

**APTIDÕES TECNOLÓGICAS DE *Lactobacillus  
helveticus* ISOLADOS DE SORO-FERMENTO  
NATURAL - PERSPECTIVAS À  
MANUFATURA DO PARMESÃO**

**JUPYRACYARA JANDYRA DE CARVALHO BARROS**

**2005**

59236

050399

JUPYRACYARA JANDYRA DE CARVALHO BARROS

**APTIDÕES TECNOLÓGICAS DE *Lactobacillus helveticus*  
ISOLADOS DE SORO-FERMENTO NATURAL -  
PERSPECTIVAS À MANUFATURA DO PARMESÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

**Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu**

MINAS GERAIS

2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

**Barros, Jupyrcyara Jandyra de Carvalho**

**Aptidões tecnológicas de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento natural-perspectivas à manufatura do parmesão / Jupyrcyara Jandyra de Carvalho Barros.-- Lavras : UFLA, 2005.**

**47 p. : il.**

**Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.**

**Dissertação (Mestrado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

**1. Queijo parmesão. 2. *Lactobacillus helveticus*. 3. Maturação. 4. Autólise. 5. Flavor. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-637.354**

**JUPYRACYARA JANDYRA DE CARVALHO BARROS**

**APTIDÕES TECNOLÓGICAS DE *Lactobacillus helveticus*  
ISOLADOS DE SORO-FERMENTO NATURAL - PERSPECTIVAS  
À MANUFATURA DO PARMESÃO**

Dissertação apresentada à Universidade federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Ciências dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

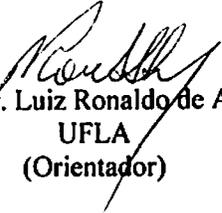
APROVADA em 25 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi

UFU

Prof. Dr. Carlos Gonçalves Costa

UFLA

  
Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL

*“É melhor tentar e falhar, que  
preocupar-se e ver a vida passar;  
É melhor tentar, ainda que em vão, que  
sentar-se fazendo nada até o final;  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em  
dias tristes em casa me esconder;  
Prefiro ser feliz, embora louco, que em  
conformidade viver”.*

*Martin Luther King*

## Dedico aos meus Pais

*Deus, Manoel Lopes e Joana Dalte*

*Acredito que, a maior benção do ser humano é ter  
uma família. E, não importa a quantidade dos  
membros dessa família, e sim a qualidade  
vivenciada entre os membros dessa família.  
Sou grata pela oportunidade de conviver a  
inúmeros gestos de carinho e cumplicidade.*

*São tão grandiosas suas atitudes que,  
faz-me pensar que,  
fui agraciada com Sábios Anjos de Luz.*

*Grata pelo eterno aprendizado.  
Esta vitória é nossa! Amo vocês!*

## *Ofereço*

*Alaurinda Cristiani, Ana, Carlos Andrade,  
Carlos Eduardo, Carlos Henrique,  
Eustáquio Antônio, João Eduardo,  
Jorge Luiz, Júlio César, Pedro, Roseâmely.*

## Mensagem Especial

Manoel Lopes (Pai) Deus (Pai, Amigo e Irmão) Joana Dalte (Mãe)

A Laurinda Cristiani (irmã), Ana (irmã), Carlos Andrade (cunhado),  
Carlos Eduardo (sobrinho), Carlos Henrique (sobrinho), Eustáquio Antônio (irmão),  
João Eduardo (irmão), Jorge Luiz (irmão),  
Júlio César (irmão), Pedro (irmão), Roseâmely (irmã)

Adriana Ribeiro, Adriane Ribeiro, Altair, Alysson, Analice Azevedo,  
Ana Lúcia Penna, André, Aparecida Regina, Antoniete Camargo, Bárbara Borges,  
César Garcia, Claudia Borges, Cristiane Moreira, Daise Rossi,  
David Silva Teixeira, Eduardo Moreira, Eloízio Ribeiro,  
Fabiana Miranda, Fabiano Carvalho, Fernanda,  
Francesca Dutra, Francielle Marques,  
Funcionários do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM,  
Gismar Vieira, Glauciemar Del Vechio, Hugney, João Batista, José Maria Pêgo,  
Jullyana Andrade, Kênia Diniz, Manoel,  
Liana Vidigal, Liliane, Luciana Carvalho, Lucimar, Luís Henrique,  
Luiz Carlos Gonçalves, Luiz Ronaldo de Abreu, Marco Túlio, Maria Amélia,  
Maria de Fátima Porto (Fafa), Maria de Lourdes, Mariá Santos, Marília, Maurício,  
Mundim, Netinho, Nilson, Odécio, Renata de Moura, Renata Silva,  
Renata Prado (*in memoriam*),  
Rimar, Rimar Junior, Roberta Hilsdorf, Ronaldo Garcia, Rony Cardoso, Santinha,  
Sônia de Fátima, Sônia Porto, Valdirene Silva, Vania Batista,  
Vivyanne Melo, Walter, Wanderley Silva, Zenon Silva.

*Todos os dias somos selecionados para uma nova vivência.*

*Em cada uma delas, sempre haverá mãos amigas, mãos irmãs.*

*Haverá, certamente, as mais diversas Essências e,  
sobreviver a cada uma delas com sabedoria e discernimento,  
refletirá em nossa própria evolução.*

*Assim, deixemo-nos guiar pela Sabedoria Divina, pedindo que Ela  
abençoe a todos que fazem parte dessa nossa vivência e  
àqueles que farão parte de um novo ciclo.*

*Grata.*

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Autólise celular e sua aplicabilidade na maturação do parmesão.....	4
2.1.1 Atividade da $\beta$ -galactosidase: parâmetro quantitativo da autólise de <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	6
2.2 Proteínas antimicrobianas na conservação de queijos maturados.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Intensidade autolítica a partir da liberação da enzima $\beta$ -galactosidase.....	11
3.2 Habilidade acidificante.....	12
3.3 Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus helveticus</i> a bactérias patogênicas.....	12
3.4 Análise estatística.....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 Estabilidade e perfil autolítico dos <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	15
4.2 Caracterização de <i>L. helveticus</i> baseado na capacidade de acidificação.....	21
4.3 Espectro de inibição de microrganismos patogênicos.....	35
5 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$	Micro litro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
aw	Atividade de água
CIP	<i>Collection de l'Institut Pasteur</i>
CNRZ	<i>Centre National de Recherches Zootechniques</i>
DO	Densidade óptica
DPC	<i>Dairy Products Research Centre</i>
IMPC	<i>Instituto Microbiologia Università Cattolica Sacro Cuore Piacenza</i>
IPTG	Isopropil-galactosídeo
LDH	Lactato desidrogenase
LDR	Leite desnatado reconstituído
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MRS	Man Rogosa Sharpe
nm	Nanômetro
ONP	<i>o</i> -nitrophenol
ONPG	<i>o</i> -nitrophenil galactopiranosídeo
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SI	Solução inibitória
sp.	Indica que a bactéria pertence a um gênero (que o nome precede essa abreviação), mas não a uma espécie identificada.
TSO	transgalactosilação
UFC	Unidades formadoras de colônias
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## RESUMO

BARROS, Jupyrcyara Jandyra de Carvalho. **Aptidões tecnológicas de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento natural - perspectivas à manufatura do parmesão.** Lavras: UFLA, 2005. 45p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos)\*

A utilização de fermento láctico comercial em detrimento ao soro-fermento, restringe as características reais de sabor e aroma proporcionadas pelo uso de culturas autóctones. A elaboração de fermento láctico constituído por bactérias autóctones assegura a padronização do parmesão, a manutenção das cepas nativas e ainda, tendem minimizar a dependência da importação de fermentos lácticos pelo Brasil. No Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia – MG (LABIO/UFU), onze cepas de *Lactobacillus helveticus* autóctones e duas comerciais da mesma espécie, foram avaliadas quanto à sua estabilidade celular e perfil autolítico, habilidade acidificante em diferentes condições térmicas e teste de antagonismo *in vitro* frente a microrganismos patogênicos. Dentre as treze culturas de *Lactobacillus helveticus* previamente isoladas e selecionadas para estudo, somente 53,85% (7/13) dos isolados, cinco autóctones e duas comerciais, resistiram ao congelamento e repiques sucessivos. Em 24 horas de incubação a 37°C, os níveis da enzima  $\beta$ -galactosidase no meio extracelular permitiu caracterizar a cepa comercial Cc<sub>1</sub> e cultura autóctone E<sub>5</sub> como àquelas que apresentaram maior atividade autolítica, apresentando índices médios de 2,93 e 1,13, respectivamente ( $p < 0,05$ ). A máxima atividade acidificante foi observada a 37°C para a cepa D<sub>1</sub> e E<sub>4</sub>, com pH médio igual a 3,96 e 3,92, respectivamente ( $p < 0,05$ ). O melhor espectro de inibição foi observado para a cepa D<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ), que foi hábil em inibir o desenvolvimento das cepas patogênicas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, apresentando índice médio de inibição igual a 15,9mm e 14,3mm, respectivamente, quando submetidas à ação da solução inibitória tratada com clorofórmio. O desempenho metabólico das cepas endógenas sugere a utilização desses microrganismos para a fabricação de fermento láctico destinado à fabricação de produtos lácteos. Entretanto, do ponto de vista tecnológico, para a manufatura de queijos que requerem longo período de maturação a cepa endógena E<sub>5</sub> é aquela que melhor atende às exigências para a produção de fermento láctico destinado a essas variedades de queijos. O emprego E<sub>5</sub> na fabricação de fermento láctico pode assegurar características adequadas de sabor, aroma e consistência ao parmesão.

---

\*Orientador: Prof. Dr Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA.

## ABSTRACT

BARROS, Jupyrcyara Jandyra de Carvalho. **Tecnological aptitudes of the *Lactobacillus helveticus* isolated from the natural whey ferment - perspectives to manufacturing the parmesan cheese.** Lavras: UFLA, 2005. 45p. (Dissertation – Master Degree in Food Science)

The use of a commercial milk ferment in despite of the whey ferment, limit the real flavour and aroma provided by the use of savages strains. The process of the milk ferment constituted by savages strains its assures the gauge of the parmesan, the maintenance of the native strains lean to minimize the Brazil dependence of imported ferment. In the Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia – MG (LABIO/UFU), eleven strains of *Lactobacillus helveticus* savages and two commercial from the same species were evaluated as it's cell stability and autolytic profile, acidifying hability in different thermic conditions and antagonism test *in vitro* facing patogenic microorganisms. Between the thirteen strains of *Lactobacillus helveticus* previously isolated and selected for studying, only 53,85% (7/13) of the isoleted, five savages e two comerciais, resisted to freezing and successive cuts. In 24 hours of incubation in 37°C, the enzyme levels of  $\beta$ -galactosidase in the extracell's enviroment allowed characterizing the advertising strain Cc<sub>1</sub> and savages E<sub>5</sub> as those that presented higher autolytic activity, showing index of 2,93 e 1,13, respectively ( $p < 0,05$ ). The maximum acidifying activitie was observed in 37°C for the strains D<sub>1</sub> and E<sub>4</sub>, with pH equals to 3,96 e 3,92, respectively ( $p < 0,05$ ). The best inibition spectrum was observed for the strain D<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ), which was able to inhibit the development of patogenic strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, presenting index of inibition equals to 15,9mm and 14,3mm, respectively, when submitted to the action of the inhibitory solution treated with chloroform. The metabolic fulfillment; of the savages strains suggests the use of these microrganisms for making the milk ferment lactic destined to manufacture milk products. However, in a technological point of view for manufacturing milk that require long periods of maturation of the savages strain E<sub>5</sub> is that best answer the requirement for the production of ferment lactic destined to these varieties of cheese. The use of the strain E<sub>5</sub> in the manufacture of ferment lactic can assure appropriate characteristics to flavour, aroma and consistence of parmesan cheese.

---

\* Adviser: Prof. Dr Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA.

# 1 INTRODUÇÃO

A tecnologia italiana emprega na fabricação do queijo parmesão e das suas variedades *parmigiano regiano* e *grana padano* o soro-fermento natural, que confere alta qualidade e originalidade a esses produtos (Candiotti et al., 2002; Coppola et al., 2000; Hynes et al., 2001). Esse é constituído por culturas endógenas, as quais se formam sob o controle de fatores tecnológicos em um determinado ambiente, sem sofrer a influência de microrganismos de outra procedência trazidos pelo homem (Candiotti et al., 2002; Hébert et al., 2000).

No Brasil, o parmesão é elaborado na maioria dos laticínios utilizando fermentos lácticos comerciais, que é composto por bactérias lácticas termofílicas como o *Lactobacillus helveticus*. Segundo Fortina et al. (1998), esses fermentos podem ser constituídos por microrganismos de subespécies diferentes, mas pertencentes a um mesmo gênero ou de gêneros diferentes, em ambos os casos apresentando crescimento sinérgico. Hannon et al. (2003) e Pillidge et al. (2002) relatam que, o emprego dessas culturas agrega características e propriedades específicas, importantes na padronização deste queijo.

Candiotti et al. (2002); Gatti et al. (2004) e Mendia et al. (2000) defendem que, queijos elaborados com soro-fermento apresentam características desejáveis superior àqueles fabricados com fermentos lácticos comerciais. Todavia, dificuldade em padronizar esse produto, reduziu, gradativamente, o seu uso no Brasil. Esse fato é preocupante, uma vez que, pode contribuir para o desaparecimento das cepas nativas, diminuindo a biodiversidade e, ainda, excluir tradições cultivadas há décadas.

Diversos procedimentos tecnológicos têm sido adotados pela indústria laticinista, visando melhorar a qualidade dos seus produtos sem acarretar custos adicionais à produção. A maturação, por exemplo, é imprescindível para

assegurar o *flavor* característico do queijo parmesão, no entanto, esse é o fator que mais onera sua elaboração, pois o mesmo deve ser submetido a esse processo por um período mínimo de seis meses. Durante a maturação, o produto sofrerá ação de lipases e proteases dos microrganismos do fermento láctico, quer seja cultura comercial ou soro-fermento, adquirindo consistência, aroma e sabor típicos (Abreu et al., 1998; Mcsweeney & Sousa, 2000).

Pesquisas desenvolvidas por vários autores têm obtido resultados expressivos ao utilizarem a autólise de bactérias lácticas como aceleradores da maturação em queijos de massa dura (Ammar et al., 1994; Gomaa et al., 1992; Hannon et al., 2003; Valence et al., 2000). A autólise de células bacterianas pode ser avaliada por meio de critérios qualitativos (Carvalho, 1994; Cappa & Botazzi, 1996; Kemper & Doyle, 1993; Rossi et al., 2002) ou quantitativos (Hébert et al., 2000; Montanari et al., 2000; Zárate et al., 1999). A aplicação da lise celular, na tecnologia do queijo parmesão, representa importante fator na maturação desses produtos.

Rossi (2001) investigou, *in vitro*, a lise celular de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento natural por meio do monitoramento da curva de crescimento microbiano. A análise, estritamente qualitativa, identificou somente o caráter autolítico dessas cepas, porém, a metodologia utilizada não permitiu mensurar a intensidade do processo autolítico.

Outro aspecto abordado por Rossi (2001), refere-se à viabilidade desses isolados para elaboração de queijos, uma vez que possuem significativo poder acidificante e são hábeis em resistir à salinidade e altas temperaturas. A importância dessas características, somada à capacidade que essa espécie possui em acelerar a maturação de queijos (Hannon et al., 2003; Valence et al., 2000), resistirem aos sais biliares (Shinoda et al., 2001), sintetizar bacteriocinas (Bonadè et al., 2001; Durlu-Ozkaya et al., 2001) e compostos aromáticos (Kenny et al., 2003; Klein et al., 2001), sugerem aplicações potenciais para essa

espécie, fatores estes, que tendem minimizar a dependência da importação de fermentos lácticos pelo Brasil.

Nesse sentido, torna-se relevante dar-se-á prosseguimento aos estudos, *in vitro*, das cepas de *Lactobacillus helveticus* isolados por Rossi (2001), sendo objetivo dessa pesquisa, avaliar as aptidões tecnológicas destes microrganismos, para a fabricação do queijo parmesão, sobre os seguintes aspectos:

- estabilidade celular por meio de repiques sucessivos;
- autólise quantitativa baseado na atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase;
- habilidade acidificante quando submetida a diferentes tratamentos térmicos;
- espectro de inibição das bacteriocinas frente a microrganismos patogênicos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Autólise celular e sua aplicabilidade na maturação do parmesão

A lise celular de *Lactobacillus helveticus* é promovida pela ação das autolisinas que hidrolisam a parede de peptidoglicana (Cibik & Chartier, 2000; Hannon et al., 2003; Rossi et al., 2002). A atividade dessas enzimas favorece a liberação do complexo enzimático, constituídos por proteinases e peptidases, presente na região intracelular dessas cepas (Hannon et al., 2003; Klein et al., 2001; Montanari et al., 2000; Valence et al., 2000). Segundo Kenny et al. (2003) a atividade das proteinases e peptidases dos *Lactobacillus helveticus* representa um impacto importante na maturação de queijos.

O processo de maturação é imprescindível para promover o *flavor* e potencializar outras características sensoriais de interesse na maioria das variedades de queijo. Em alguns, como o parmesão, a maturação pode se estender por dois anos (Govindasamy-Lucey et al., 2004; Law, 2001).

O parmesão é de origem italiana e pode ser definido, detalhadamente, com base nas definições do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Parmesão proposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 1997). O parmesão pode ser fabricado com leite cru ou pasteurizado e/ou reconstituído padronizado. Apresenta baixo teor de umidade, semi-gordo, consistência dura, textura compacta e granulosa, com crosta espessa de 4 a 8 mm, lisa e cor amarelo-palha. Possui forma cilíndrica, com peso oscilando entre 5 a 10 Kg. O sabor ligeiramente picante e salgado. Odor suave e agradável, devendo ser armazenado em temperatura não superior a 18°C. O rendimento da fabricação é em torno de 13 Kg de leite.Kg<sup>-1</sup> de queijo após sua completa maturação.

Segundo Souza (2002) o período de maturação do parmesão é cerca de seis meses para queijos com 4 kg a 10 kg, oito meses para produtos com 10 kg a 20 kg e doze meses para àqueles com peso superior a 20 kg. Todavia, devido ao elevado custo que esse processo representa, é comum encontrá-lo no mercado brasileiro, com período de maturação inferior ao preconizado pela norma vigente e, ainda, com valor comercial que restringe o seu consumo a população com alto poder aquisitivo.

Estudiosos como Ammar et al. (1994), Gomaa et al. (1992), Hannon et al. (2003) e Valence et al. (2000) propõem o emprego da autólise celular de bactérias láticas termofílicas como uma alternativa para acelerar a maturação em queijos. Este sistema autolítico pode ser acionado naturalmente ou de forma induzida.

Hannon et al. (2003) e Valence et al. (2000) consideram como fermento láctico autolítico, aquele em que a lise celular se processa espontaneamente; o fermento láctico autolisado é constituído por cepas previamente submetidas ao tratamento com sais, choques térmicos e/ou pressurização (Deutsch et al., 2002; Fenelon et al., 2000; Kiernan et al., 2000; Law, 2001; O'Reilly et al., 2002; Sánchez-Ponte, 2003).

Segundo Sánchez-Ponte (2003), fermentos lácticos autolíticos e autolisados aceleram a maturação em queijos, pois durante a lise celular, endoenzimas como  $\beta$ -galactosidase (Montanari et al., 2000) e lactato desidrogenase (Kenny et al., 2003) são liberadas podendo atuar mais rápido e facilmente sobre o substrato. Todavia, o uso do fermento autolítico confere qualidade adicional ao produto, pois processos térmicos, concentrações de íons presentes no meio e altas pressões podem inativar biomoléculas responsáveis pelo *flavor* e conservação dos queijos (Furtado, 1997; Lehninger et al., 2002; Sánchez-Ponte, 2003).

Em amostras experimentais de queijo *ras* elaboradas com fermento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (controle) e 1% e 2% de fermento de *L. helveticus* autolisado, o índice de proteólise, após dois meses de maturação, foi maior nas amostras dos queijos fabricados com fermento autolisados (Ammar et al., 1994). Testes sensoriais, realizados a partir de três meses de maturação, indicaram maior aceitabilidade pelas amostras tratadas com 1% e 2% de fermento autolisado, as quais obtiveram escores de 94 e 95, respectivamente.

Gomaa et al. (1992) também direcionaram seus estudos à atividade proteolítica de queijos *ras*. Os autores verificaram diferença significativa em amostras de queijos tratadas com 1% e 2% de fermento autolisado de *L. helveticus*. O perfil electroforético permitiu inferir que, a proteólise foi proporcional à concentração de fermento autolisado adotado na fabricação.

A aceleração da maturação em queijos suíços foi constatada por Valence et al. (2000) quando utilizaram *L. helveticus* autolítico na fabricação dessa variedade.

O processo de maturação em queijos experimentais da variedade Cheddar foi monitorado por Hannon et al. (2003), após empregarem em sua fabricação, bactérias lácticas com diferentes perfis autolíticos. Os autores classificaram *Lactococcus lactis* e *L. helveticus* DPC4571 como cepas que apresentavam baixa atividade autolítica (controle) e intensa atividade autolítica, respectivamente. Em dois meses de maturação, a atividade proteolítica e desenvolvimento do *flavor* foram expressivos nas amostras tratadas somente com *L. helveticus* e naquelas elaboradas com fermento sinérgico, nessa ordem.

### 2.1.1 Atividade da $\beta$ -galactosidase: parâmetro quantitativo da autólise de *Lactobacillus helveticus*

Segundo Hannon et al. (2003); Rossi et al. (2002) e Valence et al. (2000), *Lactobacillus helveticus* destaca-se entre as demais espécies

homofermentativas, por apresentar um forte sistema enzimático, no qual estão presentes as enzimas  $\beta$ -galactosidase e lactato desidrogenase (LDH). Essas são liberadas durante a autólise e agem ativamente na conversão da lactose e lactato, respectivamente (Bunthof et al., 2001; Durlu-Ozkaya et al., 2001). O desdobramento da lactose a ácido láctico por *Lactobacillus helveticus* acarreta a diminuição do pH, facilita a ação do coalho, inibe a multiplicação da microbiota indesejável, auxilia na expulsão do soro e atua na maturação (Cachon et al., 2002; Durlu-Ozkaya et al., 2001; Fortina et al., 2003; Mcsweeney, 2004).

Diversos estudos têm sido realizados com intuito de verificar o caráter autolítico das células bacterianas (Cappa & Botazzi, 1996; Carvalho, 1994; Kemper & Doyle, 1993; Rossi et al., 2002). Esses trabalhos tiveram como respaldo a análise gráfica do crescimento microbiano. Os autores consideraram que, a rápida passagem da fase estacionária para a fase de declínio, seguida de alterações na parede celular designava essas bactérias como autolíticas. No entanto, esses métodos não foram efetivos para verificar a intensidade da lise celular.

O aumento gradativo ou abrupto dos níveis das enzimas  $\beta$ -galactosidase e LDH no meio extracelular é diretamente proporcional à atividade autolítica das células bacterianas (Fenelon et al., 2000; Hannon et al., 2003; Hébert et al., 2000; Montanari et al., 2000; Zárate et al., 1999). Portanto, conforme sugerido por esses autores, mensurar os níveis dessas enzimas, implica em quantificar o processo autolítico.

Em trabalhos desenvolvidos por Hébert et al. (2000) e Montanari et al. (2000) a atividade autolítica foi avaliada a partir da hidrólise do complexo *o*-nitrophenil galactopiranosídeo (ONPG) pela ação da enzima  $\beta$ -galactosidase. O produto formado *o*-nitrophenol (ONP) é detectável ao comprimento de onda a 420nm (densidade óptica – DO<sub>420nm</sub>), permitindo correlacionar a quantidade de enzima no meio, pois cada uma unidade da enzima é equivalente a um mol de

ONP liberado/minuto/mL da amostra (Hébert et al., 2000; Montanari et al., 2000; Zárate et al., 1999).

Durante a hidrólise da lactose, são liberadas na mesma proporção galactose e glicose. Seguindo essa linha de raciocínio, dosando a glicose por meio da leitura colorimétrica, é possível determinar a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase (Ribeiro et al., 1998). A atividade dessa enzima pode ser afetada pela concentração de íons hidrogênio, temperatura e concentrações de substrato presente no meio (Lehninger et al., 2002). Nos estudos de Karasová et al. (2002) observou-se que, microrganismos psicotróficos foram incapazes de expressar o gene da enzima  $\beta$ -galactosidase na presença de elevados níveis de glicose.

A habilidade que *Lactobacillus helveticus* possuem em sintetizar a enzima galactose-1-fosfato uridil transferase (Klein et al., 2001; Mollet & Pilloud, 1991), contribui para a oxidação completa da galactose, impedindo a formação de pigmentos escuros, as melanoidinas, no queijo parmesão (Furtado, 1997; Mukherjee & Hutkins, 1994; Matzdorf et al., 1994; Mcswcney, 2004). Na Itália, Torriani et al. (1994) afirmam que, esse problema em queijos de massa dura é evitado pela adição de um bacilo galactose positiva como o *L. helveticus* na elaboração dos fermentos.

## 2.2 Proteínas antimicrobianas na conservação de queijos maturados

A espécie *Lactobacillus helveticus* é caracterizada por ser uma bactéria láctica *starter*, ou seja, é hábil em metabolizar a lactose, reduzindo o pH do meio pela produção de ácidos orgânicos (Leroy & Vuyst, 2004; Pillidge et al., 2002). Esses ácidos e outras substâncias antagônicas como diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, atuam na inibição de microrganismos saprofitos e/ou patogênicos (Gatti et al., 2004; Soomro et al., 2002).

A produção de bacteriocinas, biomoléculas de origem protéica, destaca-se entre os diversos tipos de inibição promovida pelas bactérias lácticas. Esses

compostos biologicamente ativos interagem com receptores de membrana específicos e alteram a permeabilidade dessas estruturas, promovendo a lise celular (Bonadè et al., 2001; Durlu-Ozkaya et al., 2001; Moreno et al., 2000; Soomro et al., 2002).

Estudos desenvolvidos por Bromberg et al. (2004); Moreno et al. (2000) e Ogunbanwo et al. (2003) ressaltam que, as bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas possuem espectro de inibição particular. Dessa forma, podem ser aproveitada para inibir cepas de mesma espécie ou cepas distantes filogeneticamente. Tais metabólitos, dependendo da espécie microbiana, apresentam diferença quanto ao peso molecular, propriedades bioquímicas e modo de ação (Soomro et al., 2002).

De acordo com Ogunbanwo et al. (2003) o emprego de bacteriocinas ou dos microrganismos produtores, representa uma característica tecnológica relevante na conservação de queijos. Sua aplicabilidade em detrimento dos conservantes químicos deve-se à sua característica biodegradável, sem que haja a formação de compostos secundários (Savadogo et al., 2004).

Vários pesquisadores empenharam-se em caracterizar (Bonadè et al., 2001; Moreno et al., 2000; Ogunbanwo et al., 2003) e, principalmente, investigar o potencial antimicrobiano das bactérias lácticas (Bromberg et al., 2004; Durlu-Ozkaya et al., 2001; Savadogo et al., 2004; Soomro et al., 2002).

O estudo desenvolvido por Bonadè et al. (2001) avaliou o perfil antimicrobiano da bacteriocina *helveticin* 51, sintetizada por *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento destinado à elaboração do queijo grana. Os autores sugeriram a utilização dessa molécula para induzir a lise celular em lactobacilos destinados à elaboração de queijo, pois, o espectro de inibição, determinado pela técnica de difusão em ágar, revelou forte atividade antimicrobiana somente em *Lactobacillus* termofílicos. A ação da proteína não foi efetiva em *Staphylococcus aureus* IMPC SA4 e *Escherichia coli* IMPC CF2.

Fenster et al. (2003) afirmam que, a atividade de água ( $a_w$ ) no queijo parmesão maturado atinge valor aproximado de 0,8. Os autores reforçam a importância dessa grandeza para o desenvolvimento do *flavor*. Entretanto, Germano (2001) informa que, esse índice também é propício à proliferação de bactérias patogênicas como àquelas do gênero *Staphylococcus*. A temperatura de maturação também é preocupante, pois a 18°C, microrganismos psicotróficos como *Pseudomonas fluorescens* podem desenvolver e produzir proteases que desencadeiam sabor amargo e ranço ao parmesão (Moura et al., 1999; Perry, 2004).

Dessa forma, para a produção de queijo parmesão, é conveniente selecionar culturas capazes de propiciar características adequadas de sabor, aroma, consistência e hábeis em sintetizar proteínas antimicrobianas com amplo espectro de inibição.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 11 cepas de *Lactobacillus helveticus* endógenas, previamente isoladas de soro fermento natural, identificadas e caracterizadas por Rossi (2001) e 2 cepas comerciais da mesma espécie (controle). Os isolados foram avaliados quanto à estabilidade celular, habilidade em sintetizar a enzima  $\beta$ -galactosidase, autólise quantitativa, capacidade de produzir compostos aromáticos e atividade antimicrobiana.

Para realização das análises, as cepas endógenas A, B, C, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub> e E<sub>5</sub>; e as cepas comerciais Cc<sub>1</sub> e Cc<sub>2</sub>, foram descongeladas, repicadas (1%) por três vezes em caldo MRS - Man Rogosa Sharpe (Man et al., 1960) e incubadas a 37°C/48 horas.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO/UFU) na cidade de Uberlândia – MG.

#### 3.1 Intensidade autolítica a partir da liberação da enzima $\beta$ -galactosidase

A expressão do gene da enzima  $\beta$ -galactosidase foi determinada seguindo a metodologia proposta por Karasová et al. (2002). Para isso, as amostras foram inoculadas em ágar LDR 12% (leite desnatado reconstituído) suplementado com 0,01% de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) e 0,1 mM de IPTG (isopropil-galactosídeo) e incubadas a 37°C/24 horas. A síntese da enzima foi determinada pela presença de colônias azuis no meio.

Para quantificar a atividade autolítica, 1% das culturas (DO<sub>650nm</sub> 1.0) foi inoculada em 100 mL de caldo MRS e mantida a 37 °C por 48 horas. A cada 6



horas, alíquotas foram retiradas para mensurar o crescimento microbiano, atividade autolítica e abaixamento do pH.

O crescimento microbiano foi monitorado através de leituras espectrofotométricas ( $DO_{650nm}$ ), conforme protocolo sugerido por Montanari et al. (2000) e Zárate et al. (1999). Os resultados foram tabulados e utilizados para construção um gráfico correlacionando o tempo (horas) e a  $DO_{650nm}$ .

A lise celular foi mensurada a partir do monitoramento da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase utilizando o Kit GLICOSE Liquiform-Labtest Diagnóstica<sup>®</sup> (Ribeiro et al., 2002). Os índices de glicose foram determinados por leitura espectrofotométrica a  $520_{nm}$  ( $DO_{520nm}$ ) e a concentração obtida pela curva de regressão linear.

O pH do meio foi verificado utilizando um medidor de pH digital Hanna Instruments 8314<sup>®</sup> previamente calibrado. Os dados foram correlacionados com a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase para quantificar o processo autolítico.

### 3.2 Habilidade acidificante

A redução do pH foi monitorado em amostras contendo 50 mL de caldo MRS pH 5,4, inoculados com 1% de células de *Lactobacillus helveticus*. A metodologia utilizada foi a proposta por Gatti et al. (2004).

Após inoculação, as culturas foram incubadas a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas, sendo retiradas amostras para análise após 0 horas ( $T_0$ ) e a cada 6 horas, perfazendo um total de 9 períodos ( $T_6$ ,  $T_{12}$ ,  $T_{18}$ ,  $T_{24}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{36}$ ,  $T_{42}$  e  $T_{48}$ ). As medidas do decréscimo do pH foram realizadas com auxílio do pHmetro digital Hanna Instruments 8314<sup>®</sup> previamente calibrado.

### 3.3 Antagonismo *in vitro* de *Lactobacillus helveticus* a bactérias patogênicas

O espectro de inibição das cepas de *Lactobacillus helveticus* foi determinado adaptando a técnica de difusão em ágar recomendada por

Schillinger & Luke (1989) citados por Bonadè et al. (2001). As cepas testadas frente a bacteriocinas extraídas dos *L. helveticus* foram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Para extração das bacteriocinas, 20 mL de caldo MRS contendo células de *L. helveticus* ( $DO_{650nm}$  1.0) foram centrifugadas a 4000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi esterilizado por filtração em sistema Millipore® equipado com filtros de 0,45  $\mu m$  de porosidade e divididos em partes iguais,  $SI_A$  (solução inibitória A) e  $SI_B$  (solução inibitória B). A  $SI_B$  teve o pH neutralizado com solução de hidróxido de sódio 0,1N (NAOH 0,1N) para eliminar a ação de ácidos orgânicos e  $SI_A$  foi utilizado sem nenhum tratamento.

Em seguida, 3  $\mu L$  de cada sobrenadante foi adicionado a discos estéreis de 0,5 mm de diâmetro. Os discos contendo  $SI_B$  foram submetidos à ação do clorofórmio ( $CHCl_3$ ) por 20 minutos para inativar o peróxido de hidrogênio. Em seguida, todos os discos foram então, distribuídos na superfície de 2 placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton, previamente semeadas com  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As placas foram incubadas a 37°C/20 horas. A padronização do inóculo foi realizada utilizando a turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland.

Após incubação, com auxílio de um paquímetro, foi determinado o halo de inibição dos discos frente a cada microrganismo. Foi considerado como zona inibitória halos que apresentaram medidas maiores que 6 mm de diâmetro (Durlu-Ozkaya et al., 2001).

### 3.4 Análise estatística

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado – DIC e esquema fatorial. Após a análise de variância, as médias foram comparadas por diferentes testes de comparações múltiplas, sendo teste de

Tukey a 5% de probabilidade para dados qualitativos e, regressão linear para fatores quantitativos (Sampaio, 1998).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estabilidade e perfil autolítico dos *Lactobacillus helveticus*

Dentre as 13 cepas de *Lactobacillus helveticus* previamente isoladas e selecionadas para estudo, somente 53,85% (7/13) dos isolados resistiram ao congelamento e repiques sucessivos. Dessa forma, o prosseguimento dos estudos foi possível apenas com os isolados que demonstraram integridade metabólica: as cepas comerciais Cc<sub>1</sub> e Cc<sub>2</sub>; e cepas endógenas A, D<sub>1</sub>, D<sub>3</sub>, E<sub>4</sub> e E<sub>5</sub>.

As curvas de crescimento microbiano demonstraram similaridade aos encontrados por Rossi (2001). Assim as cepas Cc<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> foram caracterizadas como autolíticas (Figura 1); A e D<sub>1</sub> como intermediárias (Figura 2); Cc<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e E<sub>4</sub> identificadas como não autolíticas (Figura 3).

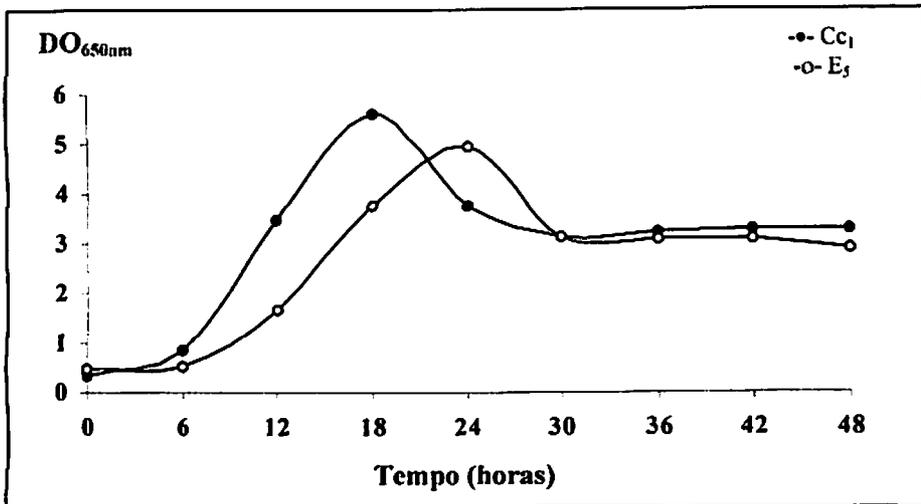


FIGURA 1 Monitoramento do crescimento de *Lactobacillus helveticus* com caráter autolítico.

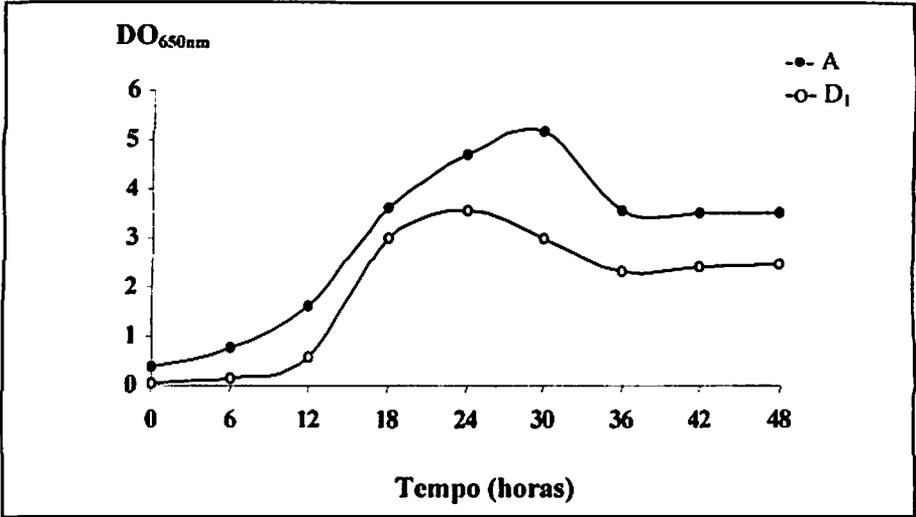


FIGURA 2 Monitoramento do crescimento de *Lactobacillus helveticus* com caráter autolítico intermediário.

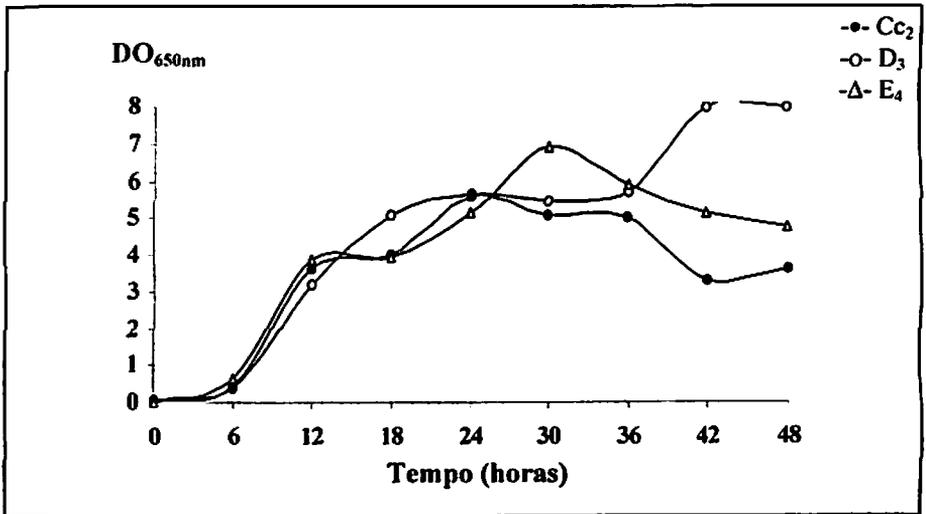


FIGURA 3 Monitoramento do crescimento de *Lactobacillus helveticus* com caráter não autolítico.

A queda abrupta da densidade óptica das cepas Cc<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> permitiu classificá-las em autolíticas (Cappa & Botazzi, 1996; Carvalho, 1994; Doyle, 1993; Kemper & Rossi, 2001). Esses microrganismos, assim como as cepas Cc<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e E<sub>4</sub>, atingiram a fase exponencial no tempo máximo de 6 horas. No entanto, foi observado crescimento contínuo somente para as cepas não autolíticas, nas quais, mesmo após incubação por 36 horas, era verificado um aumento na densidade óptica.

No monitoramento da intensidade autolítica baseado na atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, foi utilizado como limite de detecção o tempo de 24 horas (T<sub>24</sub>), que corresponde à primeira leitura imediatamente após o valor máximo de desenvolvimento da cepa comercial autolítica (Rossi et al., 2002). Os maiores índices da atividade enzimática observados nas cepas autolíticas Cc<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> (Tabela 1), sugerem o uso da atividade enzimática como parâmetro quantitativo da lise celular.

**TABELA 1** Atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase\* de *Lactobacillus helveticus*, comerciais e endógenos, cultivados em caldo MRS a temperatura de 37°C durante 24 horas.

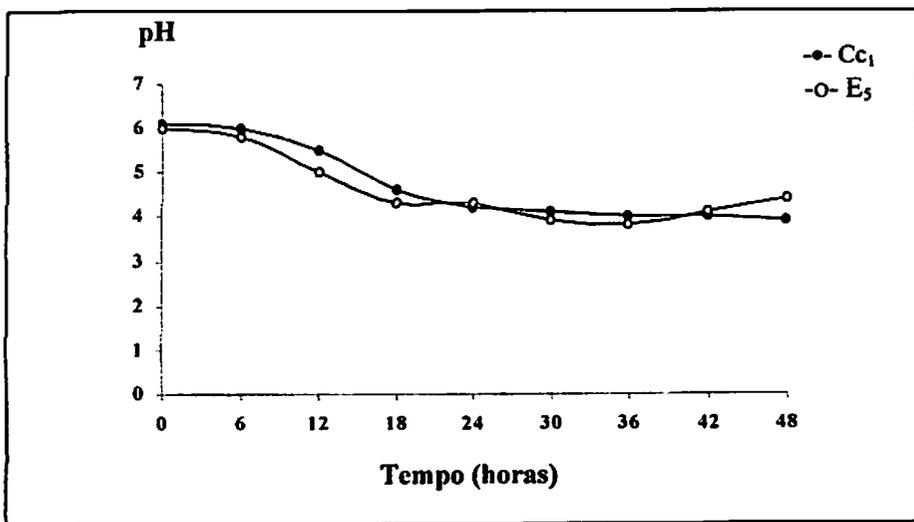
Cepas	T <sub>0</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>12</sub>	T <sub>18</sub>	T <sub>24</sub>
Cc <sub>1</sub>	0,093535 <sup>a</sup>	0,368921 <sup>a</sup>	0,721432 <sup>a</sup>	1,989994 <sup>a</sup>	2,926704 <sup>a</sup>
Cc <sub>2</sub>	0,001209 <sup>d</sup>	0,155204 <sup>d</sup>	0,532137 <sup>d</sup>	0,872924 <sup>c</sup>	0,677081 <sup>c</sup>
A	0,067638 <sup>b</sup>	0,08448 <sup>c</sup>	0,594835 <sup>c</sup>	0,676623 <sup>d</sup>	0,742843 <sup>d</sup>
D <sub>1</sub>	0,004639 <sup>d</sup>	0,280604 <sup>b</sup>	0,509552 <sup>c</sup>	0,641045 <sup>d</sup>	0,787453 <sup>c</sup>
D <sub>3</sub>	0,044859 <sup>c</sup>	0,049685 <sup>f</sup>	0,4483 <sup>f</sup>	0,559911 <sup>c</sup>	0,746297 <sup>c</sup>
E <sub>4</sub>	0,050397 <sup>c</sup>	0,257406 <sup>c</sup>	0,59799 <sup>c</sup>	0,659152 <sup>d</sup>	0,772653 <sup>c</sup>
E <sub>5</sub>	0,06726 <sup>b</sup>	0,288893 <sup>b</sup>	0,65254 <sup>b</sup>	1,850423 <sup>b</sup>	1,130068 <sup>b</sup>

\*unidades (média de 3 repetições).

a,b...Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).  
T - tempo em horas

Ribeiro et al. (1998) concordam que, temperatura igual ou superior a 40°C e pH inferior a 6,0 podem afetar a estabilidade da enzima  $\beta$ -galactosidase. Considerando o poder acidificante da espécie *Lactobacillus helveticus* (Hannon et al., 2003; Rossi et al. (2002); Valence et al., 2002) e pretendendo aumentar a confiabilidade da análise realizada, leituras superiores ao tempo de 24 horas foram desprezadas, pois, após esse período, o pH do meio, para todas as culturas, apresentaram índices inferiores a 4,5, fato que, poderia interferir nos índices reais referentes à intensidade autolítica.

As Figuras 4 a 6 permitem a visualização do decaimento do pH dos isolados em meio MRS incubados a 37°C por até 48 horas. Após um período de 24 horas, as medidas de pH nas cepas A, D<sub>1</sub>, Cc<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e E<sub>4</sub> não apresentaram diferenças significantes ( $p < 0,05$ ). Em 24 horas, a redução máxima do pH foi de 3,93 e 3,96 para as cepas não autolíticas, E<sub>4</sub> e D<sub>3</sub>, respectivamente.



**FIGURA 4** Decaimento do pH observado em culturas de *Lactobacillus helveticus* com caráter autolítico.

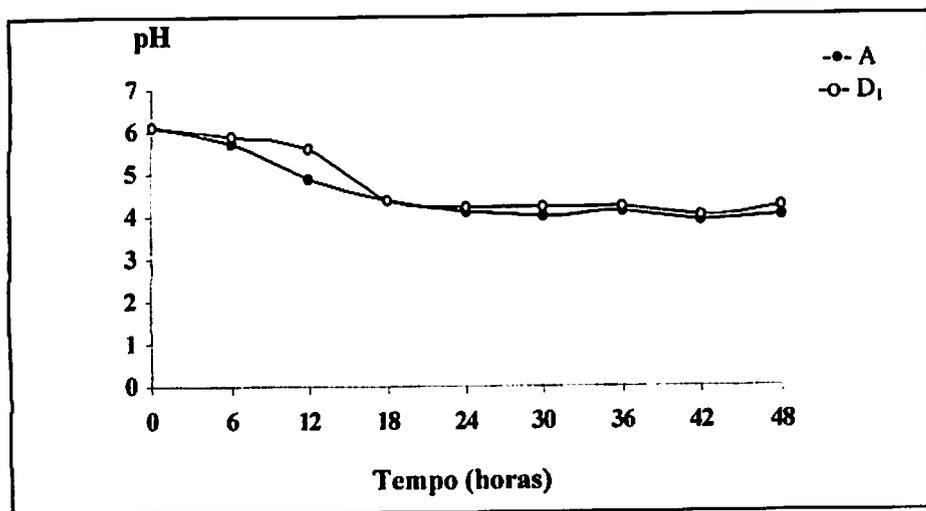


FIGURA 5 Decaimento do pH observado em culturas de *Lactobacillus helveticus* com caráter autolítico intermediário.

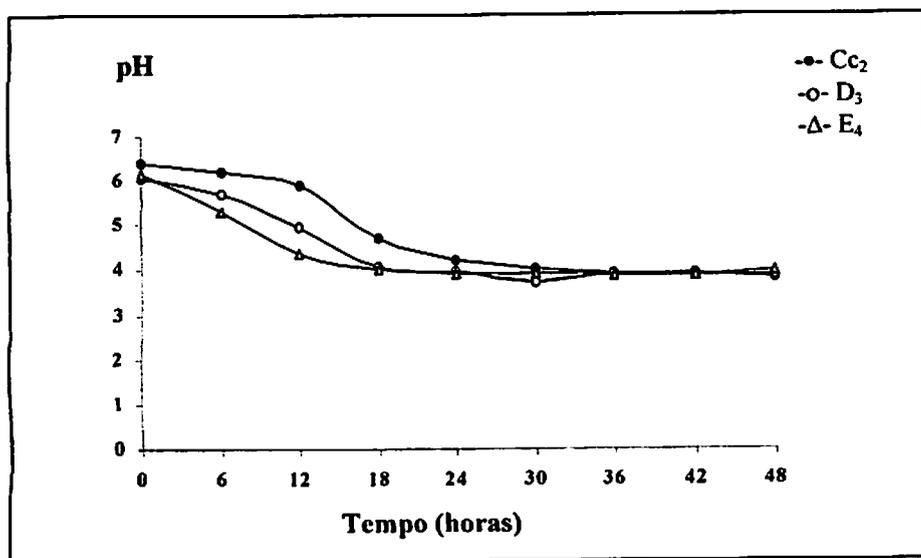


FIGURA 6 Decaimento do pH observado em culturas de *Lactobacillus helveticus* com caráter não autolítico.

A interferência, negativa, da concentração de íons hidrogênio na atividade da  $\beta$ -galactosidase foi abordada por Montanari et al. (2000) ao avaliarem a autólise espontânea em bactérias do gênero *Lactobacillus*. Os autores discutem que, esse fato é compensado pela autólise e liberação enzimática, que se processam gradativamente. Furtado (1997) defende que, para a indústria laticinista, a multiplicação contínua de bactérias presentes no fermento pode dificultar a padronização dos produtos, pois o crescimento prolongado pode acarretar, dentre outros fatores, acidez indesejável, devido à elevada produção de ácido lático (Furtado, 1997). Segundo Mcsweeney (2004); Perry (2004) a acidez elevada pode afetar a consistência e textura de queijos de massa dura como o Parmesão.

Os resultados da intensidade autolítica em caldo MRS correspondem àqueles obtidos em ágar LDR 12%. No T<sub>24</sub>, a atividade da  $\beta$ -galactosidase, ainda permanecia somente nas cepas A, D<sub>1</sub>, Cc<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e E<sub>4</sub>. Esses dados são condizentes, pois espécies com caráter autolítico, por apresentarem desenvolvimento mais rápido, hidrolisam a lactose em menor tempo e cessam sua atividade por esgotamento do substrato (Lehninger et al., 2002). Também, mecanismos de retro-inibição podem ter afetado a atividade enzimática já que o acúmulo de glicose no meio pode ter inibido a expressão do gene da enzima nas cepas autolíticas, pois a transcrição da  $\beta$ -galactosidase somente é efetuada na presença de lactose (Karasová et al., 2002; Tortora et al., 2002),

De modo geral, a cepa comercial Cc<sub>1</sub> e cepa endógena E<sub>5</sub> foram as que apresentaram melhor desempenho autolítico, podendo ser empregadas na elaboração de fermento láctico destinado à manufatura do parmesão ou outras variedades em que a aceleração da maturação é desejável. A rápida lise celular, seguida da inibição da enzima  $\beta$ -galactosidase no tempo máximo de 24 horas,

pode assegurar o controle da produção de ácido láctico e, ainda, acelerar a maturação desse queijo.

#### 4.2 Caracterização do *L. helveticus* baseado na atividade de acidificação

O monitoramento da habilidade acidificante das cepas de *Lactobacillus helveticus*, comercial e endógeno, realizada em caldo MRS pH ajustado em 5,4, demonstrou diferença significativa sobre a fisiologia desses microrganismos nos diferentes tempos e temperaturas de incubação ( $p < 0,05$ ).

A bioconversão da lactose é essencial para a manufatura das variedades de queijo e demais produtos lácteos fermentados (Durlu-Ozkaya et al., 2001; Fortina et al., 2003). Nesse processo, é imprescindível a participação de bactérias lácticas *starters*, como o *Lactobacillus helveticus* (Fenster et al., 2003; Pillidge et al., 2002). Em uma análise ampla, fixando o tempo de incubação em temperaturas diferentes (Tabela 2), é possível verificar maior capacidade de desdobramento da lactose a lactato nas cepas D<sub>1</sub> e E<sub>4</sub>.

**TABELA 2** Atividade acidificante\* de *Lactobacillus helveticus*, comerciais e endógenos, cultivados em caldo MRS pH ajustado 5,4 submetidos a diferentes temperaturas.

Cepas	pH <sub>8°C</sub>	pH <sub>20°C</sub>	pH <sub>37°C</sub>	pH <sub>42°C</sub>
Cc <sub>1</sub>	5,15 <sup>bc</sup>	5,04 <sup>a</sup>	4,28 <sup>a</sup>	5,08 <sup>b</sup>
Cc <sub>2</sub>	5,24 <sup>a</sup>	4,91 <sup>b</sup>	4,30 <sup>a</sup>	4,96 <sup>c</sup>
A	5,16 <sup>abc</sup>	4,93 <sup>b</sup>	4,29 <sup>a</sup>	5,11 <sup>ab</sup>
D <sub>1</sub>	5,10 <sup>c</sup>	4,58 <sup>d</sup>	4,18 <sup>b</sup>	4,79 <sup>d</sup>
D <sub>3</sub>	5,22 <sup>ab</sup>	4,91 <sup>b</sup>	4,10 <sup>b</sup>	5,08 <sup>ab</sup>
E <sub>4</sub>	5,10 <sup>c</sup>	4,79 <sup>c</sup>	3,76 <sup>c</sup>	4,90 <sup>c</sup>
E <sub>5</sub>	5,20 <sup>ab</sup>	4,80 <sup>c</sup>	4,12 <sup>b</sup>	5,16 <sup>a</sup>

\*unidades (média de 3 repetições).

a,b...Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



Cachon et al. (2002) afirmam que, a temperatura é um parâmetro físico-químico valioso para caracterizar o poder acidificante de bactérias lácticas *starters*; a mesma pode impulsionar ou retardar o desenvolvimento microbiano e, conseqüentemente, aumentar ou reduzir a atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e  $\beta$ -galactosidase (Karasová et al., 2002; Ribeiro et al., 2002).

De acordo com Karasová et al. (2002); Kenny et al. (2003) a enzima  $\beta$ -galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose, possui temperatura ótima de 37°C e pH ótimo próximo à neutralidade. Nesse estudo, o maior índice de acidificação foi verificado nas culturas submetidas ao tratamento térmico de 37°C, concordando com os dados reportados na literatura. A máxima atividade acidificante observada a essa temperatura foi para as cepas endógenas D<sub>1</sub> e E<sub>4</sub>, com índice médio de 3,96 e 3,92, respectivamente. Entre essas cepas, não foi observado diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

O comportamento acidificante das cepas de *Lactobacillus helveticus*, comerciais e endógenas, quando submetidas a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C pode ser visualizado nas Figuras 7 a 13.

FIGURA 8 Comportamento acidificante de *Lactobacillus helveticus*, cepa comercial C<sub>2</sub>, cultivada em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

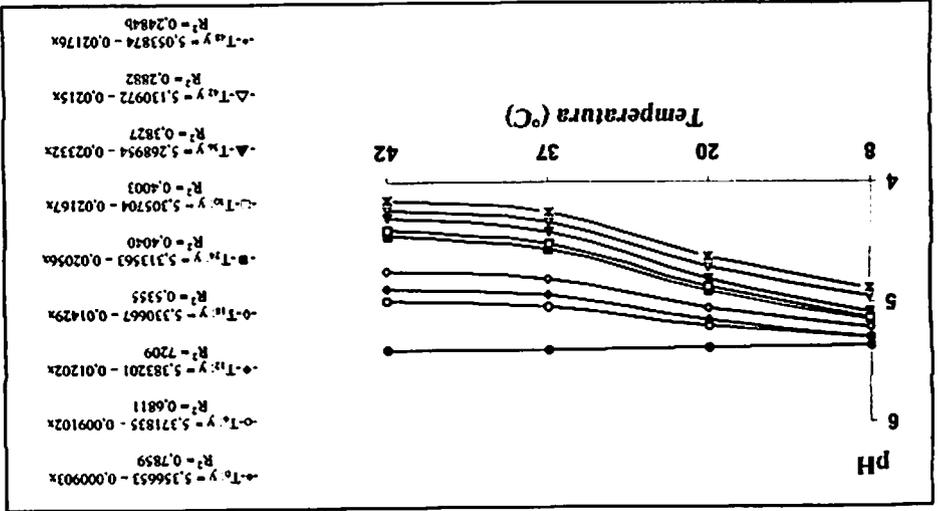
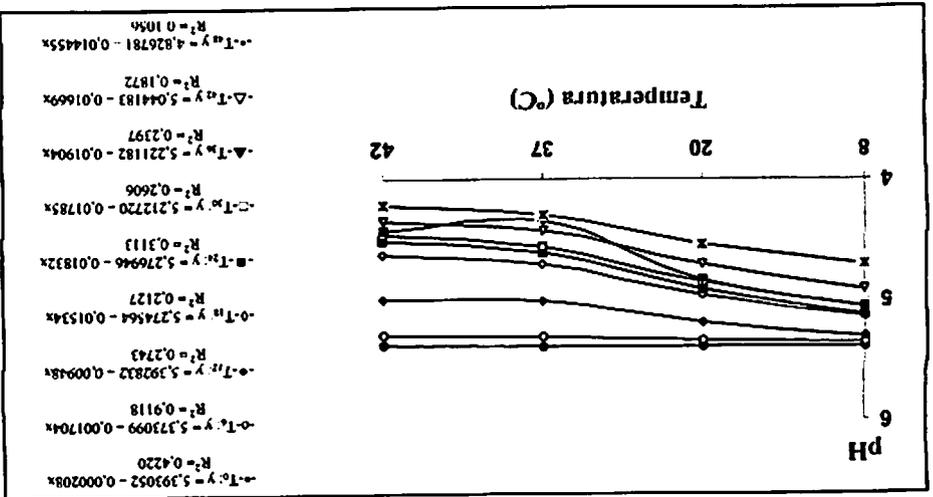


FIGURA 7 Comportamento acidificante de *Lactobacillus helveticus*, cepa comercial C<sub>1</sub>, cultivada em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.



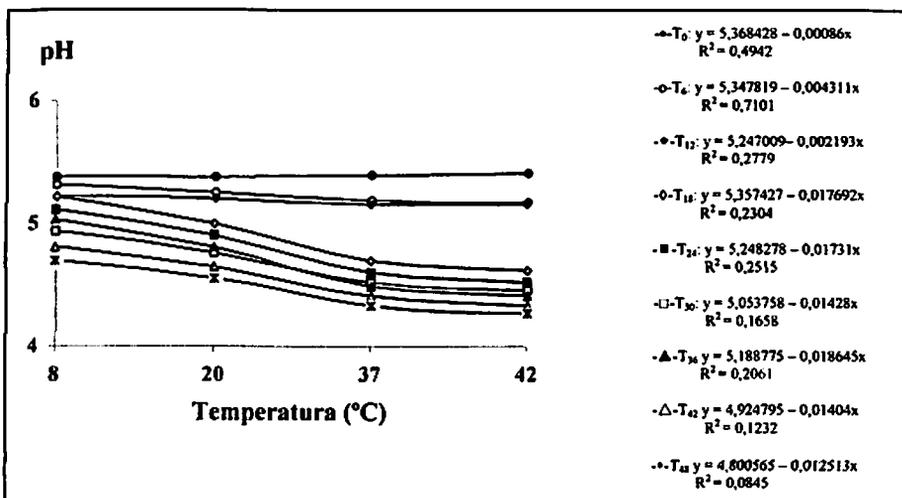


FIGURA 9 Comportamento acidificante de *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena A, cultivado em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

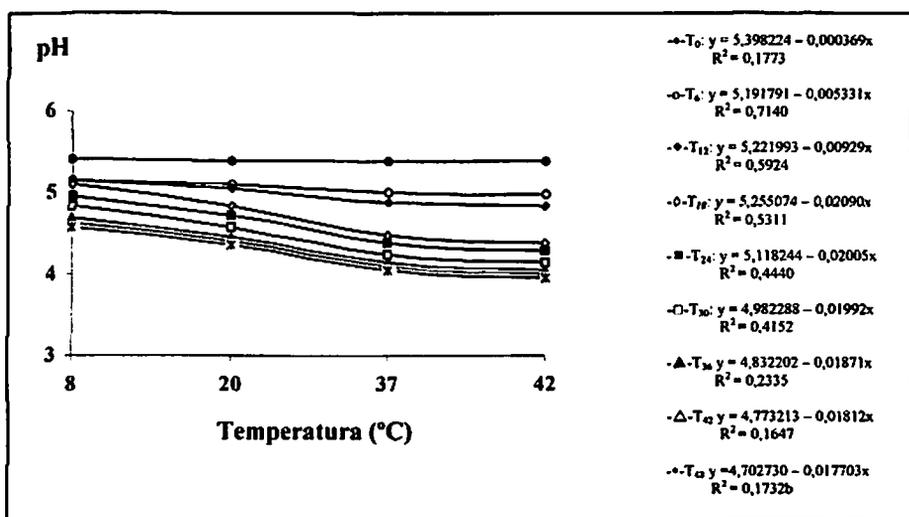


FIGURA 10 Comportamento acidificante de *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena D1, cultivado em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

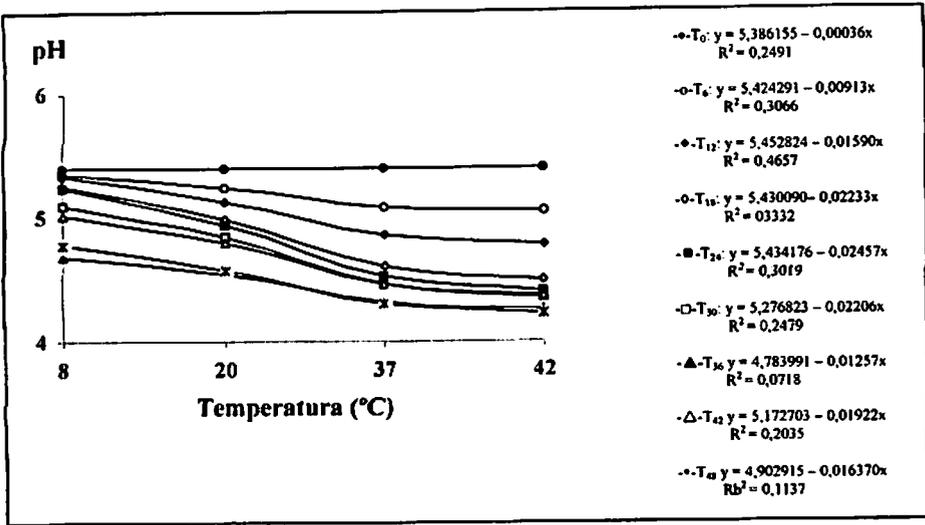


FIGURA 11 Comportamento acidificante de *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena D<sub>3</sub>, cultivado em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

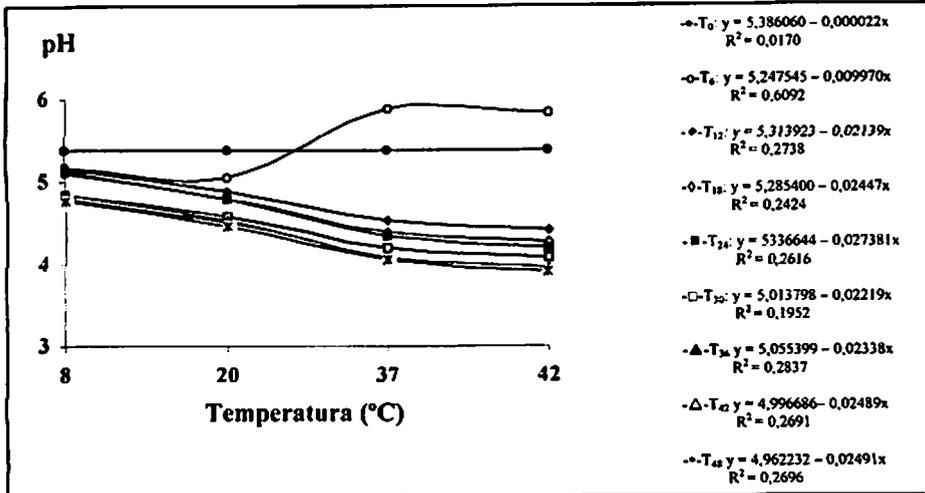
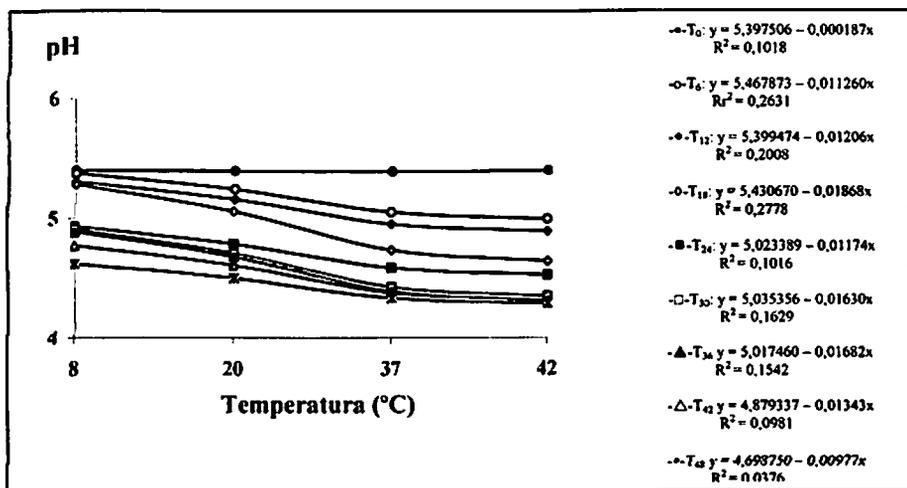


FIGURA 12 Comportamento acidificante de *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena E<sub>4</sub>, cultivado em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.



**FIGURA 13** Comportamento acidificante de *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena E<sub>5</sub>, cultivado em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

Na fabricação de queijo, é comum empregar a temperatura de 35°C; *índice ligeiramente abaixo da temperatura ótima para ação do coalho, de modo que a susceptibilidade das micelas de caseínas à proteólise não seja afetada* (Fortina, 2003; Perry, 2004). Segundo Mcsweeney (2004) o índice e a extensão da acidificação influenciam na textura inicial da coalhada, pois, agem, diretamente, na solubilidade das caseínas. Perry (2004) explica que, pH elevado impede a incorporação adequada de íons sódio à molécula de paracaseinato, resultando em queijos de massa dura e quebradiça.

Dudley & Steele (2005) e Gatti et al. (2004) sugerem que, na manufatura do parmesão deve-se empregar fermento láctico composto por bactérias lácticas *starters* hábeis em metabolizar, completamente, a lactose antes que sejam substituídas pela microbiota não *starter*. Os autores explicam que, o

metabolismo heterofermentativo desse carboidrato pelas bactérias pode desencadear sabor rançoso e amargo ao queijo.

Diante do exposto, o tempo de abaixamento do pH também é um importante critério na seleção de cepas *starters* destinadas à elaboração de fermentos lácticos (Fortina et al., 2003; Mcsweeney & Souza, 2000). Mesmo baixos índices residuais de lactose na coalhada são suficientes para desenvolvimento da microbiota secundária indesejável (Dudley & Steele, 2005; Gatti et al., 2004; Soomro et al., 2002). Por esse motivo, a hidrólise da lactose deve ser completa e acontecer em curto período de tempo. Nas Figuras 14 a 20, é possível acompanhar a conversão, gradativa, da lactose pelas cepas de *Lactobacillus helveticus*, endógenas e comerciais, frente a diferentes tratamentos térmicos.

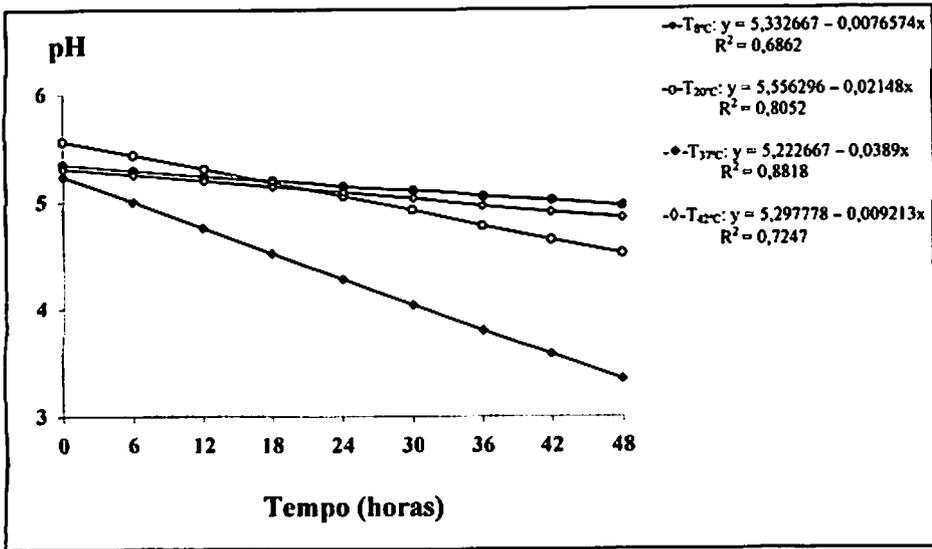


FIGURA 14 Decaimento do pH observado em *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena Cc<sub>1</sub>, cultivado em caldo MRS incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

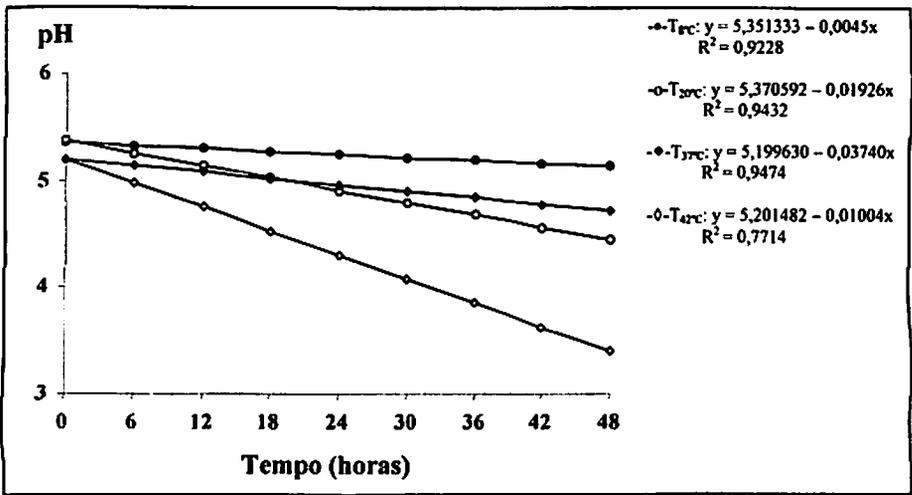


FIGURA 15 Decaimento do pH observado em *Lactobacillus helveticus*, cepa comercial Cc<sub>2</sub>, cultivada em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

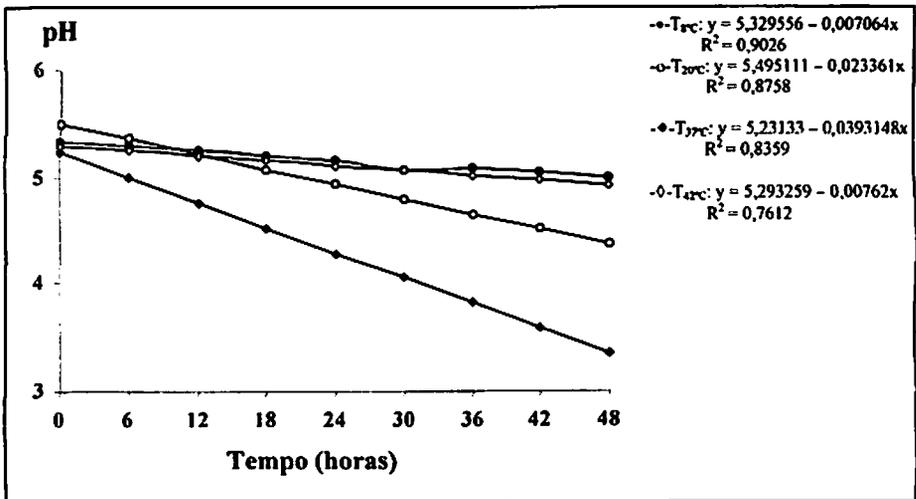


FIGURA 16 Decaimento do pH observado em *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena A, cultivada em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

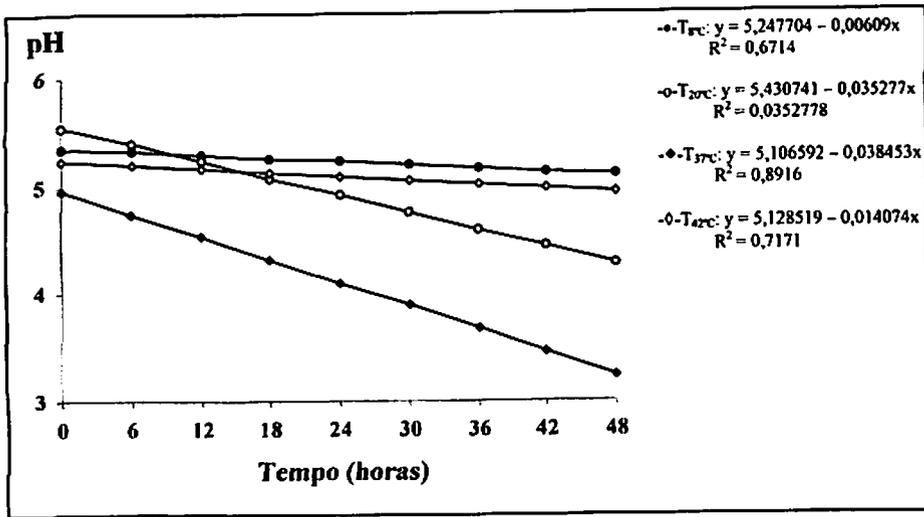


FIGURA 17 Decaimento do pH observado em *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena D<sub>1</sub>, cultivada em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

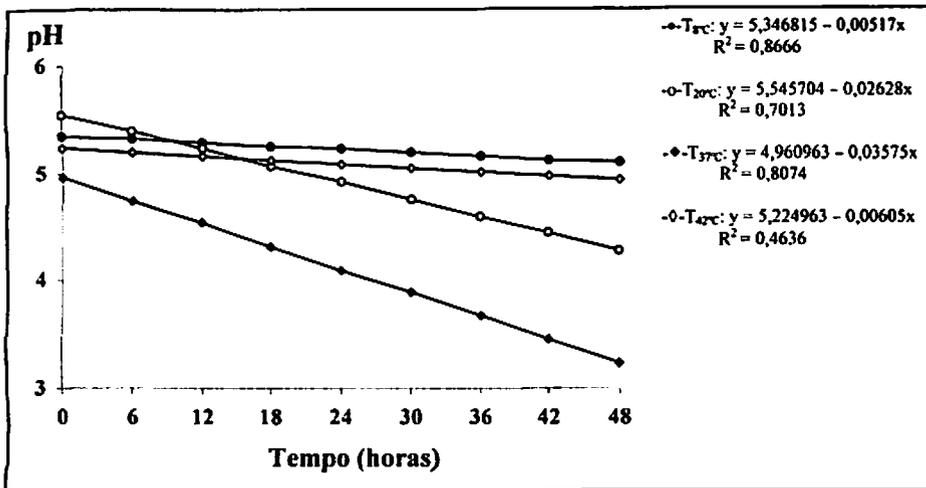


FIGURA 18 Decaimento do pH observado em *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena D<sub>3</sub>, cultivada em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

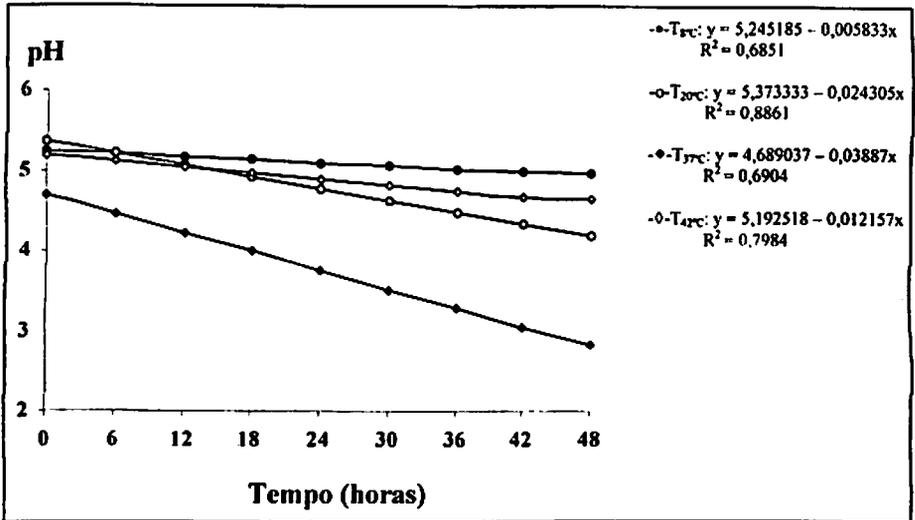


FIGURA 19 Decaimento do pH observado em *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena E<sub>4</sub>, cultivada em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

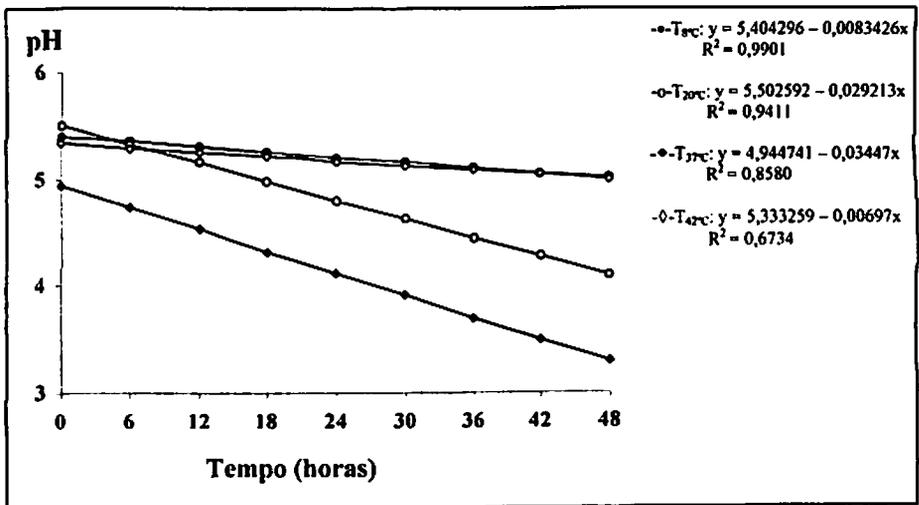


FIGURA 20 Decaimento do pH observado em *Lactobacillus helveticus*, cepa endógena E<sub>5</sub>, cultivada em caldo MRS, incubado a 8°C, 20°C, 37°C e 42°C durante 48 horas.

Dentre as espécies de *Lactobacillus helveticus* estudadas, as cepas endógenas E<sub>4</sub>, foi identificada como aquela que apresentou maior habilidade acidificante em menor tempo. A máxima atividade desse microrganismo foi observada em 48 horas de incubação, apresentando diferença estatística significativa entre os períodos de leitura para essa espécie (p>0,05). Nesse período, o pH médio encontrado foi de 2,82.

No momento da inoculação (0 hora - T<sub>0</sub>), não foi observada diferença significativa (p>0,05) entre a habilidade acidificante dos microrganismos, por esse motivo, os resultados referentes a esse período não foram apresentados.

A atividade acidificante das cepas estudadas em relação ao tempo de incubação pode ser observada na Tabela 3.

**TABELA 3** Atividade acidificante\* de *Lactobacillus helveticus*, comerciais e endógenos, cultivados em caldo MRS pH ajustado 5,4 submetidos a diferentes temperaturas durante 48 horas.

pH	Cepas de <i>Lactobacillus helveticus</i>						
	Cc <sub>1</sub>	Cc <sub>2</sub>	A	D <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>
pH <sub>6horas</sub>	5,32 <sup>a</sup>	5,13 <sup>bc</sup>	5,24 <sup>ab</sup>	5,05 <sup>cd</sup>	5,18 <sup>bc</sup>	4,98 <sup>d</sup>	5,17 <sup>bc</sup>
pH <sub>12horas</sub>	5,14 <sup>ab</sup>	5,06 <sup>abc</sup>	5,19 <sup>a</sup>	4,97 <sup>c</sup>	5,03 <sup>bc</sup>	4,74 <sup>d</sup>	5,08 <sup>abc</sup>
pH <sub>18horas</sub>	4,86 <sup>a</sup>	4,95 <sup>a</sup>	4,88 <sup>a</sup>	4,69 <sup>b</sup>	4,83 <sup>a</sup>	4,63 <sup>b</sup>	4,93 <sup>a</sup>
pH <sub>24horas</sub>	4,79 <sup>a</sup>	4,78 <sup>a</sup>	4,78 <sup>a</sup>	4,58 <sup>b</sup>	4,78 <sup>a</sup>	4,60 <sup>b</sup>	4,71 <sup>ab</sup>
pH <sub>30horas</sub>	4,74 <sup>a</sup>	4,72 <sup>ab</sup>	4,67 <sup>ab</sup>	4,45 <sup>c</sup>	4,69 <sup>ab</sup>	4,42 <sup>c</sup>	4,6 <sup>b</sup>
pH <sub>36horas</sub>	4,71 <sup>a</sup>	4,64 <sup>ab</sup>	4,69 <sup>ab</sup>	4,33 <sup>d</sup>	4,48 <sup>cd</sup>	4,35 <sup>d</sup>	4,58 <sup>bc</sup>
pH <sub>42horas</sub>	4,6 <sup>ab</sup>	4,56 <sup>ab</sup>	4,55 <sup>ab</sup>	4,29 <sup>c</sup>	4,65 <sup>a</sup>	4,33 <sup>c</sup>	4,52 <sup>b</sup>
pH <sub>48horas</sub>	4,44 <sup>a</sup>	4,47 <sup>a</sup>	4,47 <sup>a</sup>	4,23 <sup>b</sup>	4,46 <sup>a</sup>	4,3 <sup>b</sup>	4,44 <sup>a</sup>

\* unidades (média de 3 repetições).

a,b...Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05).

É comum a adição da espécie de *Lactobacillus helveticus* em fermentos lácticos destinado a manufatura do parmesão visando acelerar a acidificação e aceleração desse queijo (Furtado, 1997). No entanto, em queijos que requerem longo período de maturação, como o parmesão, torna-se inconveniente o emprego de fermentos lácticos constituídos por microrganismos com metabolismo semelhante ao das cepas D<sub>1</sub> e E<sub>4</sub>. Essas são caracterizadas por apresentarem caráter autolítico intermediário e caráter não autolítico, respectivamente. Dessa forma, a baixa velocidade de crescimento e elevado poder acidificante, podem contribuir para o acúmulo de íons hidrogênio na matriz do queijo (Cachon et al., 2002; Mcsweeney; 2004), prejudicando a textura e aspectos reológicos do queijo parmesão (Perry, 2004).

Durante a análise da habilidade acidificante de bactérias *starters*, é imprescindível avaliar a atividade microbiana frente ao binômio tempo/temperatura (Gatti et al., 2004). A ação conjunta desses fatores permite prever o comportamento desses microrganismos nas diferentes etapas de processamento do queijo, contribuindo para a seleção de cepas com poder acidificante específico para determinada variedade de queijo (Cachon et al., 2002; Gatti et al., 2004).

O desempenho acidificante das cepas de *Lactobacillus helveticus*, endógenas e comerciais, quando correlacionado, simultaneamente, a temperatura e período incubação, demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os cultivos submetidos à temperatura de 20°C (Tabela 4), 37°C (Tabela 5) e 42°C (Tabela 6). Nas culturas incubadas a 8°C não foi detectada diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

**TABELA 4** Atividade acidificante\* de *Lactobacillus helveticus*, comerciais e endógenos, cultivados em caldo MRS pH ajustado 5,4 submetidos à temperatura de 20°C para diferentes períodos de tempo.

pH	Cepas de <i>Lactobacillus helveticus</i>						
	Cc <sub>1</sub>	Cc <sub>2</sub>	A	D <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>
pH 18horas	5,32 <sup>a</sup>	5,08 <sup>ab</sup>	5,18 <sup>ab</sup>	4,94 <sup>b</sup>	5,18 <sup>ab</sup>	5,01 <sup>b</sup>	5,20 <sup>ab</sup>
pH 24horas	5,12 <sup>ab</sup>	4,92 <sup>bc</sup>	5,05 <sup>ab</sup>	4,68 <sup>cd</sup>	5,19 <sup>a</sup>	5,09 <sup>ab</sup>	4,65 <sup>d</sup>
pH 30horas	5,01 <sup>a</sup>	4,89 <sup>ab</sup>	4,72 <sup>bc</sup>	4,88 <sup>ab</sup>	4,88 <sup>ab</sup>	4,45 <sup>d</sup>	4,55 <sup>cd</sup>
pH 36horas	5,02 <sup>a</sup>	4,78 <sup>ab</sup>	4,93 <sup>a</sup>	4,02 <sup>d</sup>	3,99 <sup>d</sup>	4,42 <sup>c</sup>	4,54 <sup>b</sup>
pH 42horas	4,67 <sup>ab</sup>	4,51 <sup>abc</sup>	4,45 <sup>bc</sup>	3,92 <sup>d</sup>	4,78 <sup>a</sup>	4,32 <sup>c</sup>	4,32 <sup>c</sup>
pH 48horas	4,19 <sup>ab</sup>	4,34 <sup>a</sup>	4,18 <sup>ab</sup>	3,78 <sup>c</sup>	4,18 <sup>ab</sup>	4,25 <sup>ab</sup>	4,02 <sup>bc</sup>

\* unidades (média de 3 repetições).

a,b...Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

**TABELA 5** Atividade acidificante\* de *Lactobacillus helveticus*, comerciais e endógenos, cultivados em caldo MRS pH ajustado 5,4 submetidos à temperatura de 37°C para diferentes períodos de tempo.

pH	Cepas de <i>Lactobacillus helveticus</i>						
	Cc <sub>1</sub>	Cc <sub>2</sub>	A	D <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>
pH 6horas	5,30 <sup>a</sup>	4,92 <sup>bc</sup>	5,15 <sup>ab</sup>	4,92 <sup>bc</sup>	4,8 <sup>cd</sup>	4,71 <sup>cd</sup>	4,65 <sup>d</sup>
pH 12horas	4,72 <sup>bc</sup>	4,79 <sup>b</sup>	5,09 <sup>a</sup>	4,72 <sup>bc</sup>	4,52 <sup>cd</sup>	3,79 <sup>c</sup>	4,45 <sup>d</sup>
pH 18horas	4,11 <sup>b</sup>	4,52 <sup>a</sup>	4,02 <sup>b</sup>	4,07 <sup>b</sup>	3,94 <sup>b</sup>	3,47 <sup>c</sup>	4,10 <sup>b</sup>
pH 24horas	4,03 <sup>a</sup>	4,04 <sup>a</sup>	3,98 <sup>ab</sup>	3,93 <sup>ab</sup>	3,74 <sup>b</sup>	3,35 <sup>c</sup>	3,92 <sup>ab</sup>
pH 30horas	3,92 <sup>ab</sup>	3,96 <sup>a</sup>	3,88 <sup>ab</sup>	3,87 <sup>ab</sup>	3,66 <sup>b</sup>	3,3 <sup>c</sup>	3,72 <sup>ab</sup>
pH 36horas	3,80 <sup>a</sup>	3,80 <sup>a</sup>	3,73 <sup>a</sup>	3,67 <sup>a</sup>	3,66 <sup>a</sup>	3,25 <sup>b</sup>	3,63 <sup>a</sup>
pH 42horas	3,72 <sup>a</sup>	3,71 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	3,51 <sup>ab</sup>	3,69 <sup>a</sup>	3,29 <sup>b</sup>	3,66 <sup>a</sup>
pH 48horas	3,56 <sup>a</sup>	3,58 <sup>a</sup>	3,65 <sup>a</sup>	3,57 <sup>a</sup>	3,52 <sup>ab</sup>	3,23 <sup>b</sup>	3,54 <sup>a</sup>

\* unidades (média de 3 repetições).

a,b...Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

TABELA 6 Atividade acidificante\* de *Lactobacillus helveticus*, comerciais e endógenos, cultivados em caldo MRS pH ajustado 5,4 submetidos à temperatura de 42°C para diferentes períodos de tempo.

pH	Cepas de <i>Lactobacillus helveticus</i>						
	Cc <sub>1</sub>	Cc <sub>2</sub>	A	D <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>
pH <sub>6horas</sub>	5,3 <sup>a</sup>	5,1 <sup>abc</sup>	5,18 <sup>abc</sup>	5,02 <sup>bc</sup>	5,26 <sup>ab</sup>	4,96 <sup>c</sup>	5,3 <sup>a</sup>
pH <sub>12horas</sub>	5,24 <sup>ab</sup>	5,01 <sup>bc</sup>	5,22 <sup>ab</sup>	4,95 <sup>c</sup>	5,01 <sup>bc</sup>	4,97 <sup>bc</sup>	5,3 <sup>a</sup>
pH <sub>18horas</sub>	5,01 <sup>a</sup>	4,97 <sup>ab</sup>	5,13 <sup>a</sup>	4,69 <sup>b</sup>	4,99 <sup>a</sup>	4,96 <sup>a</sup>	5,14 <sup>a</sup>
pH <sub>24horas</sub>	4,92 <sup>abc</sup>	4,88 <sup>bc</sup>	5,0 <sup>ab</sup>	4,67 <sup>c</sup>	4,99 <sup>ab</sup>	4,91 <sup>abc</sup>	5,15 <sup>a</sup>
pH <sub>30horas</sub>	4,95 <sup>a</sup>	4,86 <sup>a</sup>	5,02 <sup>a</sup>	4,55 <sup>b</sup>	5,01 <sup>a</sup>	4,88 <sup>a</sup>	5,01 <sup>a</sup>
pH <sub>36horas</sub>	5,01 <sup>a</sup>	4,81 <sup>ab</sup>	5,02 <sup>a</sup>	4,6 <sup>b</sup>	5,01 <sup>a</sup>	4,69 <sup>b</sup>	5,01 <sup>a</sup>
pH <sub>42horas</sub>	4,96 <sup>ab</sup>	4,83 <sup>abc</sup>	5,0 <sup>a</sup>	4,69 <sup>bc</sup>	5,03 <sup>a</sup>	4,68 <sup>c</sup>	5,04 <sup>a</sup>
pH <sub>48horas</sub>	4,96 <sup>ab</sup>	4,81 <sup>bc</sup>	4,99 <sup>ab</sup>	4,56 <sup>c</sup>	5,02 <sup>ab</sup>	4,66 <sup>c</sup>	5,14 <sup>a</sup>

\* unidades (média de 3 repetições).

a,b...Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

Os resultados obtidos reforçam o argumento de Gatti et al. (2004) que, *consideram importante a microbiota starter manter sua viabilidade e vitalidade frente as diferentes condições térmicas existentes na tecnologia de queijo.*

A máxima atividade metabólica à 42°C foi de 4,55 para a cepa D<sub>1</sub>. *Embora, o abaixamento do pH tenha sido superior aos resultados obtidos em 37°C, os índices encontrados demonstram que todas as cepas endógenas estudadas são capazes de hidrolisar a lactose, proporcionando condições para a ação do coalho a 37°C (Bunthof et al., 2001; Hannon et al., 2003; Perry, 2004).* A ação conjunta do coalho e metabolismo microbiano auxilia na expulsão do soro e atua na maturação (Cachon et al., 2002; Durlu-Ozkaya et al., 2001; Fortina et al., 2003; Mcsweeney, 2004).

Perry (2004) afirma que, o pH do queijo Parmesão, em fase de maturação, deve estar entre 5,0 a 5,2; essa baixa concentração de íons hidrogênio no queijo permite que, *a atividade enzimática da β-galactosidase e lactato desidrogenase (Cachon et al., 2002; Karasová et al., 2002; Kenny et al., 2003), iniciada em temperaturas elevadas, seja mantida mesmo em temperatura*

reduzida. Dentre os microrganismos endógenos estudados, as cepas A, E<sub>4</sub> e E<sub>5</sub> foram aquelas que, a 20°C, apresentaram atividade acidificante controlada e ordenada, fato que, auxilia na padronização das variedades de queijo. A máxima atividade observada para a cepa D<sub>1</sub> em 48 horas, indica que, somente o emprego desse microrganismo na manufatura do Parmesão, pode ocasionar trincas na massa durante sua maturação, devido à descalcificação resultante do baixo pH.

Do ponto de vista tecnológico, a capacidade de hidrolisar a lactose de forma gradativa e ordenada, aliada ao perfil autolítico da cepa endógena E<sub>5</sub> sugerem aplicabilidade dessa espécie na fabricação do queijo Parmesão.

#### 4.3 Espectro de inibição de microrganismos patogênicos

Nos ensaios realizados com solução inibitória B (SI<sub>B</sub>); pH neutralizado com solução de hidróxido de sódio 0,1N (NAOH 0,1N) e solução inibitória A (SI<sub>A</sub>); sem tratamento, não foi detectado diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparado à ação inibitória entre essas soluções. Entretanto, foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) do efeito inibidor entre as cepas testadas.

Dos extratos SI<sub>A</sub> e SI<sub>B</sub> obtidos a partir das culturas de *Lactobacillus helveticus*, 71,43% (5/7) e 14,28% (1/7) foram capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, respectivamente (Tabela 9).

**TABELA 9** Inibição<sup>o</sup> de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pela SI<sub>A</sub> e SI<sub>B</sub>, provenientes de *Lactobacillus helveticus*, comerciais e endógenos, cultivados em caldo MRS e incubados a 37°C.

<i>Lactobacillus helveticus</i>	Tratamento sem clorofórmio (SI <sub>A</sub> )		Tratamento com clorofórmio (SI <sub>B</sub> )	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	ATCC 25922	ATCC 25923	ATCC 25922	ATCC 25923
Cc <sub>1</sub>	-	-	-	-
Cc <sub>2</sub>	15,0 <sup>a</sup>	-	15,0 <sup>a</sup>	-
A	-	-	-	-
D <sub>1</sub>	16,0 <sup>a</sup>	14,1 <sup>b</sup>	15,9 <sup>a</sup>	14,3 <sup>b</sup>
D <sub>3</sub>	16,4 <sup>a</sup>	-	16,4 <sup>a</sup>	-
E <sub>4</sub>	16,3 <sup>a</sup>	-	16,3 <sup>a</sup>	-
E <sub>5</sub>	14,6 <sup>a</sup>	-	14,6 <sup>a</sup>	-

<sup>o</sup> zona de inibição: > 6 mm de diâmetro (média de 3 repetições)

- : atividade antimicrobiana nula

SI<sub>A</sub>: solução inibitória A (extrato obtido a partir da centrifugação a 4000rpm por 20 minutos do meio de cultura MRS contendo células de *Lactobacillus helveticus* – DO<sub>650nm</sub> 1.0 )

SI<sub>B</sub>: solução inibitória B (extrato obtido conforme solução A e pH ajustado com NaOH 0,1N e submetido à ação do CHCl<sub>3</sub> durante 20 minutos).

O efeito positivo das bacteriocinas sintetizadas por *Lactobacillus helveticus* sobre a cepa patogênica *Escherichia coli* ATCC 25922 refuta a teoria defendida por Savadogo et al. (2004), que consideram microrganismos patogênicos gram-negativos, mais resistentes à ação de bacteriocinas metabolizadas por bactérias lácticas, devido à constituição da parede celular desses patógenos. Os autores verificaram que, a ação de bacteriocinas sintetizadas por *Lactobacillus fermentum* isolados de leite fermentado na região de Burkina Faso, foram mais efetivos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 quando comparado à inibição em *Escherichia coli* 105182 CIP, uma vez

que a zona de inibição detectada foi igual a 10 mm de diâmetro e 9 mm de diâmetro, respectivamente.

Os resultados obtidos nesse estudo também diferem daqueles encontrados por Bonadè et al. (2001), pois *helveticin* 51, bacteriocina sintetizada por *Lactobacillus helveticus* apresentaram baixo espectro de inibição, ou seja, foram hábeis em inibir somente bactérias da mesma espécie. Nesse estudo, os diferentes ensaios com SI<sub>A</sub> e SI<sub>B</sub> comprovaram que, as bacteriocinas das cepas de *Lactobacillus helveticus* apresentam amplo espectro de inibição, pois atuaram, de forma positiva, sobre microrganismos distantes filogeneticamente (Bromberg et al., 2004; Moreno et al., 2002; Ogunbanwo et al., 2003).

No decorrer da maturação do queijo parmesão, o decréscimo da atividade de água (Mesquita et al., 2001; Fenster et al., 2003) e produção de ácidos orgânicos (Gatti et al., 2004; Soomro et al., 2002), representa fatores limitantes à proliferação de microrganismos patogênicos. Somado a esses fatores, a síntese de bacteriocinas por cepas lácticas *starters* (Ogunbanwo et al., 2003) torna-se importante no controle de células viáveis de cepas patogênicas produtoras de toxina como *Staphylococcus aureus*, principalmente na fase de cura do parmesão. Esse microrganismo, quando em contagem superiores a 10<sup>6</sup> células sintetizam toxinas, que podem ser produzidas em temperatura de 10 °C a 48°C (Germano, 2001).

Dentro desse aspecto, a utilização da cepa D<sub>1</sub> na elaboração de fermentos lácticos destinados à manufatura do queijo parmesão pode contribuir para a conservação desse produto, uma vez que a bacteriocina produzida por essa espécie possui amplo espectro inibição.

## 5 CONCLUSÕES

O delineamento dos dados referentes aos aspectos tecnológicos das cepas de *Lactobacillus helveticus* comerciais e endógenas, permite inferir que:

- a estabilidade celular foi mantida nas cepas comerciais Cc<sub>1</sub>, Cc<sub>2</sub> e cepas endógenas A, D<sub>1</sub>, D<sub>3</sub>, E<sub>4</sub> e E<sub>5</sub>, que mantiveram seu caráter autolítico mesmo após repiques sucessivos;
- os níveis da enzima  $\beta$ -galactosidase no meio extracelular foram proporcionais à atividade autolítica, permitindo classificar as cepas Cc<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> como àquelas que apresentaram maior atividade autolítica, A e D<sub>1</sub> atividade autolítica intermediária ( $p < 0,05$ ); Cc<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e E<sub>4</sub> como aquelas que não apresentaram atividade autolítica; portanto a atividade enzimática dessa enzima por ser empregada como parâmetro quantitativo da lise celular;
- a máxima atividade acidificante foi observada a 37°C para a cepa D<sub>1</sub> e E<sub>4</sub> ( $p < 0,05$ ), no entanto, a capacidade em hidrolisar a lactose de forma gradativa e ordenada foi observada na cepa endógena E<sub>5</sub> ( $p < 0,05$ );
- o melhor espectro de inibição foi observado para a cepa D<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ), que foi hábil em inibir o desenvolvimento das cepas patogênicas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- todas as cepas endógenas apresentaram potencial a ser aplicado, individual e/ou sinérgico, na fabricação de produtos lácteos;
- a cepa endógena E<sub>5</sub> é aquela que melhor atende às exigências para a produção de fermento láctico destinado à produção do queijo parmesão, uma vez que, pode assegurar características adequadas de sabor, aroma e consistência ao parmesão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.R.; MOURA, C. J.; PINTO, S.M.; FURTADO, M.M.; ROSSI, D. A.; CARVALHO, E.P. Effect of refrigeration of milk on lipolysis of Parmesan type cheese. In: 25 International Dairy Congress, 1998, Aarhus. **Abstracts & Posters Presentations**, p. 91, 1998.
- AMMAR EL TAHRA, M. A.; EL SHAZLY, A.; NASR, M. M.; EL SAADANY, M.; EL-TAHRA, M. A. A. Effect of using autolyzed starter and cheese slurry on acceleration of Ras cheese ripening made from mixture of goat's and cow's milk. **Egyptian Journal of Dairy Science**, Cairo, v. 22, n. 1, p. 67-80, 1994.
- BONADÈ, A.; MURELLI, F.; VESCOVO, M; SCOLARI, G. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford. v. 33. n. 2, p. 153-158, aug. 2001.
- BRASIL, 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Parmesão. Portaria 353 de 4 de setembro de 1997. Disponível em: [www.agricultura.gov.br/das/dipoa](http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa). Acessada em fevereiro. 2005.
- BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C. L.; DELBONI, R. R.; OLIVEIRA, J.. Isolation Of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria From Meat And Meat Products And Its Spectrum Of Inhibitory Activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo. v. 35, n. ½. p. 137-144, jan./jun. 2004.
- BUNTHOF C. J.; BLOEMEN, K.; BREEUWER, P.;ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. Flow cytometric assessment of viability of Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 67, n. 5, p. 2326-2335, may. 2001.
- CANDIOTI, M. C., HYNES, E., QUIBERONI, A., PALMA, S. B., SABBAG, N., ZALAZAR, C. A. Reggianito Argentino cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. **Review Elsevier**, 2002.
- CACHON, R.; JEANSON. S.; ALDARE, M.; DIVIES, C. Characterization of lactic starters based on acidification and reduction activities. **Lait. Les Ulis**. v. 82, n. 3 p. 281-288. may/june. 2002.

CAPPA, F.; BOTAZZI, V. Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus casei subsp. casei* I St 261. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, Milan. v. 46, n. 2, p. 299-310, 1996.

CARVALHO, A.F. **Systématique des bactéries propioniques lactières: classification, nomenclature et identification**, 1994. 227p. Tese (Doutorado)-Rennes, ENSA.

CIBIK, R.; CHAPOT-CHARTIER, M. P. Autolysis of dairy leuconostoc and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing SDS-PAGE. *Journal of Applied Microbiology*. Oxford. v. 89, n. 5. p. 862-869, nov. 2000.

COPPOLA, R.; NANNI, M.; IORIZZO, M.; SORRENTINO, E.; CHIAVARI, C.; GRAZIA, L. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking an the first months of the ripening. *Lait, Les Ulis*. v. 80. n. 5. p. 479-490, sept/oct. 2000.

DEUTSCH, S. M.; NEVEU, N.; GUEZENEC, S.; RITZENTHALER, P.; LORTAL, S. Early lysis of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 303 in Swiss cheese is not prophage-related. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 81, n. 2. p. 147-157. mar. 2003.

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

DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULUS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOLOU-TZANETAKI. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from beyaz cheese made from raw ewes'milk. *Journal of Applied Microbiology*. Oxford. n. 5. v. 91, p. 861-870, nov. 2001.

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

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

FORTINA, M.G.; NICASTRO, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E.; MANACHINI, P.L. *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese

starters: the diversity in phenotypic characteristics. **Journal of Applied Microbiology**. v. 84, n. 1, p. 72-80, jan. 1998.

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

FURTADO, M.M. **Manual prático da mussarela (pizza cheese)**. 1ed., São Paulo: Master Graf Editora, 1997. 70p.

GATTI, M.; TRIVISANO, C., FABRIZI, E.; NEVIANI, E.; GARDINI, GARDINI, F. Biodiversity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington. v. 70, n. 1, jan. p.182-190. 2004.

GERMANO, P.M.L. **Higiene e Vigilância Sanitária dos Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 629p.

GOMAA, M.S.; MEHANA, M.Y.; EL-RAZEK, M.B. Utilization of autolyzed starter to accelerate ripening process of Ras cheese. **Egyptian Journal of Food Science**, Cairo. v. 20, n. 3, p. 313-329, 1992.

GOVINDASAMY-LUCEY; JAEGGI, J. J.; BOSTLEY, A. L.; JOHNSON, M. E.; LUCEY, J. A. Standardization of Milk Using Cold Ultrafiltration Retentates for the Manufacture of Parmesan Cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign. v.87, n. 9p. 2789-2799, sept. 2004.

HANNON, J. A.; WILKINSON, M. G.; C. DELAHUNTY, M.; WALLACE, J. M.; MORRISSEY, P. A. BERESFORD, T. P. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**. Oxford. v. 13, n. 4, p. 313-323, 2003.

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

HYNES, E.R, MEINARDI, C.A.; SABBAG, N; CATTANEO, T.; CANDIOTI, M.C.; ZALAZAR, C.A. , Influence of milk-clotting enzyme

- concentration on the  $\alpha_1$  casein hydrolysis during soft cheeses ripening. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 84, n. 6. p. 1335–1340, june. 2001.
- KARASOVÁ, P.; SPIWOK, V.; MALA, S.; KRÁLOVA, B.; RUSSELL, N. Beta-galactosidase activity in psychotrophic microorganisms and their potential use in food industry. **Czech Journal Food Science**, Prague. v. 20, n. 2, p. 43-47, 2002.
- KEMPER, M. A.; DOYLE, R. J. The cell wall of *Bacillus subtilis* is protonated during growth. In: **Dans Bacterial growth an lysis**. New York: Plenum Press, p. 245-252, 1993.
- KENNY, O.; FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G.; BERESFORD, T.; JORDAN, K. Growth phase and growth medium effects on the peptides activities of *Lactobacillus helveticus*. **International Dairy Journal**. Oxford. v. 13, n. 7. p. 509-516, 2003.
- KIERNAN, R.C.; BERESFORD, T.P.; G. O'CUINN; JORDAN, K.N. Autolysis of lactobacilli during Cheddar cheese ripening. **Irish Journal of Agriculture and Food Research**, n. 39, p. 95–106, 2000.
- KLEIN, N.; MAILLARD, M. B.; THIERRY, A.; LORTAL, S. Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*. **Journal of Applies Microbiology**, v. 91, n.3, p. 404-411, sept, 2001.
- LAW, B.A., Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for new technologies. **International Dairy Journal**, Oxford. v. 11, n. 4/7, p. 383–398, 2001.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**, 2ª ed.: SARVIER. São Paulo. 975p., 2002.
- LEROY, F.; VUYST L. D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.
- MATZDORF, B.; CUPPETT, S.L.; KEELER, L.; HUTKINS, R.W. Browning of Mozzarella cheese during high temperature pizza baking. **Journal of Dairy Science**, Champaign. v. 77, n. 10, p. 2850-2853, oct. 1994.
- MCSWEENEY, P.L.H. Biochemistry of cheese ripening: **International Journal of Dairy Technology**, Oxford v. 57, n. 2-3. p.127-144, may. 2004.

MCSWEENEY, P.L.H.; SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: *Le Lait. Les Ulis*. v. 80, n. 3, p. 293-324, may/june. 2000.

MENDIA, C., IBANEZ, F. J., TORRE, P.; BARCINA, Y. Effect of pasteurisation and use of a native starter culture on proteolysis in a ewes' milk cheese. *Food Control*. Oxford. v. 11, n. 3, p. 195-200, june. 2000.

MOLLET, B.; PILLOUD, N. Galactose utilization in *Lactobacillus helveticus*: isolation and characterization of the galactokinase (*galk*) and galactose-1-phosphate uridylyl transferase (*galT*) genes. *Journal of Bacteriology*. Washington. n. 14. p. 4464-4473. july. 1991.

MONTANARI, G.; ZAMBONELLI, C.; GRAZIA, L.; BENEVELLI, M.; CHIAVARI, C. Release of  $\beta$ -galactosidase from Lactobacilli. *Food Technology Biotechnology*, Zagreb. v. 38, n. 2, p. 129-133, apr/june. 2000.

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

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo. v. 31, n. 3. p. 184-192, july/sept. 2000.

MUKHERJEE, K.K.; HUTKINS, R.W. Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, Champaign. v. 77, n. 10, p. 2839-2849, oct. 1994.

OGUNBANWO, S. T.; SANNI, A. I.; ONILUDE, A. A. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. Nigeria, 2003.

O'REILLY, C. E.; O'CONNOR, P. M.; MURPHY, P. M.; KELLY, A. L.; BERESFORD, T. P. Effects of high-pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria and proteolysis in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. Oxford. v. 12, n. 11 p. 915-922, 2002.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, São Paulo. v. 27, n. 2, p. 293-300. mar./abr. 2004.

PILLIDGE, C. J.; RALLABHANDI, P. S. V. S.; TONG, X., GOPAL, P. K., FARLEY, P. C.; SULLIVAN, P. A. Autolysis of *Lactococcus lactis*, *International Dairy Journal*, Oxford . v. 12, n. 2-3, p. 133-140, 2002.

RIBEIRO, Eloizio Julio. Estudo da Cinética de Hidrólise de Lactose com beta-galactosidase. *Revista Ciência & Engenharia*, Vitória. v. 2, p. 36-40, 1998.

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

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

SAMPAIO, I. B. M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

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

SAVADOGO, A.; OUTTARA, C. A. T.; BASSOLE, I. H. N.; TRAORE, A. S. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of nutrition*. Lahore. v. 3, n. 3, 2004.

SHINODA, T.; KUSUDA, D.; ISHIDA, Y.; IKEDA, N.; KANEKO, K.; MASUDA, O.; YANAMOTO, N. Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract. *Letters Applied Microbiology*, Oxford .v. 32, n. 2, p. 108-113, feb. 2001.

SOOMRO, A. H.; MASUD T.; ANWAAR K. Role os Lactic Acid Bacteria (LAB) in food preservation an human health- A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, Lahore. v. 1, n .1, p. 20-24, 2002.

SOUZA, L.J. **Nova Legislação de Produtos Lácteos: Revisada, Ampliada e Comentada.** São Paulo: Revista Indústria de Laticínios, 2002. 327 p.

TORRIANI, S.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. An Overview on *Lactobacillus helveticus*. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milan. v. 44, n. 2 p. 163-191, 1994.

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

ZÁRATE, G.; GONZALEZ, S.; CHAIA, A. P.; OLIVER, G. Effect of bile on the  $\beta$ -galactosidase activity of dairy propionibacterium. **Le Lait**, Les Ulis, v. 80, n. 2. p. 267-276, mar/apr. 2000.

