato: evolução da microbiota láctica. **Col. Inst. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 10, p. 59-72, 1979.
- MARTLEY, F.G. Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 3, p. 461-483, 1993.
- MC SWEENEY, P.L.H., SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. **Lait**, Paris, n. 80, p. 293-324, 2000.
- MC SWEENEY, P.L.H., LYNCH, C.M., WALSH, E.M., FOX, P.F., JORDAN, K.N., COGAN, T.M., DRINAN, F.D. Role of non starter lactic acid bacteria in cheddar cheese ripening. P. In: COGAN, T.M., FOX, P.F., ROSS, P.R. **Cheese Symposium**, 4., 1995. p.32-45.
- MEIJER, W., BUNT, B.V., TWIGT, M., JONGE, B., SMIT, G., HUGENHOLTZ, J. Lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and its nisin-immune transconjugant in relation to flavor development in cheese. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 64, p.1950-1953, 1998.
- MENÉNDEZ, S., CENTENO, J. A., GODÍNEZ, R., OTERO, J. L. R. Effects of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 59, p. 37-46, 2000.
- MENEZES, H.C. Detecção prévia de amargor em queijo Prato. **Col. Inst. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 7p. 107-115, 1976.
- MEYER, J., SPAHNI, A. Influence of X-prolyl-dipeptidylaminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* on proteolysis and taste of Swiss Gruyère cheese. **Milchissenschaft**, Munchen, v. 53, n. 449-453, 1998.

- MIEREAUX, I., KUNJI, E.R.S., VENEMA, G., POOLMAN, B., KOK, J. Peptidases and growth of *Lactococcus lactis* in milk. **Lait**, Paris, v. 76, p. 25-32, 1996b.
- MIEREAUX, I., KUNJI, E.R.S., LEENHOUTS, K.J., HELLENDORS, M.A., HAANDRIKMAN, A.J., POOLMAN, B., KOMINGS, W.N., VENEMA, G., KOK, J. Multiple peptidases mutants *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 78, p. 2749-2803, 1996a.
- MIETTON, B., WEBER, F., DESMAZEAUD, M., ROISSART, H. Transformation du lait en fromage. In: ROISSART, H.M., LUQUET, F.M. **Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques**. Paris: Loriga, 1994. v. 2, p. 55-134.
- MINUSSI, R.C., FURTADO, M.M., MOSQUIM, M.C.A.V. Avaliação de métodos para aceleração da proteólise de queijo prato. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 1, p. 31-42, 1995.
- MOLIMARD, P., LE QUERRÉ, J.L., SPINNLER, H.E. Les lipides et la flavour des produits laitiers. **Oléagineux, Corps gras, Lipides** 4, 1997. p. 301-311.
- MONNET, V., LEY, J.P., GONZÁLEZ, S. substrate specificity of the cell envelope-located proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 763. **Int. J. Biochem.**, Elmsford, v. 24, p. 707-718, 1992.
- MORENO, I., LERAYER, A.L.S., VIALTA, A., VAN DENDER, A.G.F., DESTRO, M.T. Autolytic properties of lactic cultures isolated from commercial "Prato cheese". In: IFT Annual Meeting, 2001. **Proceedings...**United States, 2001.
- MORGAN, S., ROSS, R.P., HILL, C. Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcins A, B, and M. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 61, p. 2995-3001, 1995.
- MORGAN, S., ROSS, R.P., HILL, C. Increasing starter cell lysis in cheddar cheese using bacteriocin-producing adjunct. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 80, p. 1-10, 1997.

- MOSKOWITZ, H.R. **Product testing and sensorial avaluation of products**. Westport: Food & Nutrition Press, 1983. 605p.
- MULHOLLAND, F. Proteolytic systems of dairy lactic acid bacteria. *In*: Law, B.A. (Ed.). **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. London: Blackie Academic Press, 1997. p. 218-318.
- MURGA, L.F., RUIZ HOLGADO, A.P. Influence of pH on the autolytic activity of *Lactobacillus acidophilus*. **Microbiology-Aliments-Nutrition**, Chatenay-Malabry, v. 12, n. 4, p. 423-428, 1995.
- MURGA, M.L.F., HOLGADO, A.P.R., VALDEZ, G.F. Influence of the Incubation temperature on the autolytic activity of *Lactobacillus acidophilus*. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 78, p. 426-429, 1995.
- NIKASAARI K. Characteristics of the autolysis of variants of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 56, p. 639-649, 1989.
- NIVEN, G.W., HOLDER, S.A., STROMAN, P. A study of the substrate specificity of aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. **Appl. Microb. Biotechnol.**, Berlin, v. 44, n. ½, p.100-105, 1995.
- O'DONOVAN, C.M., WILKINSON, M.G., GUINEE, T.P., FOX, P. An investigation of the autolytic properties of three lactococcal strains during cheese ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 6, p. 1149-1165, 1996.
- OHMIYA, K., SATO, Y. Promotion of Autolysis in Lactobacilli. **Agr. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 39, p. 585-589, 1975.
- OHMIYA, K., SATO, Y. Studies on the proteolytic actino of dairy lactic acid bacteria. Parte X. Autolysis of lactic acid bacterial cells in aseptic rennet curd. **Agr. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 34, p. 457-463, 1970.
- OLIVEIRA, J. S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. 2.ed. São Paulo: Ícone, 1986. 146p.

- OLSON, N.F. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavour. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 87, p. 131-148, 1990.
- ORDOÑEZ, A.I., IBAÑEZ, F.C., TORRE, P., BARCINA, Y. Characterization of the casein hidrolisis of idiazábal cheese manufactured from ovine milk. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 81, p. 2089-2095, 1998.
- OSTLIE, H., FLOBERGHAGEN, V., REINBOLD, G., HAMMOND, E.G., VEGARUD, G., LANGSRUD, T. Autolysis of *Lactococci*: detection of lytic enzymes by polyacrilamide gel electrophoresis and characterization in buffer systems. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 6, n. 10, p. 3598-3603, 1995a.
- OSTLIE, H., FLOBERGHAGEN, V., REINBOLD, G., HAMMOND, E.G., VEGARUD, G., LANGSRUD, T. Autolysis of dairy propionibacteria: growth studies, peptidase activities and proline production. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 78, n. 6, p. 1224-1237, 1995b.
- OSTLIE, H., VEGARUD, G., LANGSRUD, T. Autolysis of propionibacteria in buffer systems. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 78, n. 11, p. 2316-2325, 1995c.
- PEREIRA, A.J.G. **Salga na massa para o queijo prato**. Campinas, 1975. 48p. (Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- PERKINS, H.R. Chemical structure and biosynthesis of bacterial cell walls. **Bacteriol. Rev.**, Baltimore, v. 27, p. 18-49, 1963.
- PETERSON, S.D., MARSHALL, R.T., HEYMANN, H. Peptidase profiling of *Lactobacilli* associated with cheddar cheese and its application to identification and selection strains for cheese-ripening studies. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.73, n.6, p.1454-1464, 1990.
- PILLIDGE, C.J., RALLABHANDI, P.S.V.S., TONG,X.Z., GOPAL, P.K., FARLEY, P.C., SULLIVAN, P.A. Autolysis of *Lactococcus lactis*. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 12, n. 133-140, 2002.

- PILLIDGE, C.J., GOVINDASAMY-LUCEY, S.G., GOPAL, P.K., CROW, V.C. The major lactococcal cell wall autolysin AcmA does not determine the rate of autolysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2250. **Int. Dairy J.**, Barking, v.8, p. 843-850, 1998.
- POOLMAN, B., KUNJI, E.R.S., HAGTING, A., JUILLARD, V., KONINGS, W.N. The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.79, p.65-75, 1995.
- POT, B., LUDWIG, W., KERSTERS, K., SCHLEIFER, K.H. Taxonomy of lactic acid bacteria. In: DE VUYST, L., VANDAMME, E.J. (Eds). **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application**. New York: Chapman & Hall, 1994. p. 13-90.
- POULLET, B., HUERTAS, M., SÁNCHEZ, A., CÁCERES, P., LARRIBA, G. Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 58, p. 231-238, 1993.
- PRIETO, B., URDIALES, R., FRANCO, I., FRESNO, J.M., CARBALHO, J. "Quesucos de Liébana" cheese from cow's milk: biochemical changes during ripening. **Food Chem.**, Oxford, v. 70, n. 227-233, 2000.
- PROST, F., CHAMBA, J.F. Effect of aminopeptidase activity of thermophilic lactobacilli on emmental cheese characteristics. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 77, p. 25-33, 1994.
- REHMAN, S.U., BANKS, J.M., MACSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F. Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 10, p. 45-53, 2000.
- REID, J.R., MOORE, C.H., MIDWINTER, G.G., PRITCHARD, G.G. Action of a cell wall proteinase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK1 on Bovine α_{s1} -Casein. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 35, p. 222-227, 1991.

- RIBEIRO, J.A. **Fabricação de queijos**. Brasília: Ministério da Agricultura / Serviço de Informação Agrícola, 1961. 207p.
- RIEPE, H.R., PILLIDGE, C.J., GOPAL, P.K., MCKAY, L.Y. Characterization of the highly autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains CO and 2250. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, p. 3757-3763, 1997.
- RIJNEN, L., BONNEAU, S.Y., YVON, M. Genetic characterization of major lactococcal aromatic aminotransferase and its involvement in conversion of amino acids to aroma compounds. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 65, p. 4873-4880, 1999.
- ROGERS, H.J. The bacterial cell wall. The result of adsorption, structure or selective permeability? **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 32, p. 19-24, 1963.
- ROGICK, F.A. Estudo sobre a tecnologia do queijo Prato. **Bol. Ind. Anim.**, Nova Odessa, v. 12, p. 131-148, 1951.
- ROGOSA, M., MITCHELL, J.A., WISEMAN, R.F.A. Selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal *lactobacilli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 62, p. 132-133, 1951.
- RONCARI, G., ZUBER, H. Thermophilic aminopeptidase from *Bacillus stearothermophilus*. I. Isolation specificity and general properties of the thermostable aminopeptidases. **Int. J. Protein Res.**, Copenhagen, n. 1, p. 45-61, 1969.
- ROUDOT-ALGARON, F. Le goût des acides amines, des peptides et des protéines: exemple de peptides sapides. **Lait**, Paris, v. 76, p. 313-348, 1996.
- RUYTER, P.G.G.A., KUIPERS, O.P., MEIJER, W.C.; VOS, W.M. Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. **Nat. Biotechnol.**, New York, v. 15, p. 976-979, 1997.

- SABOYA, L.V. **Lise de *Lactococcus lactis* sp. e proteólise em queijos fabricados com ultrafiltração e microfiltração.** Piracicaba. 218p. (Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").
- SANDHOLM, E., SARIMO, S.S. Autolysis of *Streptococcus thermophilus* . **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 11, p. 125-129, 1981.
- SCOTT, R. Cheese ripening. In: **CHEESEMAKING practice.** London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p. 261-280.
- SCHIFTANN, T.Z., KONATZU, I. Estudos sobre a composição de queijo prato consumido na cidade de São Paulo. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, p. 33-38, 1980.
- SERRES, L., AMARIGLIO, S., PETRANSXIENE, D. **Controle de la qualité des produits laitiers.** [s.l.]: Ministère de l'Agriculture, Direction des Services Vétérinaires, 1973. Tome I, Chimie VII-6.
- SHOCKMAN, G.D., DANEO-MOORE, L., KARIYAMA, R., MASSIDDA, O. Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. **Microb. Drug Resist.**, Larchmont, v. 2, n. 1, p. 95-98, 1996.
- SHOCKMAN, G.D.; HÖLTJE, J.V. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases: comprehensive biochemistry. In: GHUYSEN, J.M., HAKENBECK, R. (Ed.). **Bacterial cell wall.** Amsterdam: Elsevier Sciences, 1994. Cap. 7, p. 131-166.
- SHOCKMAN, G.D., MARTIN, J.T. Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. IV. Electron microscopic observations of autolysis and lysozymes action. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 96, p. 1803-1810, 1968.
- SILVA, A.T. **Maturação do queijo tipo prato:** influência da adição de enzimas proteolíticas no processo. Campinas, 1998. 116p. (Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

- SKEIE, S., LINDBERG, C., NARVHUS, J. Development of amino acids and organic acids in norvegia, influence of milk treatment and adjunce *Lactobacillus*. **Int. Dairy J.**, Barking, v 11, p. 399-411, 2001.
- SLOOT, D., HARKES, P.D. Volatile trace components in gouda cheese. **J. Agr. Food Chem.**, Easton, v. 23, n.2, p. 356-357, 1975.
- SNOEREN, T.H.M., Van RIEL, J.A.M. Milk proteinase, its isolation and action on α_{s2} - and β - casein. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 34, p. 528-530, 1979.
- SPACKMAN, D.C., STEIN, W.H., MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. **Anal. Chem.**, Washington, v. 30, n. 9, p. 1190-1206, 1958.
- TAN, P.S.T., POOLMAN, B., KONINGS, W. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. **J. Dairy Res.**, Cambridge, n. 60, p. 269-286, 1993.
- TAVARIA, F.T., MALCATA, X. Microbiological of Serra da Estrela cheese throughout its appellation d'Origine Ptotégée Region. **J. Food Protect.**, Iowa, v. 61, p. 601-607, 1998.
- THERZAGHI, T.D., SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophage. **Appl. Microbiol.**, Washington, v. 29, p. 807- 813, 1975.
- THIERRY, A., MAILLARD, M.R. Production of cheese flavour compounds derived from amini acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. **Lait**, Paris, v. 82, p. 17-32, 2002.
- THIERRY, A., MAILLARD, M.R., LE QUÉRE, J.L. Dynamic headspace analysiss of Emmental aqueous phase as a method to quantify changes in volatile flavour compounds during ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 9. p. 453-463, 1999.
- THOMAS T.D., PRITCHARD, G.G. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 46, p. 245-268, 1987.

- THOMAS, T.D. Acetate production from lactate and citrate by non starter bacteria in cheddar cheese. **New Zeal. J. Dairy Sci. Technol.**, Palmerston North, v. 22, p. 25-38, 1987.
- THOMAS, T.D. Cannibalism among bacteria found in cheese. **New Zeal. J. Dairy Sci. Technol.**, Palmerston North, v. 22, p. 215-219, 1987.
- THOMAS, T.D. Oxidative activity of bacteria from Cheddar cheese. **New Zeal. J. Dairy Sci. Technol.**, Palmerston North, v. 21, p. 37-47, 1986.
- THOMAS, T.D.; CROW, V.L. Mechanism of D(-) lactic acid formaton in Cheddar cheese. **New Zeal. J. Dairy Sci. Technol.**, Palmerston North, v. 18, p. 131-141, 1983.
- THOMPSON, J., GENTRY-WEEKS. Métabolism des sucres par les bactéries lactiques. In: ROISSART, H., LUQUET, F.M. (Eds). **Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques**. Lorica: Chemin de Saint Georges, 1994. v. 1, p. 239-289.
- TRÉPANIÉ, G., EL ABOUDI, M., LEE, B.H., SIMARD, R.E. Accelerated maturation of cheddar cheese: influence of added *Lactobacilli* and commercial protease on composition and texture. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 57, n. 4, p. 898-902, 1992.
- TRÉPANIÉ, G., TRÉPANIÉ, G., SIMARD, R.E., LEE, B.H. lactic acid bacteria relation to accelerated maturation of cheddar cheese. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 56, n. 5, p.1238-1254, 1991.
- TURNER, K.W., THOMAS, T.D. Lactose fermentation in cheddar cheese and the effect of salt. **New Zeal. J. Dairy Sci. Technol.**, Palmerston North, v. 15, p. 265-276, 1980.
- TZANETAKI, E.L., GRAHAM, D.C., BEYATLI, Y. Detection of *Pediococci* and other nonstarter organisms in american cheddar cheese. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 72, p. 854-858, 1989.
- TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Lactic acid bacteria in raw goat milk and some of their biochemical properties. **Microbiologie-Aliments-Nutrition**, Chatenay-Malabry, v. 7, p. 73-80, 1989.

- UNEMOTO, Y., SATO, Y., KITO, J. Direct observation of fine structures of bacteria in ripened cheddar cheese by electron microscopy. **Agr. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 42, p. 227-232, 1978.
- URBACH, G. Relations between cheese flavour and chemical composition. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 3, p. 389-422, 1993.
- VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI, A., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., TZANETAKIS, N. Effect of *Pediococcus pentosaceus* on ripening changes of Feta cheese. **Microbiology-Aliments-Nutrition**, Chatenay-Malbry, v. 8, p. 53-62, 1990.
- VAKARELIS, D.G., PRICE, W.C. Rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 42, n. 2, p. 264-276, 1959.
- VALENCE, F. **Mise au point de marqueurs immunologiques spécifiques pour suivre l'autolyse des levains dans produits laitiers:** programme financé par BBA et la région Bretagne. Rennes: Institut National de La Recherche Agronomique, Laboratoire de Recherches Laitières, 1999. 27p.
- VALENCE, F., RICHOUX, R., THIERRY, A., PALVA, A., LORTAL, S. Autolysis of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* in swiss cheeses: first evidence by using species-specific lysis markers. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 65, p. 609-620, 1998.
- VALENCE, F., LORTAL, S. Zymogram and preliminary characterization of *Lactobacillus helveticus* autolysins. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 61, n. 9, p. 3391-3399, 1995.
- VALLE, J.E., MORENO, I., VAN DENDER, A.G.F., SOUZA, G. Evolução da microbiota láctica do queijo prato conservado a temperaturas de subcongelamento. **Col. Inst. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 83-91, 1991.
- VALLE, J.L.E., VAN DENDER, A.G.F., FIGUEIREDO, I.B. Conservação do queijo prato a temperaturas de subcongelamento. **Bol. Inst. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 371-378, 1979.

- VAN DENDER, A.G.F., VALLE, J.L.E., ARDITO, E.F.G., FIGUEIREDO, I.B. Estudo de métodos de aceleração no processo de fabricação do queijo prato. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 3, p. 18-26, 1995.
- VEGARUD, G., CASTBERG, H.B., LANGSRUD, T. Autolysis of group N Streptococci. Effects of media composition modifications and temperature. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 66, p. 2294-2302, 1983.
- VISSER, F.M.W., DE GROOT-MOSTERT, A.E.A. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. Protein breakdown: a gel electrophoretical study. **Neth. Milk Dairy J.**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 247-264, 1977.
- VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 76, p. 359-350, 1993.
- VISSER, S., EXTERKATE, F.A., SLANGER, C.J., VEER, G.J.C.M. Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{s1} -, β -, and κ -casein. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.52, p. 1162-1166, 1986.
- VISSER, S., ROBBEN, A.J.P.M., SLANGEN, C.J. Specificity of a cell-envelope-located proteinase (P111 -type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM₁ in its action on bovine β -casein. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 35, p. 477-483, 1991.
- WALLACE, J.M., FOX, P.F. Effect of adding free amino acids to cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 7, p. 157-167, 1997.
- WILKINSON, M.G., GUINEE, T.P., O'CALLAGHAN, D.M., FOX, P.F. Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during cheddar cheese ripening. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 61, p. 249-262, 1994a.

- WILKINSON, M.G., GUINEE, T.P., FOX, P.F. Factors which may influence the determination of autolysis of starter bacteria during cheddar cheese ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 4, p. 141-160, 1994b.
- WILKINSON, M.G., GUINEE, T.P., O'CALLAGHAN, D.M., FOX, P.F. Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during cheddar cheese ripening. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 61, p. 249-262, 1994c.
- WILLIAMS, A.G., BANKS, J.M. Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from cheddar cheese manufactured in The United Kingdom. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 7, p. 763-774, 1997.
- WILLIAMS, A.G., WITHERS, S.E., BANKS, J.M. Energy sources of non-starters lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 10, n. 1-2, p. 17-23, 2000.
- WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Bol. Leite Deriv.**, Juiz de Fora, v. 55, p. 1-8, 1983.
- WOLFSCHOON-POMBO, A.L., LIMA, A. Extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 44, p. 50-54, 1989.
- WOUTERS, J.T.M., AYAD, E.H.E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. Microbes from raw milk fermented dairy products. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 12, p. 91-109, 2002.
- YVON, M., RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 11, p. 185-201, 2001.
- ZÁRATE, V., BELDA, F., PÉREZ, C., CARDELL, E. Changes in the micrónal flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. **Int. Dairy J.**, Barking, v. 7, p. 65-641, 1997.
- ZEVACO, C., DESMAZEAUD, M.J. Hydrolysis of β -casein and peptides by an intracellular neutral protease of *Streptococcus diacetylactis*. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 63, p. 15-24, 1980.

ZEVACO, C., GRIPON, J.C. Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*. **Lait**, Paris, v.68, p. 393-408, 1988.