

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**TIZIANO DALLA ROSA**

**ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS E MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA**  
**MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO**

**PORTO ALEGRE (RS)**

**2005**

**TIZIANO DALLA ROSA**

**ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS E MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA  
MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadores: Professora PhD. Célia Ribeiro Carlini

Professor PhD. Marco Antônio Záchia Ayub.

**PORTO ALEGRE (RS)**

**2005**

**Dedico esta tese a Rosália Maria Souza da Costa**

## AGRADECIMENTOS

Aos professores **Célia Ribeiro Carlini e Marco Antônio Záchia Ayub**, meus orientadores, pelos ensinamentos, incentivos e, principalmente, pela oportunidade de realizar esta caminhada.

Aos professores **Carlos Termignoni e João Antônio Pegas Henriques**, pelo acompanhamento e conselhos dispensados ao longo do percurso.

A Secretaria de Agricultura de Caxias do Sul, em particular ao **Sr. Arai Horn**, pela sua dedicação e envolvimento na realização deste trabalho.

Aos produtores rurais **Dorneles Sandi e família, Roberto Andriolo e família, Antônio Capelani e família**, principais colaboradores voluntários sem os quais este trabalho não existiria.

A professora **Claucia F. Volken de Souza**, amiga e colega que, com o seu trabalho, abriu o caminho para essa pesquisa.

Ao **Cássio, Fabiane, Deise e German**, pela parcela de participação e pela amizade ao longo deste trabalho.

Às professoras **André A. Souto e Elsa Nhuch**, pela ajuda e colaboração na análise dos aminoácidos.

À **Fepagro**, pelos dados climáticos fornecidos.

Aos secretários do Centro de Biotecnologia **Luciano e Silvia**, pela competência, atenção e amizade a mim dispensada.

Aos colegas dos Laboratórios Bioteclab (Laboratório de Biotecnologia) do ICTA e Laprotox (Laboratório de proteínas Tóxicas) do Departamento de Fisiologia, pela convivência e amizade dispensada ao longo deste período.

Aos amigos **Tinoco e Marta**, pela amizade, dedicação e atenção dispensada.

À minha família, em especial a minha esposa e amiga **Rô**.

À **Pontifícia Unversidade Católica do Rio Grande do Sul**, em particular a Faculdade de Química, pela oportunidade que me foi oferecida para a realização deste trabalho.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, em especial ao **Centro de Biotecnologia**, pela forma que multiplica o saber, integrando Direção, docentes e discentes como uma grande família.

## RESUMO

A proposição do presente trabalho foi avaliar o potencial das enzimas das NSLAB do queijo Serrano quanto às atividades aminopeptidásicas. Seis bateladas de queijo Serrano foram elaboradas (3 no verão e 3 no inverno) por três diferentes produtores (A, B e C) de Caxias do Sul (RS), utilizando leite cru, sem adição de culturas iniciadoras. A atividade das aminopeptidases foi avaliada nas FPS dos queijos e nos extratos aquosos dos microrganismos através da hidrólise dos substratos sintéticos Gly- $\beta$ NA, Arg- $\beta$ NA, Tyr- $\beta$ NA, Leu- $\beta$ NA e Asp- $\beta$ NA, Glu- $\beta$ NA, Lys- $\beta$ NA, e Pro- $\beta$ NA. Nos queijos do produtor A, que apresentaram as maiores atividades (19 a 74 U/g de queijo), foram analisados os amino ácidos livres (AAL) e os resultados revelaram que eles aumentam continuamente, estão presentes em quantidades elevadas (4051 mg/100g de ES do queijo aos 60 d), e os AAL com maiores concentrações nos queijos foram Glu, Arg, Lys, Pro e Leu (juntos representam 58% a 61% do total de AAL). Extratos aquosos das NSLAB dos queijos de verão foram parcialmente purificados por cromatografia de troca iônica de fluxo rápido, utilizando Q-sepharose e incubados com os substratos Glu- $\beta$ NA, Arg- $\beta$ NA, Lys- $\beta$ NA, Leu- $\beta$ NA e Pro- $\beta$ NA, indicando atividade para todos os substratos e que a atividade nas frações mudam nas NSLAB para queijos com diferentes tempos de maturação. Uma comparação das atividades aminopeptidases recuperadas após o zimograma do gel de eletroforese-PAGE das FPS dos queijos e dos microrganismos, sugerem que as PepN, PepC e PepL ativas nas FPS têm suas origens na lise das NSLAB presentes nos mesmos.

**Palavras-chaves:** Queijo Serrano, Maturação de queijo, Peptidases ativas, Bactérias não iniciador

## . ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the enzymatic potential in term of aminopeptidase activities derived from NSLAB, present in Serrano cheese. For the work, six Serrano cheese batches (3 ripened in summer and 3 in winter) manufactured by three farmers in the city of Caxias do Sul, using raw cow milk, without the addition of starter cultures. The activities were evaluated by the hydrolysis of  $\beta$ - naphthylamide substrates with water soluble protein extracts (FPS) Cheese from farm A presented the best result (19 a 74 U/g of cheese with 60 d.). Free amino acids (FAA) were determined in cheeses of this farm. The results have demonstrated a continuous increase in FAA, and the mean FAA released in the cheese were Glu, Arg, Lys, Pro and Leu (58 – 61%). Cheeses with the higher level of FAA were summer cheeses (4.050 mg/100 g DM of cheese with 60 d.). A partial purification with ion-exchange chromatography on fast flow, salt step Q-sepharose was found in the juice extract of NSLAB; the juice extract of NSLAB and their fractions were incubated with Glu, Arg, Lys, Leu and Pro- $\beta$ NA derivatives as substrates and suggesting that the activities enzymes weren't same in NSLAB of different time ripening cheese. SDS-PAGE of these fractions substantiate this. The main peptidase activity was due to aminopeptidases whose activities were recovered after non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis zymogram of FPS and juice extract of NSLAB, as a result suggest that PepN, PepC e PepL found in the FPS would have their origin in NSLAB.

**Keywords:** Serrano cheese, Cheese ripening, Peptidase activities, Nonstarter bacteria

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Seqüência dos aminoácidos da $\alpha_{s1}$ caseína bovina.	9
Figura 2	Seqüência dos aminoácidos da $\alpha_{s2}$ caseína bovina.	10
Figura 3	Seqüência dos aminoácidos da $\beta$ -Caseína bovina.	11
Figura 4	Seqüência dos aminoácidos da k-Caseína bovina.	12
Figura 5	- Modelo da micela de Caseína em corte, evidenciando as submicelas, a k-caseína e os grupos fosfatos de cálcio .....	18
Figura 6	Protocolo geral para a fabricação de queijos .....	25
Figura 7	Fatores associados ao leite, à formação da coalhada e à coalhada, que afetam as características e a qualidade do queijo .....	26
Figura 8	Fatores que, depois de formada a coalhada, determinam as características e o tipo de queijo a ser fabricado, e/ou afetam a qualidade do queijo desejado durante a fabricação e maturação .....	27
Figura 9	Esquema geral da proteólise durante a maturação de queijos	46
Figura 10	Etapas da produção de queijo artesanal serrano	53
Figura 11	Cromatogramas dos AAL.....	89
Figura 12	Gráfico AAL dos queijos A de verão.....	91
Figura 13	Gráfico dos AAL dos queijos A de inverno .....	92
Figura 14	Fracionamento por cromatografia de troca iônica do extrato de <i>Lactobacillus sp.</i> do queijo de 28 dias de maturação (L-28) .....	93
Figura 15	Fracionamento por cromatografia de troca iônica do extrato	



	de <i>Lactobacillus sp.</i> do queijo de 60 dias (L-60) .....	94
Figura 16	Fracionamento por cromatografia de troca iônica do extrato de <i>Enterococos sp.</i> do queijo de 60 dias (E-60) .....	94
Figura 17	Gráfico dos resultados da atividade arilamidásica específica das aminopeptidases dos extratos brutos das células dos microrganismos	95
Figura 18	Gel das Eletroforeses dos Zimogramas .....	102
Figura 19	Zimograma para Lys- $\beta$ NA	102
Figura 20	Zimograma para Pro- $\beta$ NA	103
Figura 21	Zimograma para Arg- $\beta$ NA	104
Figura 22	Zimograma para Leu- $\beta$ NA	105
Figura 23	Zimograma para Glu- $\beta$ NA	105
Figura 24	Especificidade dos substratos e mobilidade eletroforética das aminopeptidases presentes em amostras dos queijos de 28 e 60 dias de maturação (produtor A) e nos extratos dos microrganismos deles isolados	111

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição dos leites de várias espécies de mamíferos .....	7
Tabela 2	Quantidades de aminoácidos nos diferentes tipos de caseínas .	15
Tabela 3	Características médias das micelas de caseína .....	17
Tabela 4	Compostos que geram sabor e aroma a partir dos principais constituintes do leite durante a maturação do queijo .....	34
Tabela 5	Contribuição dos aminoácidos livres, ao sabor do queijo .....	42
Tabela 6	Aminopeptidases de Bactérias acidoláticas .....	43
Tabela 7	Desenvolvimento cromatográfico para a análise dos aminoácidos .....	74
Tabela 8	Tempo médio de aparecimento dos picos para os diferentes aminoácidos .....	74
Tabela 9	Atividade total de aminopeptidases a pH 5.5	83
Tabela 10	Atividade total de aminopeptidases a pH 7.0 .....	84
Tabela 11	Os resultados mais relevantes da atividade das aminopeptidases.....	85
Tabela 12	Atividade de aminopeptidases do Produtor A até os 60 dias de maturação	86
Tabela 13	Evolução dos AAL durante a maturação do queijo Serrano.....	90
Tabela 14	Percentual de aumento dos AAL com o tempo de maturação .....	91

Tabela 15	Atividade arilamidásica totais das aminopeptidases dos extratos brutos das células dos microrganismos (EB) e das frações obtidas após a cromatografia de troca iônica dos extratos (EB) dos microrganismos em nmols de $\beta$ -NA h <sup>-1</sup> .....	97
Tabela 16	Maiores resultados de atividades totais arilamidásicas dos das frações da cromatografia de troca iônica.....	98
Tabela 17	Zimograma dos extratos (EB) das NSLAB obtidas dos queijos com 28 e 60 dias do produtor A e dos extratos (FPS) dos queijos com 28 e 60 dias de maturação.....	110

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

[E<sub>h</sub>]- potencial redox

AA - aminoácidos

AAL- aminoácidos livres

a<sub>w</sub> – atividade da água

BSA - albumina sérica bovina

CEP - Proteínas que envolvem a célula

CN - caseína

E60 - enterococos dos queijos de 60 dias de maturação

EB - extrato bruto dos microrganismos

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ES - estrato seco

F I - eluição da Q-sepharose com 150 mM de NaCl.

F II - eluição da Q-sepharose com 300 mM de NaCl

F III - eluição da Q-sepharose com 500 mM de NaCl

FEPAGRO - Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária.

FpIS - Fração protéica não solúvel

FPS - Fração protéica solúvel

HPLC – High-performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

ICTA - Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Ig - imunoglobina

L28 - lactobacilos dos queijos de 28 dias de maturação

L60 - lactobacilos dos queijos de 60 dias de maturação

LAB - bactérias acidolácticas

mg de P - miligrama de proteína

MRS - meio de cultura Man-Rogosa-Sharpe

Mv - milivolts

NaPB - tampão fosfato

NPN - nitrogênio não protéico

NR – fração não retida na coluna de cromatografia de troca iônica

NSLAB - bactéria acidolácticas não iniciadoras

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

Prt P - proteinases extra celulares

Q.I.- queijo de inverno

Q.V.- queijo de verão

$r^2$  - regressão analítica

RS - Rio Grande do Sul

S/U - relação de sal pela umidade

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato

SN - nitrogênio solúvel

TN - nitrogênio total

ufc – unidade formadora de colônia

UV-VIS - Ultravioleta-visível

$\beta$ -NA - beta naftilamida

-pNA - 1,4-nitroanilida

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b>	I
	<b>ABSTRAT</b>	II
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	IV
	<b>LISTA DE TABELAS</b>	VII
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	VIII
	<b>SUMÁRIO</b>	IX
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
2.1	A MATÉRIA PRIMA DO QUEIJO: O LEITE .....	5
<b>2.2.1</b>	<b>Importância dos constituintes protéicos do leite na fabricação do queijo</b> .....	8
<b>2.2.2</b>	<b>Importância dos carboidratos do leite na fabricação do queijo</b> .	19
<b>2.2.3</b>	<b>A importância dos lipídeos do leite na fabricação do queijo</b> .....	21
2.3	A CIÊNCIA E A TECNOLOGIA DO QUEIJO .....	23
<b>2.3.1</b>	<b>A produção do queijo</b> .....	25
<b>2.3.2</b>	<b>A maturação do queijo</b> .....	28
2.4	O PROCESSO DE MATURAÇÃO DE QUEIJOS .....	30
<b>2.4.1</b>	<b>Parâmetros físico-químicos</b> .....	31
2.4.1.1	Acidez e pH .....	31
2.4.1.2	Atividade da água ( $a_w$ ) .....	32
2.4.1.3	O potencial de oxidação e redução .....	33
<b>2.4.2</b>	<b>Transformações Bioquímicas na maturação de queijo</b> .....	34

2.4.2.1	Glicólise .....	35
2.4.2.2	Lipólise .....	36
2.4.2.3	Proteólise .....	38
2.4.2.3.1	<i>Aminopeptidases</i> .....	41
<b>2.4.3</b>	<b>Os principais microrganismos envolvidos na maturação do queijo</b> .....	<b>46</b>
2.4.3.1	As culturas lácticas .....	47
<b>3</b>	<b>AS CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO</b> .....	<b>51</b>
3.1	EVOLUÇÃO DOS GRUPOS DE MICRORGANISMOS DURANTE A ELABORAÇÃO E MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO .....	54
3.2	EVOLUÇÃO DOS PARÂMETROS QUÍMICOS E FÍSICO - QUÍMICOS DURANTE A ELABORAÇÃO E A MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO .....	56
<b>3.2.1</b>	<b>Evolução do pH e da acidez titulável</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Evolução da atividade da água (<math>a_w</math>) e do teor de umidade</b> .....	<b>57</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Evolução do teor de sal e de cinzas</b> .....	<b>58</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Evolução do teor de lactose</b> .....	<b>59</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Evolução dos teores de proteína e de gordura</b> .....	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>60</b>
4.1	OBJETIVO GERAL .....	60
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	60
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>61</b>
5.1	ESCOLHA DOS PRODUTORES .....	61
5.2	PRODUÇÃO DOS QUEIJOS .....	62

5.3	COLETA DAS AMOSTRAS .....	62
5.4	MICRORGANISMOS .....	63
5.5	O ESTUDO DA AÇÃO PROTEOLÍTICA NOS QUEIJOS DOS PRODUTORES A, B, C .....	64
<b>5.5.1</b>	<b>Instalações</b> .....	64
<b>5.5.2</b>	<b>Material de Laboratório</b> .....	64
<b>5.5.3</b>	<b>Amostras</b> .....	64
5.5.3.1	Preparação das amostras .....	65
5.5.3.2	Preparação da fração de proteína solúvel (FPS) .....	65
5.5.3.3	Conservação dos extratos da FPS .....	65
5.5.3.4	Preparação dos extratos da FPS para os ensaios de atividade enzimática de proteases .....	66
5.5.3.5	Preparação dos extratos da FPS para os ensaios de atividade enzimática de aminopeptidases .....	66
<b>5.5.4</b>	<b>Determinação de atividade enzimática de proteases</b> .....	66
<b>5.5.5</b>	<b>Determinação da atividade aminopeptidásica em substratos aminoacil-<math>\beta</math>-NA</b> .....	67
<b>5.5.6</b>	<b>Determinação do Conteúdo protéico</b> .....	68
5.5.6.1	Método Espectrofotométrico .....	69
5.5.6.2	Método de Bradford .....	69
5.6	DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS LIVRES NOS QUEIJOS DO PRODUTOR A .....	70
<b>5.6.1</b>	<b>Reativos</b> .....	70
<b>5.6.2</b>	<b>Extração dos aminoácidos livres</b> .....	71
<b>5.6.3</b>	<b>Derivatização das amostras</b> .....	71



5.6.4	<b>Preparação dos padrões</b> .....	72
5.6.5	<b>Desenvolvimento cromatográfico</b> .....	73
5.7	CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA Q-SEPHAROSE .....	73
5.7.1	<b>Cultivo dos microrganismos</b>	75
5.7.2	<b>Extratos aquosos dos microrganismos</b> .....	75
5.7.3	<b>Procedimento para a cromatografia de troca iônica Q-Sepharose</b> .....	75
5.7.4	<b>Atividade Arilamidásica nos extratos dos microrganismos e em suas frações após cromatografia de troca iônica</b>	76
5.8	ELETROFORESE .....	76
5.9	ZIMOGRAMA .....	77
5.9.1	<b>Queijos</b> .....	78
5.9.2	<b>Microrganismos</b> .....	78
5.9.3	<b>Determinação da atividade arilamidásica das aminopeptidases</b>	79
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	79
6.1	CAPÍTULO 1. EVOLUÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE A ELABORAÇÃO E MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO	80
6.2	CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS, COM ÊNFASE EM AMINOPEPTIDASES, DO QUEIJO SERRANO	80
6.2	ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS	81
6.2.1	<b>Atividades caseinolítica</b>	82
6.2.2	<b>Atividades arilamidásicas de aminopeptidases</b> .....	82
6.3	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS AMINOÁCIDOS LIVRES	

	(AAL) NAS AMOSTRAS DOS QUEIJOS DO PRODUTOR A .....	87
6.4	<b>CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA .....</b>	92
6.4.1	<b>Análise de aminopeptidases presentes em microrganismos isolados dos queijos de 28 e 60 dias.</b>	92
6.5	ZIMOGRAMA PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE ARILAMIDÁSICA EM EXTRATOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE QUEIJOS E DOS EXTRATOS DAS AMOSTRAS DE QUEIJOS DO PRODUTOR A .....	101
7	<b>CONCLUSÕES .....</b>	112
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	114
	<b>APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO .....</b>	127
	<b>APÊNDICE B - DADOS DIÁRIOS DE TEMPERATURA E UMIDADE DURANTE O PERÍODO DE COLETA DOS QUEIJOS ..</b>	128
	<b>APÊNDICE C - CALENDÁRIO DAS COLETAS DAS AMOSTRAS NO VERÃO E INVERNO .....</b>	130
	<b>APÊNDICE D - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES .....</b>	131
	<b>ANEXO A – TABELAS .....</b>	139

## 1 INTRODUÇÃO

O queijo é um dos alimentos clássicos na dieta de certas culturas humana, e tem sido produzido a mais de cinco mil anos. Durante esta longa história a produção de queijo tem crescido em volume e variedade chegando em nossos dias a uma produção de quinze milhões de toneladas ao ano, o que representa o uso de 35% da produção mundial de leite (SINGH et al., 2003).

Em 2005 na quinta edição de “Cheese”, realizada em Bra, na província de Cuneo (Itália), participaram mais de 250 expositores provenientes de mais de 30 países, apresentando centenas de diferentes variedades de queijos.

Neste evento foi salientada à grande importância que a produção de queijo artesanal representa para os projetos de proteção da biodiversidade, sendo ela responsável por um conceito de qualidade que não se limita ao simples aspecto higiênico e sanitário, mas que abrange também a sustentabilidade ambiental, econômica e social.

O estado do Rio Grande do Sul, embora seja um grande produtor de leite, apresenta uma produção limitada de queijo importando de outros estados este produto.

A produção artesanal e caseira de queijo em sítios e fazendas é uma tradição que vem se repetindo desde os tempos pioneiros, sendo responsável pela sustentação econômica e social de muitos proprietários e moradores rurais. Embora não se encontre nas estatísticas oficiais, esta atividade tem uma participação efetiva na economia do Estado.

Inúmeras são as pequenas propriedades em que a receita de fabricação, com base no leite cru, ainda é a mesma, passada de geração em geração.

Mesmo com a valorização de queijos artesanais de sabor característico como os produzidos na região de Criúva, no município de Caxias do Sul (RS), a permanência da tradição enfrenta barreiras. Os pequenos fabricantes têm dificuldades de seguir todas as normas de segurança alimentar e sofrem restrições na hora de vender seu produto.

Para muitos destes produtores artesanais o queijo é o carro-chefe da economia familiar sendo essencial para a sobrevivência econômica das pequenas propriedades. É por isso que modernizar o sistema de produção do queijo artesanal, sem prejudicar o sabor tradicional nem excluir os produtores da atividade, tornou-se um desafio.

O queijo Serrano é um queijo artesanal elaborado por produtores rurais já organizados em agroindústrias pela Secretaria Municipal de Agricultura, na região de Criúva, município de Caxias do Sul (RS). O primeiro passo foi elevar a qualidade higiênica do produto, para se adequar às normas sanitárias, os padrões para as instalações da queijaria e o controle sanitário do rebanho, permitindo ao produtor a autorização para comercializar seu produto.

O desafio que permanece é evoluir para a criação de um sistema de denominação de origem controlada para valorizar estes queijos artesanais, uma tradição que já é difundida em países como: Itália, Espanha, França, Portugal e Argentina, nos quais os queijos artesanais possuem normas de identidade especificadas (Souza, 2002).

Os produtores cientes das necessidades que a realidade impõe, desejam melhorar, não só a qualidade de seus queijos, mas a obtenção de um produto

uniforme. Para isso é importante conhecer os fenômenos bioquímicos, físico-químicos e microbiológicos do queijo Serrano, que é o objetivo deste trabalho, e, a partir dos resultados, poder planejar experimentos de otimização do processo numa etapa futura.

O primeiro passo para atingir este objetivo foi selecionar os produtores para o projeto. Estes elaboraram e maturaram os queijos, utilizados neste trabalho, conforme a melhor tradição, nos períodos de inverno e verão; nestes queijos foram determinadas e isoladas as culturas lácticas de interesse e determinadas as propriedades químicas e físico-químicas durante a evolução da maturação.

Num segundo momento, por ser a atividade proteolítica o principal fenômeno bioquímico durante a maturação destes queijos, foram estudadas as atividades proteolíticas existentes nos extratos aquosos dos queijos (fração protéica solúvel - FPS) durante a evolução da maturação utilizando substratos sintéticos, com ênfase na atividade aminopeptidásica, e selecionando o produtor com os melhores resultados.

Nos queijos do produtor selecionado foi determinada a evolução dos aminoácidos livres (AAL) durante a maturação. Utilizando substratos sintéticos dos AAL mais significativos foram observadas as atividades aminopeptidásicas em diferentes estágios de maturação nos extratos dos queijos e nos extratos brutos dos microrganismos isolados destes queijos. Paralelamente as proteínas dos extratos brutos dos microrganismos foram parcialmente purificadas, e nas suas frações foram avaliadas as mesmas atividades aminopeptidásicas.

Por último, para correlacionar as principais atividades proteolíticas presentes nos queijos com as atividades presentes nos microrganismos, foram realizados

zimogramas com os extratos dos queijos e com os extratos brutos dos microrganismos isolados destes queijos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A MATÉRIA PRIMA DO QUEIJO: O LEITE

O leite é um fluido secretado pela glândula mamária das fêmeas de todos os mamíferos e sua função primária é fornecer todos os nutrientes necessários para os recém nascidos da espécie. Ele supre, desta forma, as necessidades em energia, através da gordura e da lactose, em aminoácidos, através das proteínas, em vitaminas e em elementos químicos comumente, mas inadequadamente, referidos como minerais (FOX et al., 2000).

Também, encontram-se, na constituição do leite, substâncias com específicas funções fisiológicas de defesa como imunoglobulinas, lactoperoxidasas, e lactotransferrina, enzimas e inibidores enzimáticos, vitaminas ligadas a transportadores protéicos e fatores de crescimento e de controle celular (JENSSEN, 1995).

A composição do leite é muito variada entre as espécies, devido à maior ou menor necessidade de nutrientes alimentares para cumprir as funções fisiológicas. Um número aproximado de 180 espécies já teve o seu leite estudado. Os leites mais conhecidos, quanto a composição média dos principais componentes, são os que apresentam interesse de produção e o leite humano, e seus valores podem ser observados na Tabela 1 (FOX et al., 1998). Uma extensiva informação, quanto à composição dos leites bovino e humano, foi compilada por Jenssen (1995).

Além dos principais constituintes, o leite contém ainda centena de outros constituintes menores que são importantes por apresentarem perspectivas nutricionais, tecnológicas e sensoriais (SAWYER et al., 2002).

O leite, como fluido biológico, além de variar de uma espécie para outra, difere dentro de uma mesma espécie, dependendo da saúde, do estado nutricional, do período de lactação e da idade do animal; em produções bem dirigidas, muitas destas condições podem ser controladas, outras persistem como variáveis sazonais, variando, em consequência, a composição química dos constituintes do leite (FOX et al., 2000).

Por sua vez, a composição do leite pode ser modificada ou controlada por processos tecnológicos e, mesmo assim, algumas diferenças permanecerão. Estas diferenças na composição do leite são os maiores problemas para uma produção padrão de queijos (FOX et al., 2000).

Observado sob o ponto de vista físico-químico, o leite é um líquido complexo. Os constituintes do leite se apresentam em três fases; a primeira e a maior fase é uma solução aquosa de lactose, sais orgânicos e inorgânicos, vitaminas e outras moléculas pequenas; a segunda fase é formada de grandes colóides agregados, as caseínas, com diâmetros de 50 a 600 nm; e uma terceira fase forma uma emulsão lipídica com glóbulos de tamanhos que variam de 0,1 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro (SINGH et al., 1997).

O sistema que constitui o leite é dinâmico devido à instabilidade de muitas das suas estruturas, por exemplo: a mudança da membrana dos glóbulos de gordura, a mudança na solubilidade de alguns dos seus constituintes, principalmente dos sais inorgânicos e das proteínas com a variação da temperatura e do pH, a



presença de enzimas que modificam continuamente os constituintes, como lipases, proteases, ou oxidorreductases (SINGH et al., 2003).

**Tabela 1 Composição dos leites de várias espécies de mamíferos**

Espécie	Sólidos %	Gordura %	Proteína%	Lactose %	Cinza %
Humana	12,2	3,8	1,0	7,0	0,2
Vaca	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
Cabra	12,3	4,5	2,9	4,1	0,8
Ovelha	19,3	7,4	4,5	4,8	1,0
Porca	18,8	6,8	4,8	5,5	-
Égua	11,2	1,9	2,5	6,2	0,5
Burra	11,7	1,4	2,0	7,4	0,5
Rena	33,1	16,9	11,5	2,8	-
Coelha	32,8	18,3	11,9	2,1	1,8
Bisonte	14,6	3,5	4,5	5,1	0,8
Aliá	31,9	11,6	4,9	4,7	0,7
Ursa Polar	47,6	33,1	10,9	0,3	1,4
Foca Cinzenta	67,7	53,1	11,2	0,7	-

Fonte: FOX; McSWEENEY, 1998, P.2.

Os microrganismos são a causa das maiores mudanças, e o fazem de forma direta através do crescimento, causando alterações de pH do meio, do potencial redox  $[E_h]$ , ou indireta através das enzimas secretadas e da troca de gases com a atmosfera como dióxido de carbono (SOUSA et al., 2001).

O leite deveria ser consumido diretamente da glândula mamaria, onde é produzido em intervalos freqüentes. Porém, nas operações de produção leiteira é estocado por tempos que variam de horas até dias; durante esse tempo pode ser submetido, várias vezes, a processos de resfriamento, aquecimento e agitação que causam mudanças físicas e possibilitam variações na composição microbiológica e

nas ações enzimáticas, causando, em conseqüência, alterações nas propriedades do leite tratado (CHEN et al., 2003).

Embora muitos dos constituintes menores sejam importantes para um equilíbrio nutricional, são os constituintes maiores (proteínas, gorduras e açúcares) e alguns dos seus componentes de pequena massa molecular (cálcio, fósforo e citrato) que determinam as propriedades tecnológicas do leite (SINGH et al., 2003).

### **2.2.1 Importância dos constituintes protéicos do leite na fabricação do queijo**

No leite destinado a produção de queijo, as proteínas são os constituintes mais importantes e aproximadamente 80% do nitrogênio total existente no leite de bovinos é constituído por caseína.

A caseína bovina é formada por quatro tipos de proteínas substancialmente diferentes:  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína e k-caseína; representando aproximadamente 37%, 10%, 34%, 15% da caseína total respectivamente, com massas moleculares que variam de 20-25 kDa (DALGLEISH, 1990). Todas as caseínas estão bem caracterizadas a nível molecular e as seqüências dos aminoácidos são conhecidas, podendo-se observar nas Figuras 1, 2, 3 e 4 (MALIN; BROW, 1999).

1		Glu - Val - Leu - Asn - Glu - Asn - Leu -
H. Arg - Pro - Lys - His - Pro - Ile - Lys - His - Gln - Gly - Leu - Pro - Gln -		.....
21		
Leu - Arg - Phe - Phe - Val - Ala - (Variantes B,C,D,E)		
		- Pro Phe - Pro - Glu - Val - Phe - Gly - IYs - Glu - Lys - Val - Asn - Glu - Leu
		.....(Variante A)
41		Ala (Variantes A, B, C, E) Gln (Variantes A, B, C, D)
Ser - Lys - Asp - Ile - Gly - SerP - Thr - Glu - Asp - Gln -		- Met - Glu - Asp - Ile - Lys Met
		ThrP (Variante D) Glu (variante E)
61		
Glu - Ala - Glu - SerP - Ile - SerP - SerP - SerP - Glu - Glu - Ile - Val - Pro - Asn - SerP - Val - Glu - Gln - Lys - His -		
81		
Ile - Gln - Lys - Glu - Asp - Val - Pro - Ser - Glu - Arg - Tyr - Leu - Gly - Tyr - Leu - Glu - Gln - Leu - Leu - Arg -		
101		
Leu - Lys - Lys - Tyr - Lis - Val - Pro - Gln - Leu - Glu - Ile - Val - Pro - Asn - SerP - Ala - Glu - Glu - Arg - Leu -		
121		
His - Ser - Met - Lys - Glu - Gly - Ile - His - Ala - Gln - Gln - Lys - Glu - Pro - Met - Ile - Gly - Val - Asn - Gln -		
141		
Glu - Leu - Ala - Tyr - Phe - Tyr - Pro - Glu - Leu - Phe - Arg - Gln - Phe - Tyr - Gln - Leu - Asp - Ala - Tyr - Pro -		
161		
Ser - Gly - Ala - Trp - Tyr - Tyr - Val - Pro - Leu - Gly - Thr - Gln - Tyr - Thr - Asp - Ala - Pro - Ser - Phe - Ser -		
181		Glu (Variante A, B, D) 199
Asp - Ile - Pro - Asn - Pro - Ile - Gly - Ser - Glu - Asn - Ser -		- Lys - Thr - Thr - Met - Pro - Leu - Trp - OH
		Gly (Variante C, E)

Figura 1 – Seqüência dos aminoácidos da  $\alpha_{s1}$  caseína bovina, apresentando as substituições ou as supressões dos aminoácidos nas principais variantes genéticas

FONTE: FOX et al., 2000, p. 34.



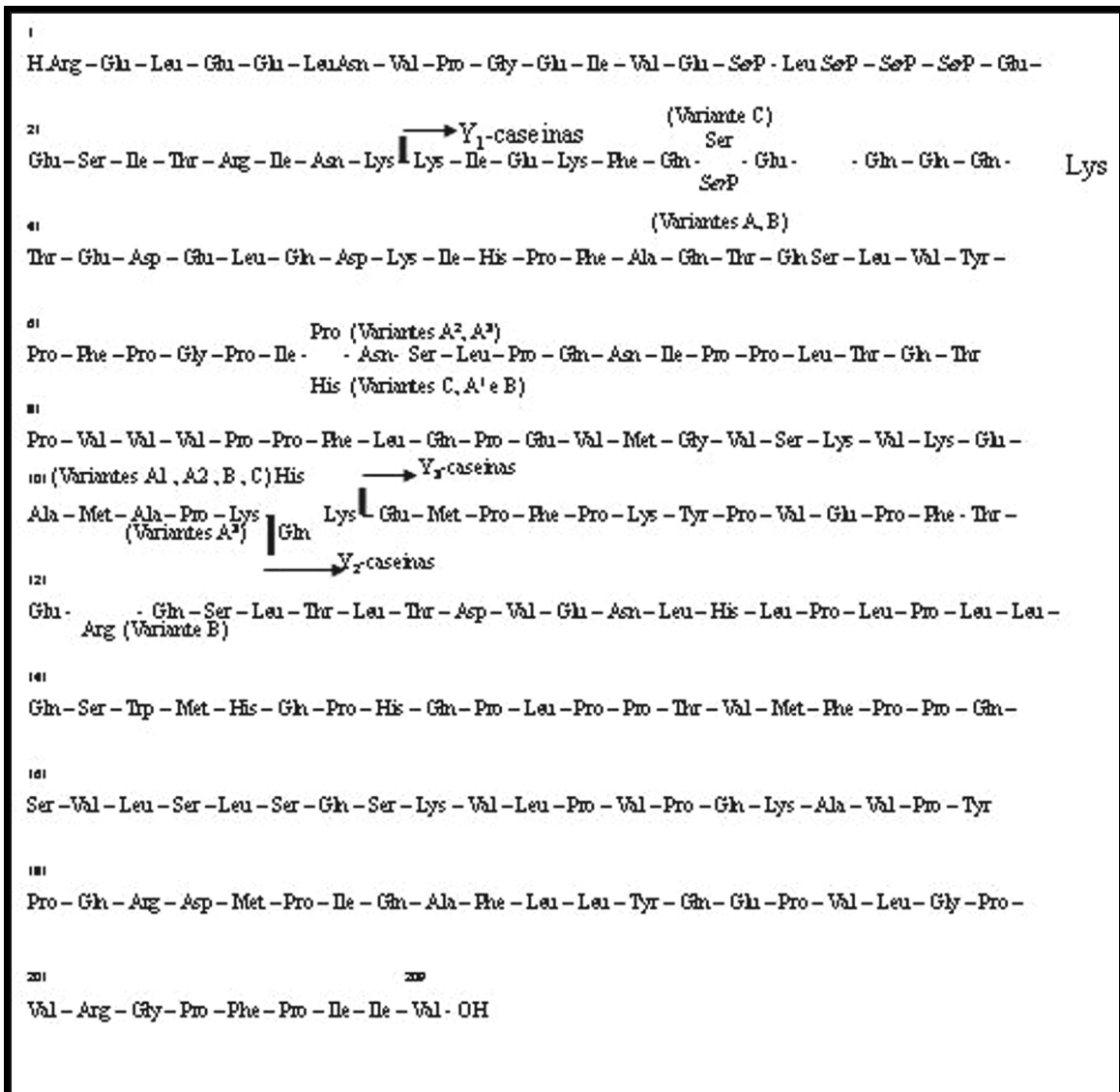


Figura 3 - Seqüência dos aminoácidos da  $\beta$ -Caseína bovina, apresentando os aminoácidos nas variantes genéticas e onde os principais sítios de clivagem da plasmina estão sinalizados (  $\downarrow$  ) dando origem as seqüências de  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  caseínas  
Fonte: FOX et al., 2000, p. 36.

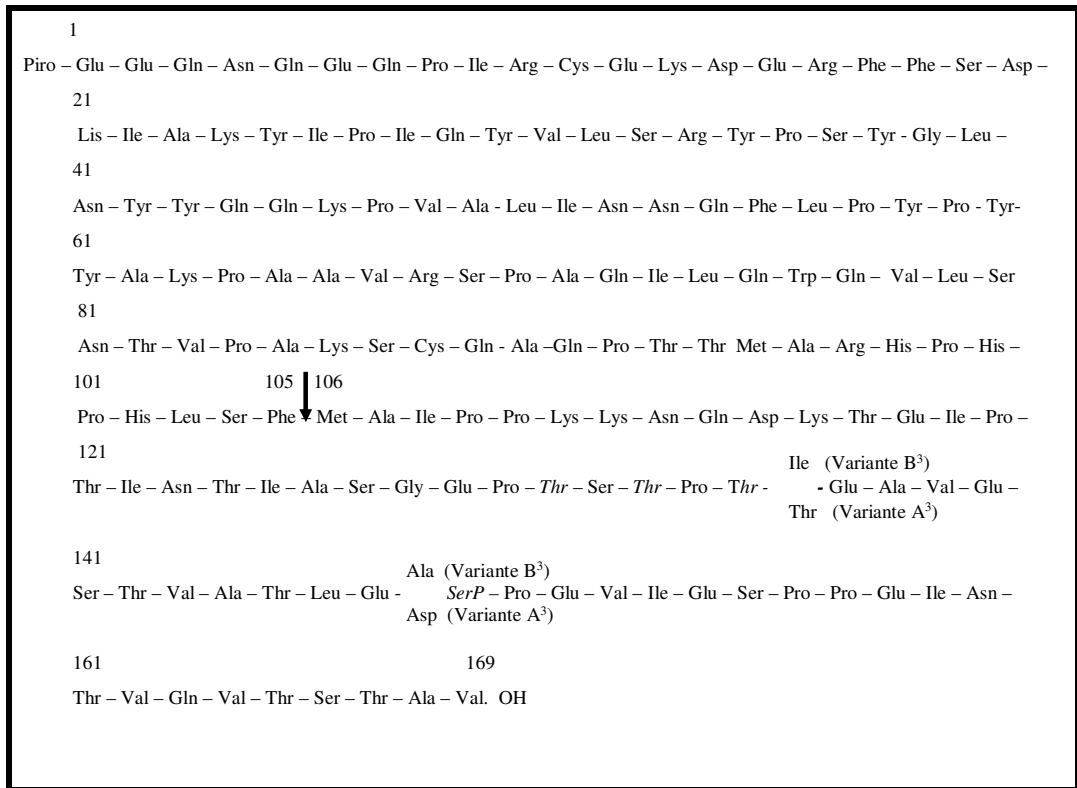


Figura 4 - Seqüência dos aminoácidos da  $\kappa$ -Caseína bovina, com os polimorfismos genéticos A e B, o sítio de clivagem da quimosina (▼) entre os resíduos 105 e 106. Em itálico os sítios fosforilados ou ligados a glicossídeos

Fonte: FOX et al., 2000, p. 37.

Todas as caseínas são fosforiladas: a  $\alpha_{s1}$ -caseína contém 8 mols  $PO_4$ /mol de proteína;  $\beta$ -caseína, 4 mols  $PO_4$ /mol;  $\alpha_{s2}$ -caseína, 10 a 13 mols  $PO_4$ /mol; e a  $\kappa$ -caseína, 1 a 3 mols  $PO_4$ /mol (WALSTRA; JENNES, 1984).

Os grupos fosfatos estão esterificados como monoésteres da serina e ocorrem compartimentalizados. Eles também se ligam fortemente a cátions polivalentes, responsáveis pela neutralização e precipitação das  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -caseínas em presença de 6 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  a 30° C; a  $\kappa$ -caseína, que usualmente contém 1 mol de  $\text{PO}_4$ /mol, não precipita (HOLT; HORNE, 1996; WALSTRA, 1990).

As  $\alpha_{s2}$ -caseína e  $\kappa$ -caseína contêm resíduos de cisteína formando ligações intermoleculares de dissulfetos. A ausência de cisteína ou cistina na  $\alpha_{s1}$ -caseína e  $\beta$ -caseína aumenta a flexibilidade destas moléculas (FOX et al., 1996).

Todas as caseínas contêm um nível relativamente elevado de prolina: na  $\beta$ -caseína 35 dos seus 209 resíduos de aminoácidos são prolinas e eles estão uniformemente distribuídos na molécula, como se observa na Figura 3. A presença de alto nível de prolina favorece a limitada estabilidade da forma de estrutura secundária  $\alpha$ -hélice (13 a 29 %) e a presença de uma estrutura irregular de até 72% da proteína (MALIN; BROWN, 1999; HORNE, 2002).

Técnicas experimentais indicam que a caseína tem estruturas secundária e terciária pouco organizadas, embora um cálculo teórico indique a existência de uma estrutura de alto grau de organização. Isto sugere que a caseína possui uma estrutura verdadeiramente flexível (HOLT; SAWYER, 1993; SAWYER et al., 2002). A falta de uma estrutura secundária e terciária estável torna a caseína resistente aos agentes desnaturantes (ex. temperatura ou uréia), e contribui para tornar a sua superfície suscetível ao ataque de proteases, o que é importante para a maturação do queijo (HORNE, 2002).

Os resíduos hidrofóbicos, os polares e os com carga não são uniformemente distribuídos ao longo da estrutura molecular das caseínas, apresentando-se como seqüências hidrofóbicas ou hidrofílicas que se alternam, tornando a caseína uma estrutura fortemente anfifílica, contribuindo para a constituição de uma superfície de alta reatividade. O 2/3 N-terminal de  $\kappa$ -caseína, que tem particular significado na maturação do queijo, é fortemente hidrofóbico enquanto o 1/3 C-terminal é fortemente hidrofílico (HOLT; HORNE, 1996). Esta hidrofobia da caseína está diretamente relacionada com o fato de seus produtos de hidrólise gerarem sabores amargos, um dos principais defeitos de muitas variedades de queijos (FOX et al., 2000).

A  $\kappa$ -Caseína é a única caseína glicosilada. Ela contém galactose, galactosamina e ácido N-acetilmurâmico; também podem ocorrer outros trissacarídeos ou tetrassacarídeos que se ligam ao resíduo da treonina na região C-terminal. Esta caseína contém de 0 a 4 trissacarídeos ou tetrassacarídeos (existem 10 variantes de  $\kappa$ -Caseína); a presença de oligossacarídeos ligados ao C-terminal de  $\kappa$ -Caseína aumenta a capacidade hidrofílica da região C terminal (FOX e McSWEENEY., 1998).

Todas as caseínas apresentam polimorfismo genético, com presença de um ou dois aminoácidos diferentes, porém raramente é definida a posição na cadeia em que essas trocas ocorrem. As variações presentes no leite são determinadas pela genética Mendeliana, e podem determinar um efeito significativo no queijo fabricado (Figuras 1, 2, 3 e 4).



**Tabela 2 - Quantidades de aminoácidos nos diferentes tipos de caseínas**

<i>Tipos de caseínas</i>				
aminoácido	$\alpha_{s1}$ -CN	$\alpha_{s2}$ - CN	$\beta$ - CN	$\kappa$ - CN
Asp	7	4	4	4
Asn	8	14	5	7
Thr	5	15	9	14
Ser	8	6	11	12
SerP	8	11	5	1
Glu	24	25	18	12
Gln	15	15	21	14
Pro	17	10	35	20
Gly	9	2	5	2
Ala	9	8	5	15
1/2 Cys	0	2	0	2
Val	11	14	19	11
Met	5	5	6	2
Ile	11	11	10	13
Leu	17	13	22	8
Tyr	10	12	4	9
Phe	8	6	9	4
Trp	2	2	1	1
Lys	14	24	11	9
His	5	3	5	3
Arg	6	6	4	5
PyroGlu	0	0	0	1
<b>Total de resíduos</b>	<b>199</b>	<b>208</b>	<b>209</b>	<b>169</b>
<b>massa molecular</b>	<b>23,612</b>	<b>25,228</b>	<b>23,98</b>	<b>19,005</b>
<b>H<math>\phi</math>ave (kJ/resíduo)</b>	<b>4,89</b>	<b>4,64</b>	<b>5,12</b>	<b>5,58</b>

Fonte: FOX et al., 2000, p. 33

O procedimento para nomear as variantes de caseínas é extremamente heterogêneo, sendo o mais utilizado o de Fox et al. (2000), onde a família da caseína é indicada por letra grega com subscrito quando necessário:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ - e  $\kappa$ . A letra grega é seguida de CN (caseína) e a variedade genética é indicada por uma letra latina (A, B, C etc.) com um sobrescrito se necessário:  $\alpha_{s1}$ - CN B,  $\beta$ -CN A<sup>1</sup>. Finalmente, o número de resíduos fosfatos é indicado:  $\alpha_{s1}$ - CN B-8P,  $\beta$ -CN A<sup>1</sup>-5P.

Os menores componentes do sistema caseína são as  $\gamma$ -caseínas, que são fragmentos C-terminais da  $\beta$ -caseína produzidos pela plasmina, uma proteinase nativa do leite. Os fragmentos N-terminal são incluídos nas chamadas frações de peptonas da proteólise das proteínas do leite (FOX e McSWEENEY, 1998).

Como já mencionado  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - e  $\beta$ - CN, juntas, constituem 85% de toda a caseína e são precipitadas por uma concentração de cálcio superior a 6 mM. Como o leite bovino contém aproximadamente 30 mM de cálcio, tem-se a expectativa que estas caseínas precipitem no leite. Entretanto a  $\kappa$ -CN, que contém 1 mol de  $PO_4$ /mol de proteína, é insensível ao cálcio e em geral é estável para uma quantidade de cálcio 10 vezes superior à que precipita as caseínas sensíveis. As caseínas apresentam uma estrutura quaternária conhecida como “micela da caseína” (McMAHON et al., 1984). As características principais de uma micela de caseína encontram-se na Tabela 3.

Há muitas formas de interpretar a estrutura da micela. A mais aceita é que esta é composta por submicelas com massas em torno de  $5 \times 10^6$  kDa (WALSTRA, 1999). Considera-se que o núcleo da submicela é formado pelas caseínas sensíveis ao cálcio, e quantidades variáveis de  $\kappa$ -CN encontram-se na superfície das submicelas. As submicelas pobres em  $\kappa$ -CN estão localizadas no centro das micelas e as ricas em  $\kappa$ -CN estão concentradas na superfície.

Os segmentos N-terminal da  $\kappa$ -CN, apolares, interagem hidrofobicamente com as caseínas cálcio sensíveis. Os segmentos hidrofílicos C-terminais projetam-se para fora da superfície da micela, tendo a aparência de filamentos (Figura 5).

**Tabela 3 – Características médias das micelas de caseína**

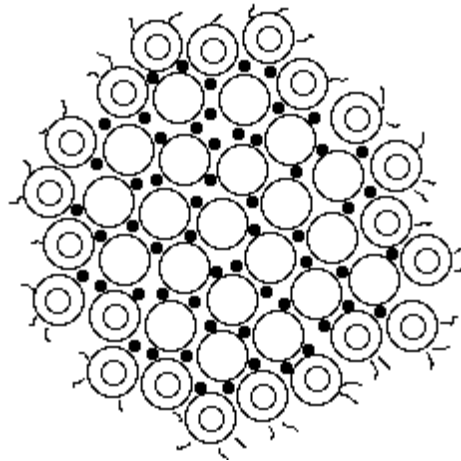
Diâmetro	120 nm (variação: 50-500 nm)
Área de superfície	$8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$
Volume	$2,1 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$
Densidade (hidratada)	$1,0632 \text{ g cm}^3$
Massa	$2,2 \times 10^{-15} \text{ g}$
Conteúdo em Água	63%
Hidratação	$3,7 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ proteína}$
Volume	$4,4 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$
Massa Molecular (hidratada)	$1,3 \times 10^9 \text{ Da}$
Massa Molecular (desidratada)	$5 \times 10^8 \text{ Da}$
Número de cadeias de peptídeos	$10^4$
Número de partículas por $\text{cm}^3$ de leite	$10^{14} - 10^{16}$
Área de superfície das micelas por $\text{cm}^3$ leite	$5 \times 10^4 \text{ cm}^2$
Média de distância livre	240 nm

Fonte: FOX et al., 2000, p. 40.

A estabilidade do colóide micélico é atribuída a um potencial de aproximadamente -20 mV a 20° C, assim como a estabilidade da estrutura esférica deve-se à projeção dos filamentos. As submicelas são unidas entre si por microcristais de fosfato de cálcio, e por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (SCHMIDT, 1982).

Embora este modelo das micelas não seja universalmente aceito, ele é adequado, para explicar muita das propriedades, tecnologicamente importantes, das micelas, incluindo a coagulação pela renina, que, causando a hidrólise específica de peptídeos da  $\kappa$ -CN na micela, resulta na destruição da camada estabilizante da superfície (KRUIF, 1999).

## Micela de Caseína

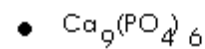


## Submicela

região hidrofóbica



superfície rica em k-caseína



**Figura 5 - Modelo da micela de Caseína em corte, evidenciando as submicelas, a k-caseína e os grupos fosfatos de cálcio.**

Fonte: WALSTRA, 1999, p. 190.

Outra fração de proteínas do leite bovino é conhecida como fração do soro do leite. As quatro principais proteínas do soro são a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg, 50 %),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -la, 20 %), albumina sérica (BSA, 10%), e imunoglobulinas (Ig, 10 %; principalmente IgG<sub>1</sub>, com pequenas quantidades de IgG<sub>2</sub>, IgA e IgM (SAWYER et al., 2002). No leite humano a principal imunoglobulina é a Ig A (FOX et al., 2000).

As proteínas desta fração, contrariamente à caseína, possuem um alto nível de estrutura secundária, terciária e quaternária. Elas são proteínas globulares típicas e desnaturam com o calor (desnaturação completa a 90<sup>0</sup> C durante 10 min); não são fosforiladas e são insensíveis ao íon Ca<sup>2+</sup> (SAWYER et al., 2002). Todas as proteínas do soro contêm ligações dissulfetos que estabilizam as suas estruturas. A  $\beta$ -Lg contêm um grupo sulfidril, que em determinadas condições, apresenta interação dissulfeto com outras proteínas; a mais importante destas interações é

com a  $\kappa$ -CN e ocorre com o aquecimento a 75<sup>o</sup> C durante 15 segundos (HUMBERT; ALAIS, 1979; FOX, 1981). Elas também são capazes de modificar as propriedades da renina na coagulação do leite, e de alterar a estrutura do gel, as propriedades reológicas e sinérgicas de produtos constituídos por gel ácido, como o yogurt e os queijos novos (SAWYER et al., 2002).

Ainda existem no leite numerosas proteínas menores. Estas, na sua maioria, encontram-se no soro, mas algumas estão nas membranas dos glóbulos de gordura. Entre estas proteínas menores incluem-se enzimas (mais de 60), inibidores de enzimas, metaloproteínas (especialmente lactoferrina e osteopontina), proteínas fixadoras de vitamina, e alguns fatores de crescimento (CHEN et al., 2003).

Muitas enzimas naturais do leite são ativadas durante a maturação do queijo, especialmente a plasmina, a xantinaoxidase e, possivelmente, a fosfatase ácida (FOX et al., 1996).

A lipoproteína lípase é provavelmente importante em queijos produzidos a partir de leite não cozido. A ação de outras enzimas naturais do leite na maturação do queijo não foi ainda devidamente investigada e requer mais estudos (SINGH et al., 2003).

### **2.2.2 Importância dos carboidratos do leite na fabricação do queijo**

A lactose é o principal carboidrato existente no leite de todos os mamíferos, que apresenta, também, traços de outros açúcares como glicose, frutose,

glicosamina, galactosamina, e oligossacarídeos. A concentração de lactose varia de acordo com a espécie como visto na Tabela 1.

A concentração da lactose nos bovinos decresce progressivamente durante a lactação; esta tendência contrasta com a tendência dos lipídeos e das proteínas que, depois de decrescerem no início da lactação, apresentam um forte crescimento na segunda metade da lactação (FOX, McSWEENEY; 1998).

A lactose e os íons solúveis (sódio, potássio, e cloreto) são os maiores responsáveis pela pressão osmótica do leite (FOX, McSWEENEY; 1998). Durante a mastite, a concentração de NaCl aumenta no leite, resultando num aumento na pressão osmótica. Este aumento é compensado por uma diminuição no conteúdo de lactose; isto indica que existe uma relação inversa entre a lactose e o sal na composição do leite, o que é verificado ao observar-se a Tabela 1, onde os leites com alto conteúdo de lactose apresentam um conteúdo de cinzas baixo (FOX, McSWEENEY; 1998).

A lactose tem uma importante função no leite e nos produtos dele derivados: é essencial na produção de produtos lácticos fermentados, inclusive do queijo; contribui para o valor nutritivo do leite e de seus derivados; atua na textura de alguns concentrados e de produtos congelados; nos produtos de leite aquecidos a altas temperaturas participa das reações induzidas pelo calor, causando mudanças de cor e aroma (FOX, McSWEENEY; 1998).

Como estrutura química, a lactose é um dissacarídeo composto por uma galactose e uma glicose, com uma ligação glicosídica  $\beta$ 1-4, e seu nome sistemático é *O*- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-4)- $\alpha$ -D-glicopiranosose ( $\alpha$ -lactose) ou *O*- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-glicopiranosose ( $\beta$ -lactose). Este dissacarídeo é, portanto,

um açúcar redutor, pois apresenta um hemiacetal livre, que existe nas formas anoméricas  $\alpha$  e  $\beta$ .

A biossíntese da lactose ocorre unicamente nas glândulas mamárias a partir da glicose do sangue.

Os anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  da lactose, quando em solução, encontram-se em equilíbrio entre si e com a forma aldeídica de cadeia aberta. O comportamento das diferentes formas da lactose, quanto à solubilidade e fatores físico-químicos, é importante no processamento de produtos lácticos concentrados, desidratados e congelados; mas não interfere na fabricação do queijo, onde toda a lactose é utilizada durante o processamento ou durante a maturação; a coalhada fresca apresenta, na sua composição química, aproximadamente 1% de lactose, que é fermentada pelas bactérias acidolácticas (LAB) a ácido láctico (FOX et al., 1990; WALSTRA; JENNESS, 1984).

### **2.2.3 A importância dos lipídeos do leite na fabricação do queijo**

A fração lipídica é a de maior variação nos leites, sua quantidade vai de 2% até mais de 50% como se observa na Tabela 1.

Nas diferentes raças bovinas, as vacas Jersey são as que apresentam a maior quantidade de gordura (6-7%) e a raça holandesa, a menor (3,7-4%). Os lipídeos no leite são predominantemente triacilgliceróis, os quais representam mais de 98% do total da fração de lipídeos; os restantes 2% são constituídos por

diacilgliceróis, monoacilgliceróis, fosfolípídeos, esteróis (principalmente colesteróis), e traços de vitaminas lipossolúveis A, D, E, e K (JENSEN; 1995).

No leite dos ruminantes há uma maior variedade de ácidos graxos do que em outros leites; no leite bovino foram identificados cerca de 400 ácidos graxos predominando os de cadeias lineares com número par de átomos de carbono, saturadas ou insaturadas, com 1, 2 ou 3 duplas ligações.

Nas gorduras do leite observam-se algumas características importantes como: a) apresentam uma considerável quantidade de ácido butanóico (C 4:0) e são as únicas gorduras a conter este ácido; b) em geral, apresentam alta concentração de ácidos graxos com cadeia média (hexanóico, C 6:0, até decanóico, C 10:0) devido à alta atividade da tiol-hidrolase no complexo das ácido-graxo sintetases, que provoca uma prematura interrupção no processo de prolongamento da cadeia; c) os ácidos graxos de cadeias pequenas e médias são relativamente voláteis e solúveis em água, e estão predominantemente esterificados na posição *sn 3* do glicerol; d) possuem baixas quantidades de ácidos graxos insaturados, tornando o leite e seus derivados resistentes ao ranço oxidativo (FOX; McSWEENEY, 1998).

Embora os fosfolípídeos estejam presentes em concentração muito baixa, eles desempenham a importante função de emulsificadores das gorduras do leite. Estas ainda apresentam um pequeno conteúdo de colesterol, vitaminas lipossolúveis e carotenos, provenientes da dieta dos animais, responsáveis pela cor amarela das gorduras. A intensidade da cor depende da concentração dos carotenos na alimentação do animal (FOX; McSWEEREY, 1998). A oxidação dos lipídeos é um fenômeno raro no queijo, provavelmente devido ao seu baixo potencial redox,  $E_h$  : -150 mV (FOX et al., 1996).



Na elaboração de muitos produtos lácteos, o leite é homogeneizado, um processo que reduz o tamanho dos glóbulos de gordura. O leite destinado à fabricação de queijo, normalmente, não é homogeneizado, porque este processo interfere na coalescência da coalhada (FOX et al., 1993).

A gordura tem uma função importante na qualidade dos queijos. Ela contribui na textura, no sabor e aroma de muitos queijos através de seus ácidos graxos livres e de outros compostos deles derivados como: ácidos carbonílicos, lactonas, ésteres, e tioésteres, que nela estão dissolvidos (MARILLEY; CASEY, 2004).

### 2.3 A CIÊNCIA E A TECNOLOGIA DO QUEIJO

A denominação queijo é um nome genérico, atribuído a um grupo de produtos alimentares produzidos a partir do leite (SINGH et al., 2003).

A fabricação do queijo é, em princípio, uma forma de preservar o leite como alimento sem a necessidade de cozimento, e sua preservação é resultado da combinação de ações como: desidratação, acidificação, produção de fatores antimicrobianos, condições de anaerobiose, adição de NaCl.

Justamente devido a esta variedade de fatores o queijo é, sob o ponto de vista tecnológico, o grupo mais variado dos produtos lácticos e é o mais interessante e desafiador sob o ponto de vista acadêmico. Vem sendo produzido pelo homem há mais de 5000 anos. Durante esta longa história o volume e a diversidade de queijos produzidos têm aumentado, contando com mais de 500 variedades e, chegando

próximo a uma produção mundial anual de  $1,5 \times 10^6$  toneladas nos dias de hoje, representando 35% de todo o leite produzido no mundo (FOX et al., 2000). Como alimento é altamente nutritivo, apresentando uma imagem e uma aceitação positiva, sendo, ainda, utilizado como um ingrediente para outros alimentos.

A sua produção constitui-se numa das mais dinâmicas produção de alimentos, como pode ser verificado nas Figuras 7 e 8, e seu estudo abrange um amplo número de disciplinas, especialmente: físico-química, bioquímica, microbiologia, reologia, ciências sensoriais, biotecnologia e biologia molecular (QUAGLIA, 1992). Ao longo dos últimos 100 anos foi produzida uma grande e variada literatura sobre a ciência e tecnologia do queijo.

Dentre os muitos produtos lácticos, o queijo é o alimento que preserva por maior tempo de disponibilidade os seus valores nutricionais; em contrapartida, é biológica e bioquimicamente ativo e, como consequência, submetido a variações no sabor, no odor e na textura durante a estocagem, que é conhecida como a fase de maturação do queijo. Quando a produção e a maturação são bem dirigidas, ocorrem nos queijos uma bem orquestrada série de eventos bioquímicos que levam a obtenção de produtos com aromas e sabores altamente desejados (QUAGLIA, 1992).

A duração da maturação depende do sabor característico que se deseja no produto acabado e muitas variedades são os resultados de diferentes estágios de maturação, aos quais se atribuem diferentes denominações (SINGH et al., 2003).

### 2.3.1 A produção do queijo

A produção de todas as variedades de queijos, segue um protocolo de fabricação semelhante ao reproduzido na Figura 6. Enquanto que nas Figuras 7 e 8 estão representados todos os fatores que, de uma forma ou outra, afetam as características e a qualidade do queijo em cada etapa da fabricação.

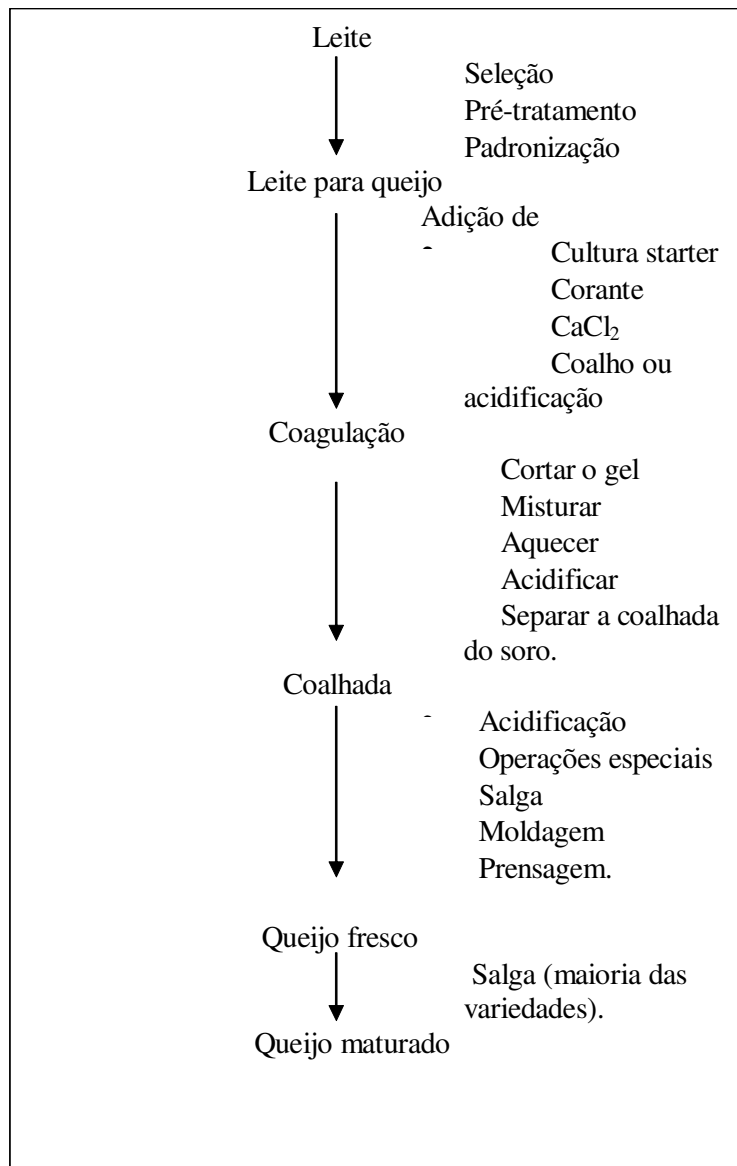


Figura 6 - Protocolo geral para a fabricação de queijos

Fonte: Adaptado de FOX et al., 2000, p. 11.

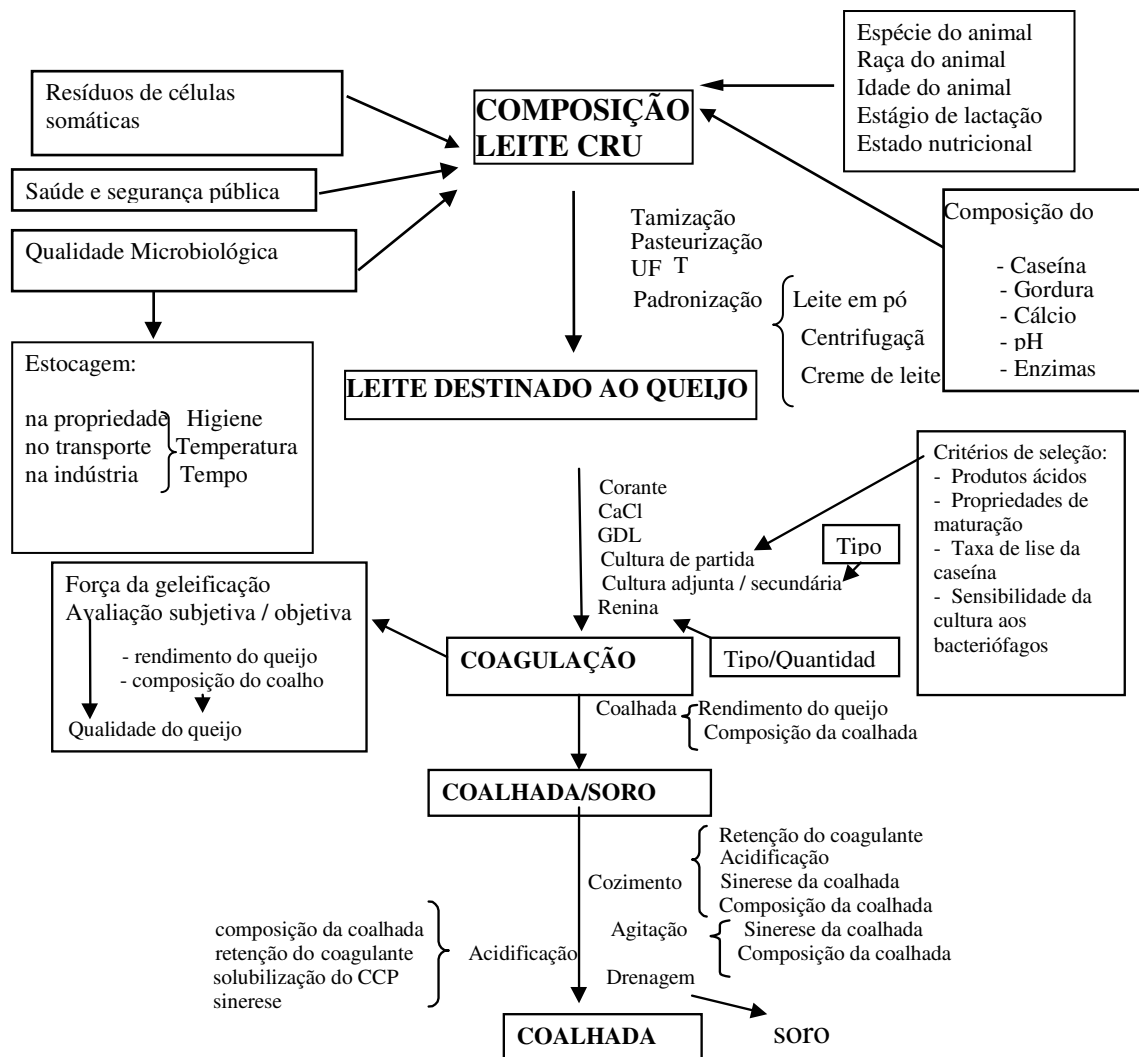


Figura 7 - Fatores associados ao leite, à formação da coalhada e à coalhada, que afetam as características e a qualidade do queijo.

Fonte: Adaptado de FOX et al., 2000, p. 342.

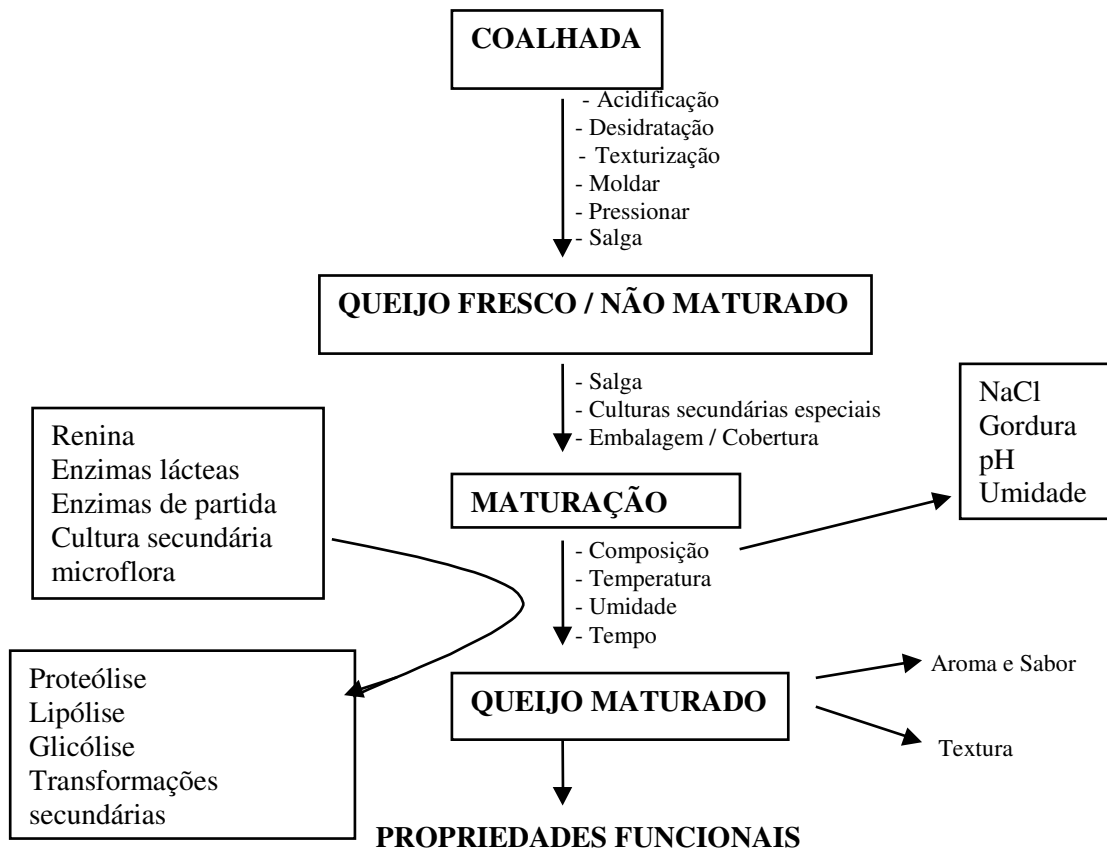


Figura 8 - Fatores que, depois de formada a coalhada, determinam as características e o tipo de queijo a ser fabricado, e/ou afetam a qualidade do queijo desejado durante a fabricação e a maturação.

Fonte: Adaptado de FOX et al., 2000, p. 342.

O queijo tem seu início de produção no momento em que o coalho é adicionado ao leite, com ou sem a adição de uma cultura de bactérias ácido lácticas (LAB). O papel das bactérias é garantir a coagulação pelo decréscimo do pH do leite. Isto é alcançado pela conversão da lactose em ácido láctico. Depois o soro é retirado e a coalhada pode ou não ser prensada e salgada.

O próximo estágio é a maturação, que ocorre em temperaturas baixas ou em temperaturas ambiente, por várias semanas, meses e, em alguns casos, anos. Neste estágio é que as enzimas bacterianas degradam lentamente os maiores componentes do leite, como as proteínas e as gorduras, produzindo substâncias que dão ao queijo sua estrutura característica, seu aroma e seu sabor. Portanto, a grande variedade de queijos deve-se à combinação de muitas variedades de bactérias que se encontram presentes nos queijos e que são específicas de cada produto (MARILLEY; CASEY, 2004).

### **2.3.2 A maturação do queijo**

A maturação, ou cura, corresponde à etapa de atividade biológica envolvendo reações enzimáticas de decomposição dos três componentes principais do leite, que ficam retidos no queijo (açúcar, proteína e gordura). Como consequência, o sabor, o aroma, a textura e a consistência são modificadas progressivamente devido aos inúmeros metabólitos gerados, até alcançar as características típicas de cada variedade (OLSON; MOCQUOT, 1985). Estas são determinadas pela proporção que se combinam os produtos primários e secundários das fermentações (MARILLEY; CASEY, 2004).

As enzimas responsáveis pelas transformações são provenientes do coalho (enzimas proteolíticas), dos microrganismos originalmente presentes no leite (principalmente nos queijos fabricados com leite cru), dos microrganismos constituintes da cultura ou fermento láctico adicionado, e de outros microrganismos

que crescem no interior ou sobre a superfície do queijo, além das enzimas intrínsecas do leite (FOX, 1993).

Os processos fermentativos são complexos e muito sensíveis a quaisquer mudanças, tanto na composição e qualidade da matéria-prima, como nas condições de processamento. Assim sendo, quando se trabalha com leite cru, cresce a dificuldade em se controlar a fermentação, ou cura do queijo, devido à incidência de microrganismos contaminadores secundários naturais e indesejáveis, que, embora dominados pelos microrganismos lácticos desejáveis, desempenham um papel complementar na cura dos queijos. Isto resulta numa maior dificuldade na padronização tecnológica dos queijos produzidos com leite cru, que podem apresentar uma maior incidência de defeitos e possíveis perdas devido a fermentações anormais, enquanto que no caso da utilização de leite pasteurizado, esses microrganismos contaminadores são destruídos. A pasteurização do leite e o uso adequado de culturas lácticas selecionadas ou fermento, têm contribuído de forma muito significativa para a melhoria da qualidade dos queijos em geral (NATH, 1993).

Estudos sobre o potencial da microflora nativa isolada de queijos, para produzir queijos com aroma e sabor especial, demonstraram que LAB selvagens podem produzir características sensoriais mais pronunciadas que os inóculos industriais (MARILLEY; CASEY, 2004)

O armazenamento de queijos, até que adquiram a consistência e a característica organoléptica adequada, incrementa significativamente os custos de produção; portanto, a possibilidade de reduzir este tempo através de métodos controlados de maturação acelerada, sem modificar o equilíbrio das características

organolépticas do produto, permite diminuir os custos e os riscos de defeitos provocados por fermentações anômalas (CHAPMAN; SHARPE, 1987).

Tem sido demonstrado claramente nos últimos 20 anos, que a utilização de um agente de maturação acelerada que não envolva bactérias ácidolácticas, ou suas enzimas, não produz os efeitos desejados (SODA, 1994).

A aceleração da maturação pode ocorrer com algumas ou muitas das reações envolvidas na maturação, mas é muito difícil acelerar todo o complexo conjunto de reações de maneira balanceada mantendo o equilíbrio de todas as qualidades do queijo (SINGH et al., 2003).

## 2.4 O PROCESSO DE MATURAÇÃO DE QUEIJOS

A maturação do queijo é um lento processo, que envolve uma série de reações microbiológicas, bioquímicas, e químicas (SOUSA et al., 2001).

Embora se perceba algumas diferenças já na coalhada, as mudanças quanto ao sabor, aroma, textura e aparência de cada variedade de queijo desenvolvem-se durante a maturação e são predeterminadas pelo processo de fabricação, quando se define a quantidade dos elementos de composição, algumas variáveis físico-químicas (em especial a quantidade de água, de sal, o pH), os microrganismos iniciadores (LAB) e os microrganismos não iniciadores ou culturas secundárias envolvidos (microrganismos adjuntos), que são microrganismos adicionados ao leite



com propósitos não acidulante, mas para atuarem na maturação do queijo (SINGH et al., 2003).

Ao observar o processo de maturação dos queijos constata-se que os parâmetros físico-químicos e microbiológicos continuamente sofrem e causam variações ao longo do processo. A seguir são descritas as principais variações.

### **2.4.1 Parâmetros físico-químicos**

A variação na maturação é fortemente influenciada pelos fatores físico-químicos como pH, atividade da água, potencial redox,

#### **2.4.1.1 Acidez e pH**

As transformações que ocorrem nas coalhadas estão condicionadas ao pH e à acidez, que em certos casos apresentam variações paralelas, e em outros não. A acidez total geralmente diminui durante a maturação dos queijos, devido a metabolização do ácido láctico, produzindo substância que contribuem ao seu buquê (ADDA, 1987; FOX et al., 1990).

A influência do pH sobre o desenvolvimento microbiano e, conseqüentemente, sobre a atividade enzimática é muito importante. Entre os microrganismos, unicamente as bactérias lácticas, as leveduras e mofos podem

desenvolver-se em pHs inferiores a 5,0 (ECK, 1990). Em geral, pHs inferiores a 4,5 reduzem notavelmente a atividade de muitas enzimas. As proteases microbianas, por exemplo, exibem atividade máxima em uma faixa de pH de 5,5-6,5 (CHOISY et al., 1990), enquanto que as lípases agem em intervalos de pH de 7,5-9,0 (ECK, 1990).

A evolução do pH durante a maturação é diferente para cada tipo de queijo, e reflete as transformações que ocorreram durante o processo. A coalhada dessorada apresenta valores de pH em torno de 5,5, aproximando-se a 7,0 no final da maturação, para os queijos de massa branda (KARAHADIAN; LINDSEY, 1987; LENOIR, 1963). Nos queijos de massa prensada, o pH permanece praticamente constante, em torno de 5,5.

O pH influi na determinação do sabor (ADDA et al., 1982), podendo determinar sabores amargos no queijo Cheddar, se a coagulação ocorrer a pHs inferiores a 4,95 (LAWRENCE; GILLES, 1969; LEMIEUX; SIMART, 1991). O pH está relacionado com a textura do queijo, que é determinada pelo grau de proteólise, a qual é mais extensa em pHs 5,5-6,5 (TRIEU-CUOT; GRIPON, 1982; VAN DEN BERG; EXTERKATE, 1993).

#### 2.4.1.2 Atividade da água ( $a_w$ )

A atividade de água ( $a_w$ ), definida como a razão entre a fração da pressão de vapor do queijo e a pressão de vapor da água pura, com valores de 0 a 1,0, é um fator determinante no crescimento microbiano (muitas bactérias requerem um valor

mínimo de 0,92 para crescerem) e nas transformações enzimáticas e químicas, contribuindo no desenvolvimento das características organolépticas e reológicas do queijo. A coagulação ácida, a desmineralização da caseína, o dessoramento, a salga, a evaporação da água durante a maturação e as reações bioquímicas, fundamentalmente hidrolíticas, são responsáveis pela diminuição da água livre (FERNÁNDEZ-SALGUERO et al., 1986; SCHLESSER et al. 1992).

O extrato seco (ES) influi nas características reológicas e regula indiretamente o curso da maturação. O conteúdo de extrato seco dos queijos varia de 25%, para os queijos de massa fresca, até 70% para os de massa dura. A intensidade da desidratação depende do tamanho e forma do queijo, assim como das condições ambientais nas quais se realiza a maturação (Fox et al., 2000).

A utilização de sal nos alimentos é tão antiga quanto a produção de alimentos, e a quantidade empregada depende do pH e da quantidade de água no alimento, geralmente menos de 10% é o suficiente. Nos queijos, a variação de sal é de 0,7 a 7,0%. A adição de sal influi na atividade da água ( $a_w$ ) e, conseqüentemente, no crescimento bacteriano (Fox et al., 2000).

#### 2.4.1.3 O potencial de oxidação e redução

Outro parâmetro é o potencial de oxidorredução ( $E_h$ ) que mede a capacidade química ou bioquímica do sistema de oxidar ou reduzir. No leite o  $E_h$  tem um valor em torno de +150 mV (estado oxidado); no queijo, o valor é em torno de - 250 mV (estado reduzido). O mecanismo para esta alteração no potencial redox não é claro,

mas está relacionado com a fermentação da lactose. Durante este processo o lactato é oxidado e convertido em acetato e CO<sub>2</sub>. Essa atividade de oxidação é dependente da população de NSLAB e da quantidade de O<sub>2</sub> e reduz a pequena quantidade de O<sub>2</sub> dissolvida na massa do queijo. Por esta razão, o queijo é um sistema essencialmente anaeróbico (SINGH et al., 2003).

#### 2.4.2 Transformações Bioquímicas na maturação de queijo

Uma mistura complexa de compostos orgânicos (Tab. 4) é produzida por vários mecanismos bioquímicos como a glicólise, proteólise e lipólise que ainda não estão completamente estudadas (SINGH ET AL., 2003).

**Tabela 4 - Compostos que geram sabor e aroma a partir dos principais constituintes do leite durante a maturação do queijo**

<b>Caseína</b>	<b>Gordura</b>	<b>Lactose e Citrato</b>
Peptídeos	Ácidos graxos	Lactato
Aminoácidos	Acetoácidos	Piruvato
Amônia	Metil cetonas	CO <sub>2</sub>
Piruvato	lactonas	Diacetil
Aldeídos		Acetoin
Álcoois		2-3 butanodiol
Ácidos carboxílicos		Acetoaldeídos
Compostos de enxofre		Ácido acético
		Etanol

Fonte: adaptado de FOX et al., 1995a.

#### 2.4.2.1 Glicólise

Os açúcares do leite, durante a fabricação dos queijos e a subsequente maturação, são usados pelas bactérias para produzirem ácidos orgânicos.

A lactose pode ser metabolizada por inúmeros microrganismos presentes no leite e nos queijos. O metabolismo da lactose segue duas rotas principais: a das hexoses-difosfato e a das pentoses-fosfato (FOX et al., 1990). Através da primeira via, a lactose transforma-se em ácido pirúvico, que pelo ciclo de Krebs é degradado a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O por ação dos microrganismos aeróbios. Porém a maior parte da lactose é degradada anaeróbicamente por bactérias lácticas homofermentativas (*lactococcus e lactobacilos*) a ácido láctico. Outros microrganismos lácticos, como os *leuconostocos* e os *lactobacilos* heterofermentativos, degradam a lactose pela via das pentoses-fosfato produzindo ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol e ácido acético. Durante o processo de elaboração de queijos, com exceção dos queijos de massa cozida em que ocorrem outros tipos de fermentações, geralmente ocorre a fermentação homoláctica (SINGH et al., 2003).

A maior parte da lactose do leite, cerca de 98%, é solubilizada e drenada com o soro, somente uma pequena porção fica retida na coalhada e é degradada pelos microrganismos lácticos. Essa é uma reação essencial que afeta a coalescência, a atividade das enzimas coagulantes, o desenvolvimento da flora coagulante e a retenção do cálcio. As perdas de cálcio e fosfato das micelas da caseína determinam a estrutura básica do queijo (LAWRENCE et al., 1983, 1987).

A velocidade de metabolização da lactose residual do queijo depende da relação sal/umidade (S/U), da temperatura, do pH e dos microrganismos envolvidos no processo. Segundo Thomas e Pearce (1981), queijos Cheddar com 4% e 6% de S/U apresentaram concentração de lactose residual de 0,1% e 0,6% e pH de 5,08 e 5,31 respectivamente.

#### 2.4.2.2 Lipólise

A gordura do leite, constituída basicamente por triacilglicerídeos, encontra-se sob a forma de glóbulos graxos com diâmetros entre 0,1-10 $\mu$ m (FOX et al., 2000).

A degradação da fração lipídica do queijo é produzida principalmente pela ação das lipases, que transformam os triacilglicerídeos em acilglicerídeos parciais e ácidos graxos livres. Estes podem permanecer no queijo, ou se transformarem em compostos como metil cetona ou álcoois secundários, substâncias que contribuem intensamente na exaltação do aroma no queijo (ADDA, 1987).

A maioria dos ácidos graxos livres tem origem da lipólise (DULLEY; GRIEVE, 1974; ASTON; DULLEY, 1982), mas alguns ácidos graxos de cadeia curta, como acético, propiônico e butírico, podem derivar da fermentação de hidratos de carbono ou da desaminação oxidativa de alguns aminoácidos (NAKAE; ELLIOT, 1965a, 1965b).

A lipase do leite é uma lipoproteína cuja concentração varia entre 1-2 mg/L (OLIVECRONA, 1979). No leite da vaca, se encontra ligada à caseína por ligações iônicas e interações hidrofóbicas, fazendo com que a sua atuação seja limitada.

As condições ótimas para a sua atuação são temperaturas entre 35-40°C e pH entre 8-9, sendo relativamente estável ao calor, já que para ser inativada, é necessário um tratamento de 78°C durante 15 segundos (DRIESSEN, 1989). O mecanismo de sua atividade lipolítica não é totalmente conhecido, mas se sabe que depende de vários fatores, entre os quais, a proporção de enzima retida na coalhada e o estado da membrana dos glóbulos de gordura.

A lipólise produzida pelas bactérias acidolácticas é muito limitada, já que suas lipases agem sobre mono e diacilglicerídeos pré-formados pelas lipases nativas do leite (STADHOUDERS; VERINGAS, 1973). A hidrólise é lenta e a concentração de ácidos graxos livres é escassa, conseqüentemente sua contribuição ao aroma do queijo não é importante (LAW, 1984; OLSON, 1990).

Em queijos fabricados a partir do leite não pasteurizado, pode ser importantes a presença de micrococos e estreptococos fecais, cujas lipases contribuem para o aroma dos queijos. Os micrococos possuem uma lipase intracelular ativa no intervalo de pH 5 - 6 e outra extracelular, ativa no intervalo de pH 8 – 8,5, capazes de atuarem sobre os triacilglicerídeos com ácidos graxos de cadeias curtas e longas. Além disso, possuem atividade de esterificação, que pode funcionar a pH entre 5-8 e concentrações de sal/umidade inferiores a 5%, liberando ácidos graxos de cadeia curta (BHOWMIK; MARTH, 1990). O *Streptococcus faecalis* apresenta uma lipase intracelular estável entre valores de pH de 6-8, com grande afinidade sobre triacilglicerídeos com ácidos graxos de cadeia curta (CHADER et al., 1979).

Fontes importantes de lipases ativas no leite e queijo são os microorganismos psicrófilos, capazes de crescerem a baixas temperaturas, que dominam a microflora do leite refrigerado, sendo os gêneros *Pseudomonas*, *Actinobacter*, *Aeromonas* os mais freqüentes. Suas lipases são estáveis aos tratamentos a que é submetido o leite graças à capacidade destas de adsorverem-se à superfície dos glóbulos graxos, concentrando-se nos queijos (FAIRBAIRN; LAW, 1986). Sua atividade máxima situa-se normalmente entre pH 7-9, apesar de apresentarem atividade ao pH do leite (FITZ-GERALD; DEETH, 1983) e de alguns queijo (LAW et al., 1976).

A produção de grandes quantidades de ácidos graxos livres, por essas enzimas, parece contribuir ao aparecimento do ranço durante o armazenamento do queijo, diminuindo a sua vida útil. Law e colaboradores (1976), em um estudo realizado sobre a maturação do queijo Cheddar e Kalogridou-Vassiliadou e Alichanids (1984), no queijo Télémé, observaram que quando a contagem de psicrófilos superava  $10^7$  ufc/mL apareciam estes defeitos. Deve-se considerar também que os microorganismos psicrófilos possuem grande variabilidade em sua capacidade de produzir lípases, portanto as contagens iniciais, podem não ser um bom índice para a medida do grau de lipólise (MARTIN-HERNÁNDEZ, 1991).

#### 2.4.2.3 Proteólise

Durante a maturação, a proteólise do queijo é catalisada por enzimas de procedências diversas, como: (1) coagulantes (quimosina, pepsina, microbianas ou proteinases ácidas de plantas); (2) do leite (plasmina, talvez catepsina D e proteinases das células somáticas); (3) dos inóculos iniciadores, LAB; (4) dos não



iniciadores, NSLAB; (5) de culturas secundárias (*P.camemberti*, *P. roqueforti*, *P. italicum*, *Propionibacterium sp*, *B.linens* e outros *coryneforms*) ou (6) proteínas ativas de origem exógenas (proteínases ou peptidases, ou ambas), adicionadas para acelerar a maturação (FOX; MCSWEENEY, 1996).

As bactérias lácticas produzem numerosas proteases e peptidases. O papel fisiológico dessas enzimas é liberar, a partir dos componentes nitrogenados do meio, os constituintes mais simples (AA) necessários para o crescimento dos microrganismos (PRITCHARD; COOLBEAR, 1993).

De acordo com Fox e McSweeney (1996) a degradação das proteínas produz:

- (a) mudanças na textura do queijo, devido à ruptura das cadeias de proteína, principalmente da  $\alpha_{s1}$ -caseína;
- (b) diminuição da atividade de água, devido à liberação de grupos carboxila e amina,
- (c) aumento do pH, devido à produção de  $\text{NH}_3$  por desaminação dos aminoácidos livres (AAL);
- (d) formação de compostos que contribuem diretamente no sabor como peptídeos e aminoácidos livres, podendo, quando há produção de peptídeos hidrofóbicos, originar sabor amargo e em alguns casos indesejável;
- (e) liberação de substâncias (AAL) que geram diversos compostos aromáticos por desaminação, descarboxilação, desulfuração, e outros
- (f) liberação lenta de compostos durante a mastigação (GIANETTE, 1979).

A proteólise pode ser resumida da seguinte forma: A hidrólise inicial da caseína é catalisada pela enzima coagulante, e em menor extensão, pela plasmina, pela catepsina D do leite e, possivelmente, por outras proteases lácticas que originam peptídeos grandes e médios, os quais serão posteriormente degradados pela ação de outras proteases e peptidases bacterianas. Em alguns queijos, como por exemplo: Muzzarela, Emmental Suíço e outros que sofrem processo de cozimento, o agente

proteolítico mais importante é a plasmina, que apresenta uma relativa resistência térmica, visto que as elevadas temperaturas desnaturam as enzimas coagulantes (BOUDJELLAB et al., 1994; MATHENSON, 1981; SING; CREAMER, 1990).

Para a  $\alpha_{s1}$ -CN, a principal responsável pela formação de grandes peptídeos é a quimosina, e para a  $\beta$ -CN, a principal responsável é a plasmina (SINGH et al., 2003). Durante a maturação do queijo, a produção de pequenos peptídeos e de aminoácidos livres (AAL) ocorre a partir da lise das células de LAB e NSLAB, fato que libera as peptidases responsáveis pela degradação dos grandes peptídeos para o meio; tornando, assim, as concentrações de pequenos peptídeos e de aminoácidos livres indicadores do estágio de maturação do queijo (CHAPOT-CHARTIER et al., 1994; CORSETTI et al., 1998; CROW et al., 1995; FOX, 1998; GAGNAIRE et al., 1998; GATTI et al., 1999, 2000; WILKINSON et al., 1994).

A ação da proteólise é diferente para cada variedade de queijo, dependendo da tecnologia utilizada, da adição ou não de culturas iniciadoras, da quantidade de culturas não iniciadoras e de outras enzimas ativas. A principal função das culturas iniciadoras é a de produzirem ácido láctico, causando uma diminuição do pH, e embora sejam essas bactérias fracamente proteolíticas, elas possuem um sistema proteinase/peptidases capaz de hidrolisar oligopeptídeos à pequenos peptídeos e aminoácidos (CHRISTENSEN et al., 1999; FOX; McSWEENEY, 1996; KUNJI et al., 1996; LAW; HAANDRILMAN, 1997).

#### 2.4.2.3.1 Aminopeptidases

As principais enzimas responsáveis pela liberação dos aminoácidos livres são as aminopeptidases. Os lactococos e lactobacilos associados ao leite geralmente possuem auxotrofia para entre seis a quatorze aminoácidos, portanto, são dependentes de um sistema proteolítico capaz de liberar os aminoácidos essenciais a partir da caseína e de seus peptídeos relacionados (CHRISTENSEN et al., 1999).

Os aminoácidos liberados podem contribuir para o sabor do queijo por si (Tabela 5), ou após transformações bioquímicas como transaminação, desidrogenação, descarboxilação e redução, produzindo uma ampla variedade de compostos com sabor (Tabela 4) (MARILLEY; CASEY, 2004).

Quando as LAB iniciadoras sofrem lise, liberam proteinases associadas à membrana celular (CEP, Lactocepina, Prt P), oligoendopeptidases intracelulares (Pep O e Pep F), pelo menos 3 aminopeptidases gerais (Pep N, Pep C, Pep G), glutamil aminopeptidase (PepA), pirolidona carboxil peptidase (PCP), leucil-aminopeptidase (Pep L), X-prolil-dipeptidil-aminopeptidase (Pep X), prolina-iminopeptidase (Pep I), aminopeptidase P (Pep P), prolinase (Pep R), prolidase (Pep Q), dipeptidases gerais (Pep V, Pep D, Pep DA) e triptidase geral (Pep T). Para que todo este sistema proteolítico ocorra é necessário que as LAB cresçam em alto número no leite, em torno de  $10^9 - 10^{10}$  ufc/mL (BOCKELMANN et al., 1995)

As enzimas com atividade aminopeptidásica mais importantes em bactérias ácidoláticas (LAB e NSLAB) e observadas na Tabela 6 são: PepC e PepN,

aminopeptidases gerais de baixa especificidade e PepA e PepI, enzimas com alta especificidade (PRITCHARD E COOLBEAR, 1993).

**Tabela 5 - Contribuição dos aminoácidos livres, ao sabor do queijo**

<b>Aminoácido</b>	<b>Sabor</b>	<b>Limiar de percepção (mg/L)</b>
Histidina	Amargo	200
Metionina	Amargo	300
Valina	Amargo	400
Arginina	Amargo	500
Isoleucina	Amargo	900
Fenilalanina	Amargo	900
Triptofano	Amargo	900
Leucina	Amargo	1900
Tirosina	Amargo	ND
Alanina	Doce	600
Glicina	Doce	1300
Serina	Doce	1500
Treonina	Doce	2600
Lisina	Doce e Amargo	3000
Prolina	Doce e Amargo	3000
Ácido Aspártico	Ácido	30
Ácido Glutâmico	Ácido	50
Asparagina	Ácido	1000
Glutamina	“insípido”	ND
Cisteína	--	ND
Glutamato de Sódio	“Umami”	300
Aspartato de Sódio	“Umami”	1000

Fonte: Adaptado de FOX et al., 2000.

Nota: ND - não determinado.

Aminopeptidases C (PepC) são cisteíno amino peptidases que possuem baixa especificidade, foram purificadas e caracterizadas de linhagens de *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lc lactis* e *S. thermophilus*. Possuem maior atividade sobre substratos de aminoácidos básicos (arginina, histidina e lisina), podendo apresentar atividade sobre substratos de aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), substratos de aminoácidos hidrofílicos não carregados (alanina e leucina) ou

aromáticos (fenilalanina) (CHRISTENSEN et al., 1999; PRICHARD; COOLBEAR, 1993).

**Tabela 6 - Aminopeptidases de Bactérias acidoláticas**

Peptidase	Substrato	microrganismo	kDa	estrutura
aminopeptidase Pec C	Gly, Met Arg, Lys Leu, Phe	<i>Lb. delbrueckii</i>	54	tetramero
		<i>Lb. delbrueckii</i>	51	ND
		<i>Lb. helveticus</i>	49	ND
		<i>Lb. helveticus</i>	51	ND
		<i>Lb. lactis</i>	50	hexamero
		<i>Lb. lactis</i>	50	ND
		<i>Lb. lactis</i>	50	hexamero
		<i>Lb. thermophilus</i>	50	hexamero
Aminopeptidase Pep N	Lys, Arg	<i>Lb. casei</i>	95	monomero
		<i>Lb. casei</i>	87	monomero
		<i>Lb. delbrueckii</i>	98	monomero
		<i>Lb. helveticus</i>	97	monomero
		<i>Lb. helveticus</i>	95	monomero
		<i>Lb. lactis</i>	78	monomero
		<i>Lb. sanfrancisco</i>	75	monomero
Aminopeptidase Pep A	Glu, Asp	<i>Lc. lactis</i>	40	hexamero
		<i>Lc. lactis</i>	43	trimero
		<i>Lc. lactis</i>	38	ND
		<i>Lc. lactis</i>	41	hexamero
Peptidase Pep L	Leu, Ala	<i>Lb. delbrueckii</i>		
Pro-iminopeptidase	Pro	<i>Lb. delbrueckii</i>	33	ND
		<i>Lb. helveticus</i>	34	dimero

ND – Não determinada

Fonte: CHRISTENSEN et al., 1999, p. 219-220.

Aminopeptidases N (PepN), que são classificadas como metaloenzimas de baixa especificidade, foram purificadas e caracterizadas de linhagens de *Lb casei*, *Lb delbrueckii*, *Lb helveticus*, *Lc lactis* e *S. thermophilus*. Em geral, a atividade de PepN é maior para aminoácidos básicos como lisina e arginina, seguidos pelos aminoácidos hidrofílicos sem carga leucina e alanina. Possuem pouca atividade em substratos com metionina e fenilalanina, e para os demais aminoácidos a atividade é

muito baixa ou não detectável (CHRISTENSEN et al., 1999; PRICHARD; COOLBEAR, 1993).

Amino peptidases A (PepA), também descritas como glutamil-amino peptidases, são metaloenzimas e foram purificadas e caracterizadas de várias linhagens de *Lc. lactis* e *S. termofilus*. PepA hidrolisam apenas resíduos N-terminais ácidos como glutamato e aspartato (CHRISTENSEN et al., 1999; PRICHARD; COOLBEAR, 1993).

Prolina-imino peptidases (PepI) são definidas pela especificidade da hidrólise da ligação de prolina no N-terminal. Serino peptidases com atividade de PepI foram purificadas e caracterizadas de linhagens de *Lb. delbrueckii* e *Lb. helveticus* (CHRISTENSEN et al., 1999; PRICHARD; COOLBEAR, 1993).

O conjunto de amino peptidases das bactérias acidolácticas atua em paralelo com um sistema de transporte da membrana, que permite às enzimas citoplasmáticas degradarem pequenos peptídeos até aminoácidos. Esse sistema permite que os microrganismos disponibilizem uma grande quantidade de aminoácidos, promovendo o desenvolvimento das próprias bactérias até altas densidades no interior do queijo (SOUSA et al., 2001).

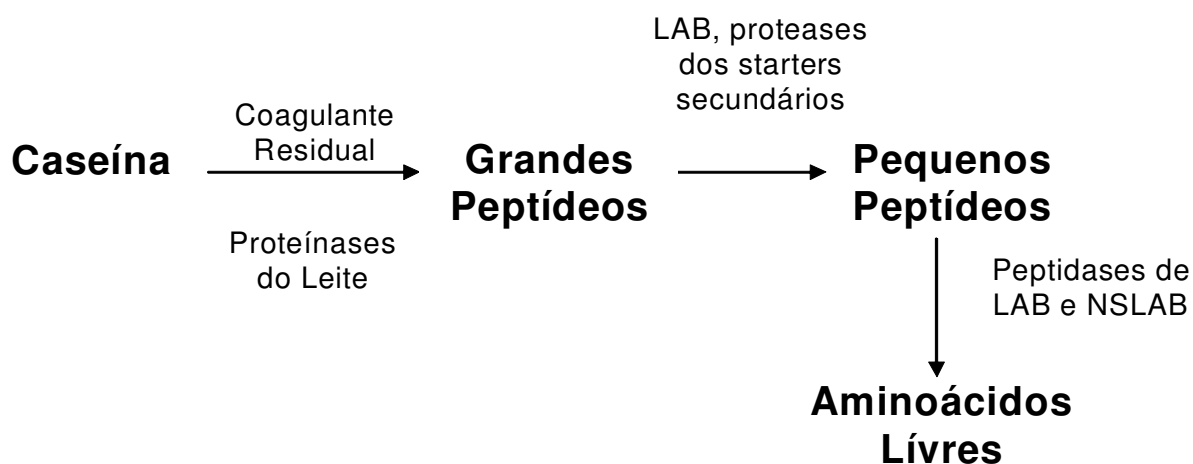
Com o prosseguimento da maturação dos queijos, a população das LAB iniciadoras diminui e a pequena população das bactérias acidolácticas casuais, não iniciadoras (NSLAB) torna-se a população bacteriana dominante na maturação do queijo (FOX et al., 1998; MARTHEY; CROW, 1993; PETERSON; MARSHALL, 1990). As NSLAB, mesmo estando presentes inicialmente em pequeno número (< 50 cfu / g no leite pasteurizado), crescem rapidamente e em 4 semanas podem

chegar aproximadamente a  $10^7$  ufc/g, mantendo este número relativamente constante a partir daí (FOLKERTSMA et al., 1996).

A atividade proteolítica das NSLAB produz peptídeos com massas moleculares semelhantes aquelas produzidas por LAB iniciadoras, além de aminoácidos livres (LANE; FOX, 1996; LYNCH et al., 1997; MUCHLENKAMP-ULATE; WARTHESEN, 1999; WILLIAMS; BANKS, 1997; WILLIAMS et al., 1998). A razão de se adicionar culturas de NSLAB ao leite para a fabricação de queijo é a de manipular o perfil de sabor do queijo e acelerar a formação quantitativa do sabor (FOX et al., 1998; FOX; TOBIN, 1999; MADKOR et al., 2000). Os critérios para a seleção de “adjuntos” não são bem definidos e freqüentemente a seleção é realizada a partir de queijos de boa qualidade, identificados pela avaliação sensorial (SOUSA et al., 2001).

Para isto é importante conhecer os sistemas de enzimas proteolíticas, peptidolíticas e lipolíticas das NSLAB que podem potencialmente contribuir para a realização do processo de maturação. É relativamente recente o particular interesse de investigar a caracterização de enzimas proteolíticas produzidas por linhagens de As perspectivas futuras para desenvolvimento tecnológico da produção de queijo incluem o conhecimento do sistema proteolítico, bem como o isolamento e a identificação dos mais significativos peptídeos de queijos produzidos em pequena quantidade e com geografia restrita (SOUSA et al., 2001), duas características do queijo artesanal Serrano.

NSLAB isoladas de queijos (KUNJI et al., 1996; CHRISTENSEN et al., 1999).



**Figura 9 - Esquema geral da proteólise durante a maturação de queijos**  
 Fonte: SOUSA, 2001, p. 328.

Nota: LAB: bactérias acidolácticas; NSLAB: bactérias acidolácticas não iniciadoras.

### 2.4.3 Os principais microrganismos envolvidos na maturação do queijo

As características como consistência, textura, aroma e sabor do queijo, desenvolvidos durante a produção e maturação, devido às alterações dos componentes do queijo, são catalisadas por enzimas oriundas de várias espécies de microrganismos da cultura láctica iniciadora (LAB), e da microflora secundária do queijo (BHOWMIK; MARTH, 1990).

Os processos bioquímicos que se desenvolvem ao longo da elaboração do queijo dependem da composição qualitativa e quantitativa da microflora acompanhante (DILANJAN, 1984). A flora microbiana é variável, especialmente quando o queijo é produzido a partir do leite cru, uma vez que em seu meio há simbioses e antibioses (SINGH et al., 2003).



O conhecimento da flora microbiana envolvida na maturação é essencial para uma uniformidade na produção dos queijos, visando garantir aos consumidores um produto com alto padrão de qualidade (GÓMEZ et al., 1989). Para estudar a microbiologia dos queijos é necessário enumerar e isolar os principais grupos de bactérias presentes no leite, na coalhada e no queijo em maturação. A avaliação das funções de cada grupo microbiano na maturação de um determinado queijo depende da viabilidade de multiplicação deste, nas condições químicas e físico-químicas do queijo, durante o longo período de maturação (CHAPMAN; SHARPE, 1987).

#### 2.4.3.1 As culturas lácticas

Em geral são utilizados cinco gêneros nas culturas iniciadoras, e nas culturas adjuntas ou secundárias do queijo: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Todas as LAB usadas como iniciadoras são: Gram positivas, catalase negativas, não moveis e não formam esporos (FOX et al., 2000).

Para determinar os tipos de culturas que poderão ser usados na produção de um determinado queijo, alguns fatores devem ser levados em consideração de forma a criar as condições que permitam o melhor desempenho das linhagens como: o intervalo de temperatura ideal no processo de maturação, a necessidade de aberturas para a produção de gás, a aeração para as culturas que necessitam de ar, a quantidade de sal que as culturas suportam e os efeitos de proteólise e lipólise causados pelas culturas e pela lise das células nas condições de processo estabelecidas (Pritchard e Coolbear, 1993).

A primeira função das culturas iniciadoras é a acidificação do leite através do processo de fermentação da lactose para ácido láctico. Os principais critérios aplicados na seleção das culturas iniciadoras são: a resistência aos fagos, a capacidade de crescer e apresentar alta densidade de células no leite, a produção de ácido na temperatura de manufatura do queijo, e a compatibilidade entre as diferentes variedades (CROW et al., 1993). Como culturas iniciadoras são, usualmente, utilizadas *Lc. lactis sp lactis*, *Lc. lactis sp cremoris*, *S. thermophilus*, e *Lactobacillus sp* (CROW et al., 1993).

Outro grupo de culturas são as culturas secundárias. As culturas secundárias compreendem as bactérias lácticas não iniciadoras (NSLAB), que crescem no interior da maioria dos queijos, e outras bactérias, leveduras e fungos que crescem no interior ou na superfície dos queijos e são característicos de uma variedade de queijo (MARTLEY, CROW, 1993). Muitos trabalhos foram apresentados descrevendo a utilização de culturas adjuntas em queijos; em muitas delas são incluídos diferentes lactobacilos ou misturas de diferentes lactobacilos mesófilos e termófilos; destaca-se entre os mesófilos *Lb. casei sp casei*, *Lb casei sp pseudopantarum*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. paracasei*, e entre os termófilos, utilizados na elaboração de queijos cozidos, *Lb. helveticus*, *Lb bulgaricus*, *Lb acidophilus*, *Lb delbruckii sp bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Leuconostoccus*. (GATTI, et al., 2000)

Algumas das culturas secundárias podem, ainda, ser utilizadas para criar um sabor específico no queijo; e entre elas encontram-se as *Propionobactérias* como *P. acidipropionici*, *P. freudinreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *Penicillium roqueforti*, *brevibacterias*, entre outras (GATTI, et al., 2000).

Em queijos produzidos a partir de leite cru estão presentes *Enterococcus* como *E. faecium*, *E. faecalis*, estes microrganismos, além de contribuírem no sabor do queijo, produzem antibióticos com forte atividade anti listeria servindo de controle contra a *L. monocytogenes*. (ENNAHAR, DESCHAMPS, 2000).

Antigamente, a fermentação da lactose do leite para a fabricação do queijo, dependia de bactérias ácido lácticas ocasionais (NSLAB) existentes na microflora natural do leite (CHAPMAN; SHARPE, 1987). A inoculação ou reforço da microflora natural era comum, e procedia-se através da adição e mistura de uma pequena fração do produto acabado, da coalhada ou do soro ao leite cru possibilitando, assim, enriquecer o leite fresco com aqueles microrganismos desejáveis que estivessem contidos na fermentação anterior (LEITE et al., 1997).

Atualmente, bactérias viáveis são adicionadas ao leite que será processado na fabricação do queijo com a finalidade de melhorar a conservação, a segurança e as características sensoriais, elas são denominadas culturas “starter” ou iniciadoras (LAB), culturas adjuntas ou culturas secundárias. Na indústria de produtos lácteos, as bactérias acidolácticas têm sido empregadas como culturas iniciadoras (BALDUINO et al., 1999).

Com o desenvolvimento da microbiologia, os microrganismos desejáveis foram isolados, selecionados e mantidos em culturas puras para serem usadas no preparo de culturas lácticas ou fermentos selecionados. Isso deu origem a processos fermentativos mais rápidos, seguros e constantes, permitindo uma melhor padronização dos produtos, principalmente com relação a sabor e aroma. A escolha da cultura é feita tomando-se como base um produto de excelente qualidade obtido

pela fermentação natural, do qual se procura isolar a flora dominante responsável pela boa fermentação (OLIVEIRA, 1986).

A seleção de culturas lácticas é uma etapa de grande importância no processo de fabricação de queijos, e fator indispensável para a obtenção de um produto de boa qualidade (FURTADO et al., 1990; MOR-MUR et al., 1994; TZANETAKI; TZANETAKIS, 1992). Vedamuthu e Reinbold (1967) citam que a cultura láctica é o ingrediente mais importante utilizado na fabricação dos queijos.

### 3 AS CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO

Os queijos artesanais serranos, estudados nesse trabalho de pesquisa são elaborados na Serra do Nordeste do Rio Grande do Sul, em altitudes de aproximadamente 900 m do nível do mar, numa zona fria e úmida durante grande parte do ano.

Como são maturados em salas não climatizadas, a temperatura e a umidade relativa de maturação estão sujeitas às variações climáticas do período do ano em que são produzidos os queijos. Conforme a média dos últimos dez anos, no verão as temperaturas variam, respectivamente, de 20 a 22<sup>o</sup>C e a umidade relativa de 74 a 79% e no inverno de 10 a 13<sup>o</sup>C e de 78 a 82%.<sup>1</sup>

Os queijos são produzidos por famílias rurais do município de Caxias do Sul (RS), moradoras na localidade de Criúva, que fazem parte do Programa de Agroindústria Familiar da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul. Estes produtores possuem queijarias construídas em formato retangular, totalmente em alvenaria, paredes revestidas com azulejo e piso com lajota, internamente são divididas em 3 ambientes: a sala para a coagulação e formatação dos queijos, a sala para a maturação, e, na entrada, uma peça para vestiário e higiene pessoal.

Os equipamentos para o processamento dos queijos (tanque de coagulação, prensa, pia e mesa) são de aço inoxidável, as formas de plástico e as

---

<sup>1</sup> FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Equipe de agrometeorologia. Dados de temperatura e umidade relativa coletados na Estação Meteorológica de Caxias do Sul, 2001 (Informação Verbal).

prateleiras da sala de maturação de madeira aplainada; constituindo-se numa boa estrutura para a elaboração de queijo.

A assistência técnica também é constante, pois, periodicamente, os técnicos da Secretaria Municipal da Agricultura de Caxias do Sul realizam encontros e viagens técnicas com os produtores, onde são discutidos assuntos gerais e procedimentos de boas práticas de fabricação (BPF).

O queijo é produzido a partir do leite inteiro e não pasteurizado e de vacas de origem mista (Jersey e Holandesas), em formato redondo e retangular, com massa que pode variar de 1 kg a 2,5 kg. A salga é realizada diretamente no leite antes de dar início ao processo da coagulação (4 – 18 g/L).

O processo de coagulação ocorre em tanques retangulares de aço inoxidável. O leite é aquecido a 35<sup>0</sup> C, é adicionado um coalho comercial contendo, como agente coagulante, predominantemente pepsina bovina sólida (Faprol, poder coagulante 1:65.000), na proporção de 1cm<sup>3</sup> para 100 L de leite ( $\pm$  4g), (Figura 10, esquema de fabricação do queijo artesanal serrano).

O coalho antes de ser adicionado é dissolvido em meio copo de água e sal e, após a adição, o leite é agitado por 2 minutos e permanece em repouso por 45 a 60 minutos em 35<sup>0</sup> C para a formação da coalhada. Ainda no tanque, a coalhada é cortada e realiza-se o dessoramento, ou retirada da maior parte do soro em temperatura de 35 a 38<sup>0</sup> C. A massa é retirada do tanque e prensada manualmente e, já livre do soro, é colocada em formas plásticas de formato redondo ou retangular, e prensadas com pesos de 8 a 12 kg para cada 3 formas por 12 horas em média, etapa em que a coalhada é compactada e o resíduo de soro ainda existente é retirado.

Após as primeiras 12 horas de prensagem, os queijos são retirados das formas, virados e recolocados nas mesmas por mais 12 a 20 horas. Como etapa final, os queijos são retirados das formas e colocados na sala designada para o período de maturação (Figura 10). As famílias produzem 10 a 20 kg de queijo por dia, totalizando em média 6,0 toneladas/mês de queijo serrano, que são vendidos nas feiras da região.

O procedimento de produção descrito foi elaborado a partir das informações sobre as etapas de produção adotadas pelos diferentes produtores, observou-se que os processos de elaboração eram muito semelhantes para todos eles. Representando um fato positivo para a caracterização de um queijo artesanal.

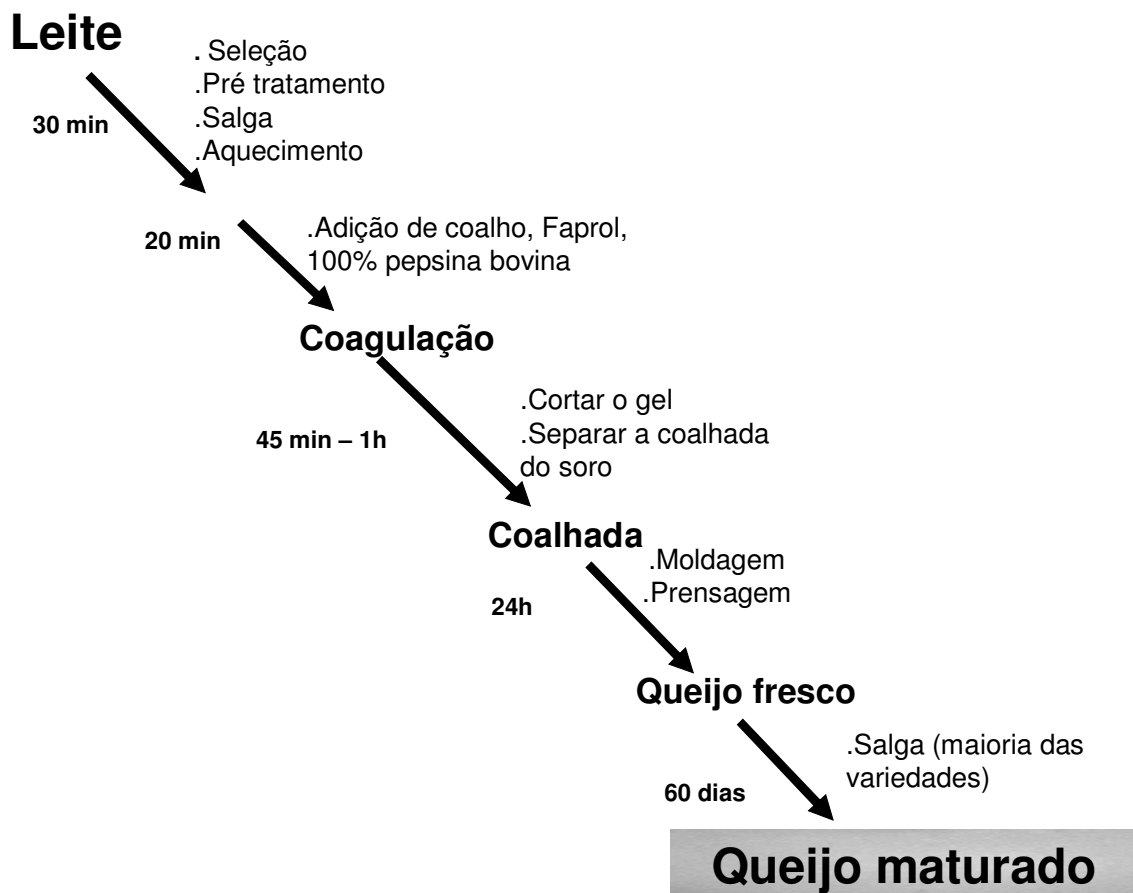


Figura 10 - Etapas da produção de queijo artesanal serrano

### 3.1 EVOLUÇÃO DOS GRUPOS DE MICRORGANISMOS DURANTE A ELABORAÇÃO E MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO.

Os resultados apresentados por Souza (2002), com os dados obtidos de 3 produtores resumidamente foram:

Na contagem dos distintos grupos microbianos investigados constatou-se um aumento de uma unidade logarítmica (log) do leite para a coalhada, considerado um aumento normal para queijos elaborados com leite cru (MEDINA et al., 1992; Tornadijo, 1995).

As contagens máximas para a maioria dos grupos microbianos foram atingidas pelos queijos com sete dias, nos dois períodos do ano, e, em geral, após a primeira semana de maturação observou-se uma diminuição do número de cfu. A amplitude deste decréscimo variou entre as diferentes populações dos microrganismos e de uma estação climática para outra. A variação no inverno foi de 1 unidade log do 7º para o 60º dia de maturação e a variação no verão durante o mesmo período foi de 2 unidades log.

Os lactobacilos não diminuíram a partir do 7º dia, permanecendo constantes durante os 60 dias, nas duas épocas do ano; sugerindo que os mesmos são importantes na determinação das propriedades do Queijo Serrano.

Diferenças significativas, associadas ao período do ano, ao longo da elaboração e da maturação foram observadas apenas nas contagens dos halotolerantes (*Micrococcaceas*) e bolores, mostrando que as condições ambientais durante a cura influenciaram na evolução desses dois grupos de microrganismos. Os



bolores apresentaram valores menores no inverno, provavelmente devido às menores temperaturas. Os halotolerantes apresentaram contagens menores no verão devido, provavelmente, à atividade da água.

Outra observação importante foi que na maturação das amostras de inverno a população microbiana interrompeu seu crescimento, permanecendo constante até o final da maturação, enquanto que as amostras de verão apresentaram decréscimo significativo ao longo do período de maturação.

Quanto a evolução das bactérias lácticas encontradas no Queijo Serrano, os lactobacilos foram o grupo microbiano mais abundante, representando 74% das bactérias lácticas isoladas, seguido pelos enterococos e lactococos, cada um com aproximadamente, 12,5% dos isolados e os leuconostoc representaram 1% das bactérias lácticas.

Os lactobacilos dominaram ao longo de todo o período de maturação, principalmente nas etapas finais do processo, sugerindo que estes microrganismos desempenham uma importante função na produção deste queijo e poderiam fazer parte da sua cultura láctica e participar do desenvolvimento do sabor e aroma do Queijo Serrano, devido as suas atividades proteolíticas (LÓPEZ-DIAS, 2000).

Ainda, segundo Souza (2002), a baixa proporção de lactococos e leuconostoc nos isolados lácticos do Queijo Serrano deve ser atribuída à adição de sal no leite, inibindo o crescimento desses microrganismos que são sensíveis ao sal, enquanto que os lactobacilos são mais resistentes (SHARP, 1979; LÓPEZ; MAYO, 1997).

## 3.2 EVOLUÇÃO DOS PARÂMETROS QUÍMICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DURANTE A ELABORAÇÃO E A MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO

Os parâmetros químicos que receberam a atenção no trabalho de Souza (2002) foram as quantidades de proteína, de lipídeos, de lactose, de sal, de cinzas e de água; os físico-químicos foram o pH, a  $a_w$  e a acidez titulável.

### 3.2.1 Evolução do pH e da acidez titulável

Os valores de pHs nos leites estavam entre 6,71 e 6,66, portanto de acordo com Tronco (1997) normais para leite fresco, o mesmo acontecendo com a acidez titulável que apresentou valores de 0,2% de ácido láctico. Na coalhada os valores (6,3-6,4) do queijo Serrano correspondem ao de um queijo obtido por coagulação enzimática (FOX et al., 2000). Durante a primeira semana de maturação o pH baixou, atingindo os menores valores de todo o processo, 5,3 no verão e 5,1 no inverno.

No verão o pH aumentou a partir da primeira semana atingindo valores de pH 5,8 na quarta semana e estabilizando a partir de então; no inverno estabilizou a partir da primeira semana, permanecendo com valores de pH 5,2.

Os valores dos pHs durante a maturação do queijo Serrano, principalmente no verão, favorecem a ação das proteases microbianas, que nos queijos apresentam atividades máximas no intervalo de pH entre 5,5-6,5 (FOX,

1993), sendo, portanto, a fração protéica a principal responsável pelas características de sabor, aroma e textura desse queijo.

Quanto a acidez, apresentou uma diminuição da primeira para a quarta semana nos queijos de verão, possivelmente atribuíveis aos bolores e as leveduras que utilizam o ácido láctico como uma fonte de carbono e ou do processo de proteólise que libera grandes quantidades de compostos nitrogenados alcalinos (FOX, 1993; TORNADIJO, 1995; ESTEPAR, 1999).

### **3.2.2 Evolução da atividade da água ( $a_w$ ) e do teor de umidade**

Todos os queijos perdem certa quantidade de água durante o seu processo de elaboração e maturação, sendo as maiores perdas durante a dessoragem e prensagem.

No verão a atividade da água ( $a_w$ ) apresentou um declínio constante e significativo durante as primeiras seis semanas para estabilizar-se a partir do 42º dia de maturação. Já no inverno a  $a_w$  permaneceu constante até o 28º dia, diminuindo deste para o 42º dia, estabilizando até o fim do processo. A variação da  $a_w$  nos dois períodos não foi significativa (de 0,98 para 0,95 no verão e de 0,99 para 0,97 no inverno).

O conteúdo de umidade dos queijos diminuiu continua e intensamente ao longo do processo, no inverno e no verão, como conseqüência da evaporação da água. Esta perda foi muito rápida devido ao pequeno tamanho dos queijos, que

aumenta a relação superfície/volume, e ao não controle da temperatura e da umidade relativa do ar das salas de maturação, o que favorece a perda de umidade (PRIETO et al., 1994). O valor médio (27,6%) da umidade dos queijo de 60 dias no verão é muito baixo. As variações da umidade foram de 57,3 para 32,9 no inverno e de 50,8 para 27,6 no verão.

### **3.2.3 Evolução do teor de sal e de cinzas**

No processo de elaboração do Queijo Serrano o sal é adicionado ao leite, antes da coagulação inibindo o crescimento de bactérias lácteas e favorecendo a distribuição de sal na coalhada e a retração do coágulo (TORNADIJO et al., 2001).

O teor de sal e o teor de cinzas dos queijos permaneceram constantes ao longo do processo de elaboração e maturação nos dois períodos analisados, e, são uniformemente distribuídos na massa do queijo.

O baixo conteúdo de sal observado no queijo Serrano pode ser devido à perda de sal durante a drenagem do soro. A concentração de sal na fase aquosa (valor médio de 2,4% no verão e 2,1% no inverno) das amostras de queijo ao longo do processo de maturação não foi suficiente para inibir o crescimento dos grupos microbianos.

O conteúdo de sal é distinto para os três produtores, pois cada um deles adiciona diferentes quantidades de acordo com o próprio gosto.

### **3.2.4 Evolução do teor de lactose**

A lactose, no queijo Serrano, sofre uma rápida degradação durante os primeiros 7 dias de maturação e desaparece completamente aos 14 dias, no verão, e aos 28 dias no inverno. Este fato coincide com o decréscimo do pH e o aumento da acidez no mesmo período. Corroborando com a idéia que se deve ao metabolismo das bactérias lácticas, que fermentam a lactose a ácido láctico.

### **3.2.5 Evolução dos teores de proteína e de gordura**

A evolução da proteína (como nitrogênio total) e da gordura ao longo da maturação do queijo Serrano, expressos como porcentagem de sólidos totais, não mostrou variações significativas tanto no inverno quanto no verão. No verão o conteúdo em proteína aos 60 dias foi de 45,2% no extrato seco (ES) e o de gordura de 46,5% ES, no inverno 48,0% ES de proteína e 42,4% ES de gordura.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a variação da atividade proteolítica durante a maturação, para selecionar possíveis culturas iniciadoras para o estabelecimento de um padrão na produção do queijo artesanal Serrano, de forma a que ele venha a ter características bem definidas e reprodutíveis.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizações microbiológicas, química, e físico-química dos queijos;
- b) Estudo dos microrganismos envolvidos nos processos de maturação do queijo Serrano, quanto às atividades proteolíticas potencialmente envolvidas;
- c) Identificação e caracterização de proteases ativas na coalhada e nas diferentes etapas da maturação, com ênfase no estudo de aminopeptidases;
- d) Correlacionar as principais atividades proteolíticas encontradas com a flora bacteriana em etapas da maturação dos queijos.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ESCOLHA DOS PRODUTORES

Em agosto de 2000 deu-se início a primeira etapa do trabalho realizando junto aos produtores um levantamento sobre seus processos de fabricação (Apêndice A), na época eram 8 agroindústrias, hoje já são 13, produzindo em média 6 toneladas/mês de queijo Serrano.

A partir destas informações observou-se que seus processos de elaboração de queijo eram muito semelhantes, fato que confere um aspecto positivo para a caracterização de um queijo artesanal.

Dos treze atuais produtores rurais, foram selecionados três em agosto de 2000, designados A, B e C, respectivamente, por apresentarem as produções mais significativas, elaborarem o queijo Serrano há vários anos e por possuírem processos produtivos semelhantes.

Tendo em vista a maior atividade aminopeptidásica dos queijos do produtor A, este foi selecionado para estudos mais detalhados, como é indicado para este tipo de trabalho (FOX et al., 2000). Os extratos dos microrganismos isolados das amostras dos queijos do mesmo produtor, produzidos no verão após 28 e 60 dias de maturação, também foram analisados quando à atividade aminopeptidásica para realizar a correlação ou não com as atividades presentes nos respectivos queijos.

## 5.2 PRODUÇÃO DOS QUEIJOS

Os queijos que serviram de amostra para este trabalho foram elaborados segundo a tecnologia tradicional de fabricação artesanal como descrito nas características do Queijo Artesanal Serrano, em três fazendas diferentes, pelos três produtores rurais da zona de produção.

Os produtores realizaram seis bateladas de queijos, 3 de verão e 3 de inverno; de cada batelada foram manufaturados 5 queijos de massa aproximada de 1 Kg que foram maturados em tempos distintos, representando várias etapas do processo de maturação: coalhada, 7, 14, 28, 42 e 60 dias. Para cada produtor foram coletadas 12 amostras, duas coalhadas e 10 queijos, totalizando 36 amostras.

As bateladas foram produzidas e maturadas em dois períodos distintos do ano, um caracterizado por temperaturas altas, janeiro a março (verão) e outro caracterizado por temperaturas baixas, junho a agosto (inverno).

No dia da elaboração das peças de queijo foram coletadas amostras da coalhada e amostras do leite utilizado para a fabricação do queijo.

## 5.3 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de leite foram coletadas em garrafas de vidro estéreis, com capacidade para 600 mL, com o auxílio de uma concha inox estéril, logo após a ordenha e diretamente dos tarros de leite com previa homogeneização.



As amostras de coalhada foram coletadas, no momento em que a massa estava sendo colocada nas formas, com o auxílio de uma colher de inox estéril, em garrafas de vidro estéreis com previa identificação.

As amostras de queijos foram colocadas em sacos plásticos estéreis que foram em seguida selados e identificados.

Todas as amostras foram acondicionadas em banho de gelo num recipiente isotérmico imediatamente após a coleta, transportadas para o laboratório sob temperatura de refrigeração (0-4<sup>0</sup>C). No laboratório foram conservadas em refrigerador e mantidas na temperatura de 0 a 4<sup>0</sup>C por um tempo que não ultrapassou as 18 horas antes das análises microbiológicas.

As amostras de queijo maturadas no verão foram coletadas no período de 30 de janeiro a 31 de março de 2001, e as maturadas no inverno de 1<sup>o</sup> de julho a 30 de agosto de 2001.

#### 5.4 MICRORGANISMOS

Neste trabalho foram estudados, quanto ao perfil de atividade de aminopeptidases, os microrganismos disponíveis das amostras de queijos de verão com 28 e 60 dias de maturação do produtor A:

a) *Lactobacillus sp.* lotes nº 121 a 139 dos isolados do queijo com 28 dias de maturação (L-28);

b) *Lactobacillus sp.* lotes nº 181 a 185 e 199 dos isolados do queijo com 60 dias de maturação (L-60);

c) *Enterococcus sp.* lotes nº 196 e 197 dos isolados do queijo com 60 dias de maturação (E-60).

## 5.5. O ESTUDO DA AÇÃO PROTEOLÍTICA NOS QUEIJOS DOS PRODUTORES A, B, C

### 5.5.1 Instalações

O processamento das amostras, a preparação de soluções, as análises químicas e as determinações de atividade enzimática e aminopeptidásicas em substratos aminoacil- $\beta$ -NA derivados foram realizadas no Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Biotecnologia do ICTA - UFRGS.

### 5.5.2 Material de Laboratório

Os reagentes utilizados foram das marcas Merck®, Sigma® e Fisher®.

A formulação e o procedimento de preparo das soluções estão descritos no apêndice-D.

### 5.5.3 Amostras

#### 5.5.3.1 Preparação das amostras

Após a retirada da amostra para a análise microbiológica, procedeu-se como descrito em Souza (2002), ou seja: o restante das amostras de coalhada e queijo foram processadas num triturador de alimentos (Arno modelo Pic-Lig/Brasil) e divididas em porções de 20-30g que foram acondicionadas em sacos plásticos selados, com identificação e guardadas no freezer a -20°C para posterior análise físico-química e para o estudo das atividades enzimáticas com ênfase nas atividades aminopeptidásicas.

#### 5.5.3.2 Preparo da fração de proteína solúvel (FPS)

Foram pesados 10g de queijo triturado, que fora descongelado lentamente em geladeira e mantido a 4°C. Esta massa de queijo foi homogeneizada em 100mL de tampão fosfato 20mM, pH 6,5, com 0,02% de NaN<sub>3</sub> (proporção 1:10) durante duas horas a 4°C e com agitação constante. Após este tempo a mistura foi centrifugada a 10000 g por 30 minutos à 4°C em rotor SS34 Sorvall. Do operado obtêm-se três frações: a primeira, que é o resíduo, contendo a fração de proteína

insolúvel (FPiS); a segunda, que é o sobrenadante aquoso, contendo a fração de proteína solúvel (FPS); e a terceira, que é o sobrenadante lipídico, contendo a fração gordurosa. A lâmina de gordura foi retirada por filtração com Gaze estéril umedecida, e os volumes da FPS foram ajustados. Após realizou-se diálise dos extratos em membrana com corte de 10 kDa contra o tampão determinado de extração.

#### 5.5.3.3 Conservação dos extratos da FPS

Após a diálise as FPS de todas as amostras foram liofilizadas e colocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  após determinação da massa do liofilizado.

#### 5.5.3.4 Preparação dos extratos da FPS para os ensaios de atividade enzimática de proteases

Na primeira etapa, para os ensaios de atividade enzimática, a massa de 100 mg do liofilizado da FPS foi solubilizada em 5 mL de água, A suspensão foi dialisada em membrana com corte de 10 kDa, contra o tampão de extração.

#### 5.5.3.5 Preparação dos extratos da FPS para os ensaios de atividade enzimática de aminopeptidases

Para os ensaios de atividade aminopeptidásica foi solubilizada a massa de 100 mg do liofilizado da FPS em 5 mL de tampão fosfato de sódio (NaPB) 20 mM, em dois diferentes valores de pH: 7,0 e 5,5 (suspensão do liofilizado sem  $\text{NaN}_3$ , a pH 7,0 e a pH 5,5). As suspensões foram dialisadas em membrana com corte de 10 kDa, contra o tampão de solubilização, até ausência total de  $\text{NaN}_3$ .

#### **5.5.4 Determinação de atividade caseinolítica (proteólise primária)**

Para o ensaio da atividade de proteases foi utilizado como substrato uma solução de caseína a 2,5% dialisada (método I). A mistura de incubação continha 200  $\mu\text{L}$  da amostra, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,5 M, pH 6,5 e 100 $\mu\text{L}$  de caseína básica a 2,5 % e dialisada. Após, a mistura foi incubada por 16 horas a 37<sup>o</sup> C, ao término do tempo foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de Tricloro acético (TCA) 10%, centrifugada a 4000 g por 5 minutos, retirado 700  $\mu\text{L}$  da solução e completado o volume a 1mL com NaOH 2 M.

Como referência foi preparada igual mistura, à qual foi adicionada 250  $\mu\text{L}$  de TCA 10 % no tempo zero de incubação, foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos, tomando-se, igualmente, uma alíquota de 700  $\mu\text{L}$  e adicionado 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 M.

A seguir leu-se em  $A_{280}$  nm, em cubetas com passo óptico de 1 cm, no espectrofotômetro U 2001-Hitachi.

Para o ensaio de ação endógena ou determinação da atividade proteolítica da amostra sobre si mesma, foi realizado o ensaio na ausência da caseína (método II), A mistura de incubação continha 200  $\mu\text{L}$  da amostra, 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{L}$  do

tampão e para a determinação da ação enzimática, procedeu-se como no método I. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que causa um acréscimo de  $A_{280}$  em 1 hora (RAKSAKULTHAL et al., 2002).

Todos os ensaios foram realizados em duplicata com uma base mínima de diferença significativa e o nível de significância foi de 5%.

### **5.5.5 Determinação da atividade aminopeptidásica em substratos aminoacil- $\beta$ -NA**

Nesta técnica foi explorada a atividade amidásica das enzimas existentes nos extratos solúveis dos queijos (FPS). A atividade enzimática foi avaliada usando 1.05 mM de substratos sintéticos  $\beta$ -naftilamidas derivados: glicil- $\beta$ NA, L-Tyr- $\beta$ NA, L-Asp- $\beta$ NA, L-Arg- $\beta$ NA, L-Leu- $\beta$ NA para as aminopeptidases (Sigma®). Esta atividade é também denominada “atividade arilamidásica”. O ensaio da atividade arilamidásica, é realizado incubando-se em tubo de ensaio a amostra, contendo a fração de proteína solúvel (FPS) do queijo, com um substrato cromogênio, aminoacil-beta-naftilamida (aminoacil- $\beta$ NA), por um tempo de 30 minutos e a uma temperatura de 37<sup>o</sup> C. A reação é interrompida pela diminuição do pH do meio e a  $\beta$ -naftilamida, formada pela ação enzimática, reage com um reagente de acoplamento, resultando no desenvolvimento de uma coloração de intensidade variável do alaranjado ao vermelho. Os dois objetivos são alcançados adicionando-se uma solução do reagente de Garnet, contendo 0,5 mg do sal por mL de uma solução de acetato de sódio 0,2M, pH 4,2 e 10 % de Tween 20, ao tubo de ensaio (BARRET, 1972).

As condições do ensaio foram: 600  $\mu\text{L}$  de tampão, 50  $\mu\text{L}$  de substrato, 50  $\mu\text{L}$  de amostra e complementação para 750  $\mu\text{L}$  com água; para cada ensaio é realizado um branco; todos os tubos são incubados e ao término dos 30 minutos adicionou-se à solução 250  $\mu\text{L}$  do reagente de Garnet. Os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 4 minutos e os ensaios lidos em  $A_{525}$  nm contra água. A leitura é convertida em nmols de  $\beta$ -NA a partir de uma curva padrão de  $\beta$ -NA, em cubeta com passo óptico de 1 cm, no espectrofotômetro U 2001- Hitachi.

A unidade de atividade aminoacil- $\beta$ -NA (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ NA/hora, nas condições do ensaio (MAGBOUL; McSWEENEY, 1999).

### **5.5.6 Determinação do Conteúdo protéico**

Dois métodos foram utilizados para a determinação do conteúdo protéico nas amostras:

#### **5.5.5.1 Método Espectrofotométrico**

Absorção no ultravioleta em 280 nm de amostras previamente dialisadas, utilizando-se cubetas de quartzo com passo óptico de 1 cm.

#### 5.5.5.2 Método de Bradford

Método de Bradford: Para tal, utilizou-se 2,5 mL do reagente de Bradford para um volume máximo de 50  $\mu$ L de amostra. Após 30 minutos de reação à temperatura ambiente, foi feita a leitura de absorvância a 595 nm. Como referência, foi utilizada uma curva padrão de albumina bovina (BSA), na faixa de 5 a 50  $\mu$ g (BRADFORD, 1976).

### 5.6 DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS LIVRES NOS QUEIJOS DO PRODUTOR A

A identificação e a quantificação dos aminoácidos livres dos queijos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas em um cromatógrafo Perkin-Elmer 785<sup>a</sup> UV-VIS com injetor automático, uma bomba PE Série 200, uma interface PE Série 900 e um desgaseificador a vácuo PE Série 200, segundo o procedimento descrito por Alonso et al. (1994), com algumas modificações (NHUCH, 2000, p. 90).

A separação dos diferentes aminoácidos foi realizada em uma coluna Ultrasphere octadecil (ODS), com partículas de 5 $\mu$ m de diâmetro, da Beckman com 4,6 mm de diâmetro e 25 cm de comprimento. As curvas do coeficiente de regressão



analítico ficaram próximas da unidade ( $r^2 = 0.9998$  a  $0.9979$ ). Os resultados foram processados por TurboChrom™ 4.0 software.

### 5.6.1 Reativos

- a) Solução de ácido perclórico 0,6 N;
- b) Solução de hidróxido de potássio 30% (p/v);
- c) Solução diluente preparada com fosfato ácido dissódico 5mM, com pH ajustado para 7,4 com ácido fosfórico a 10% (p/v) e acetonitrila, qualidade HPLC, em proporção 19:1 (v/v);
- d) Solução derivatizante: Etanol, Trietilamina, água, e fenilisotiocianato em proporções 7:1:1:1 (v/v);
- e) Metanol HPLC;
- f) Fase móvel A: acetato de sódio – ácido acético 0,23 M, pH 6,65 e acetonitrila HPLC em proporções 94:6 (v/v);
- g) Fase móvel B: 60% acetonitrila HPLC e 40% água HPLC (v/v).

### 5.6.2 Extração dos aminoácidos livres

Usando o método Pico-Tag (Waters, Milford MA, USA) para a preparação das amostras, foram homogeneizados 5 g e queijo com 50 mL de uma solução de ácido

perclórico 0,6 N, durante 5 minutos em um Potter. A mistura foi centrifugada a 1790 g durante 20 minutos e o sobrenadante foi filtrado para a retirada da fração lipídica da parte superior através de um papel filtro Whatman Nº 54. O filtrado teve seu pH corrigido para  $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$  com a solução de hidróxido de potássio 30% (p/v) e foi resfriado a 2°C durante 10 minutos. Ao termino deste tempo, os extratos obtidos foram filtrados, para retirar os sais formados, através de filtros Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro e são guardados em um congelador a - 30°C até sua análise (TAVARIA et al., 2003).

### **5.6.3 Derivatização das amostras**

Foram tomados 0,4 mL dos extratos dos queijos com 28 e 42 dias e 0,3 mL dos extratos do queijo com 60 dias obtidos conforme descrito anteriormente, que foram secados em corrente de nitrogênio e temperatura de 37°C. Uma vez evaporada toda a solução foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  do agente derivatizante. Procurando misturá-lo convenientemente com a amostra; deixou-se durante 20 minutos a temperatura ambiente. Ao termino deste tempo, se evaporou com nitrogênio, se suspendeu a amostra em um volume de 800  $\mu\text{L}$  da solução diluente e se centrifugou (2000 g) em uma microcentrífuga Eppendorf 5414 durante 5 minutos. Finalmente, se procedeu a injeção de 20  $\mu\text{L}$  da amostra assim preparada no cromatógrafo.

#### 5.6.4 Preparação dos padrões

Prepararam-se soluções padrões (Sigma) de concentração 12,5 mM de tirosina e 25 mM dos demais aminoácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), glutamina (Gln), serina (Ser), asparagina (Asn), glicina (Gly), histidina (His), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), valina (Val), metionina (Met), cisteína (Cys), leucina (Leu), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), triptofano (Trp), e lisina (Lys). Com estas soluções procedeu-se da mesma maneira que se procedeu com as amostras de queijos (derivatização) e foram preparadas as curvas de calibração utilizando diferentes concentrações de cada aminoácido para a quantificação dos mesmos.

#### 5.6.5 Desenvolvimento cromatográfico

A coluna, durante o desenvolvimento cromatográfico, ficou à temperatura ambiente e o comprimento de onda ( $\lambda$ ) do detector a 254 nm.

As condições cromatográficas seguidas (composição da fase móvel ao longo do tempo e fluxo) aparecem na Tabela que segue. As mudanças e o gradiente foram realizados linearmente para as etapas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e na etapa 2 as mudanças seguiram uma curva de gradiente côncava.

**Tabela 7 - Desenvolvimento cromatográfico para a análise dos aminoácidos**

etapas	minutos	% fase A	% fase B	fluxo (mL/min)
1	0	100	0	0,9
2	5	100	0	0,8
3	20	78	22	0,75
4	40	54	46	0,8
5	42	0	100	1
6	43	0	100	1
7	44	100	0	1
8	46	100	0	1,5
9	47	100	0	0,9

Nota: Eluente A: 94:6 (v/v) de acetato de sódio anidro (11,48 g em 1 l de H<sub>2</sub>O, pH = 6,65) e acetonitrila (grau HPLC). Eluente B: 40:60 (v/v) H<sub>2</sub>O (grau HPLC).

**Tabela 8 - Tempo médio de aparecimento dos picos para os diferentes aminoácidos**

AMINOÁCIDO	MÉDIA	DESVPAD	DESVMÉD
Asp	4,85	0,19	0,15
Glu	5,62	0,10	0,07
Ser	10,69	0,15	0,12
Gly	11,95	0,16	0,13
His	16,88	0,20	0,18
Arg	17,45	0,24	0,21
Thr	18,24	0,20	0,17
Ala	19,37	0,21	0,18
Pro	21,35	0,22	0,17
Tyr	27,53	0,39	0,35
Val	28,21	0,32	0,24
Met	29,66	0,19	0,13
Ile	31,84	0,35	0,19
Leu	32,53	0,39	0,23
Phe	36,20	0,33	0,19
Trp	37,56	0,31	0,16
Lys	39,34	0,22	0,14

Resultados obtidos de 12 injeções dos padrões.

## 5.7. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA Q-SEPHAROSE

### 5.7.1 Cultivo dos microrganismos

Os microrganismos isolados a partir das amostras de queijo foram cultivados em meio MRS (Man-Rogosa-Sharpe) à 37°C, pH 6,0, por 16 h em um pré-inóculo de 30 mL, depois adicionado em 500 mL do mesmo meio, e cultivado em condições anaeróbias à 37°C até OD<sub>650</sub> entre 1,0 e 1,4. As bactérias foram separadas por centrifugação a 6.000g por 20min a 4°C, lavadas com água destilada, liofilizadas e armazenadas à -20°C.

### 5.7.2 Extratos aquosos das células dos microrganismos

Para preparação dos extratos, as células foram suspensas em tampão de extração (NaPB 20mM, pH 6,5) e lisadas por ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710 series; Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, Ill.) com 3 pulsos de 30 segundos, seguindo-se a centrifugação à 10.000g, por 10 min e 4°C em rotor da centrífuga Eppendorf e os sobrenadantes foram submetidos a diálise em fita com corte de 10 kDa contra o mesmo tampão.

### **5.7.3 Procedimento para a cromatografia de troca iônica - Q-Sepharose**

Alíquotas dos extratos dialisados foram aplicadas em resina Q-Sepharose (Amersham), equilibrada com tampão NaPB 20mM, pH 7,5 na proporção de 1 unidade de  $A_{280}$ /mL de resina. A resina e a amostra foram misturadas em um Becker, mantidas sob agitação em banho de gelo por no mínimo 2 h, sendo então a mistura colocada em um funil de placa porosa para realização da cromatografia. A retirada das proteínas não retidas pela resina foi feita com o tampão de equilíbrio (NR). Em seguida, procedeu-se a eluição das proteínas retidas adicionando-se ao tampão de equilíbrio NaCl para um gradiente descontínuo: 1ª Eluição - NaCl 150 mM, 2ª Eluição - NaCl 300 mM, e 3ª Eluição - NaCl 500 mM. O conteúdo de proteína recuperado em cada etapa da cromatografia foi monitorado por  $A_{280}$ , analisando-se a atividade aminopeptidásica para cada fração.

### **5.7.4 Atividade arilamidásica nos extratos dos microrganismos e em suas frações após cromatografia de troca iônica**

Nesta técnica foi explorada a atividade arilamidásica das aminopeptidases existentes nos extratos solúveis nos microrganismos L28, L60 e E60. Como substratos utilizaram-se os aminoacil- $\beta$ -naftilamidas: L-Arg- $\beta$ NA, L-Leu- $\beta$ NA, L-Glu- $\beta$ NA, L-Pro- $\beta$ NA, L-Lys- $\beta$ NA (Sigma®). O ensaio da atividade arilamidásica é

realizado incubando-se a amostra com o substrato cromogênico (aminoacil- $\beta$ -NA) por um tempo de 30 minutos e a uma temperatura de 37<sup>0</sup> C. A reação é interrompida pela diminuição do pH do meio e a beta-naftilamina ( $\beta$ -NA), formada pela ação enzimática, reage com uma molécula de acoplamento, resultando no desenvolvimento de produto com coloração alaranjado que absorve a 525 nm. Os dois objetivos são alcançados adicionando-se o reagente de Garnet (0,5 mg/mL), preparado em tampão 0,2 M acetato de sódio, pH 4,2 com 10 % de Tween 20, aos tubos de ensaio (BARRET, 1972).

As condições do ensaio foram: 600  $\mu$ L de tampão, 50  $\mu$ L de substrato, 50  $\mu$ L de amostra e água para volume final de 750  $\mu$ L. Ao término dos 30 minutos adicionou-se à solução 250  $\mu$ L do reagente de Garnet, seguindo-se a leitura a 525nm contra água. A leitura é convertida em nmols de  $\beta$ -NA a partir de uma curva padrão de  $\beta$ NA, em cubeta com passo óptico de 1 cm, no espectrofotômetro U 2001-Hitachi.

A unidade de atividade arilamidásica específica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de  $\beta$ NA/hora, nas condições do ensaio.

## 5.8 ELETROFORESE

Foram realizadas eletroforeses em géis (8 x 10cm, 1,5 mm de espessura) de poliacrilamida a 10% em condições desnaturantes com 0,1 % de sodio dodecil sulfato

(SDS-PAGE) dos extratos brutos e das frações da cromatografia de troca iônica, quando foram também aplicados aos géis pertinentes marcadores de peso molecular: 97, 66, 45, 30, 22 kDa,. As eletroforeses foram corridas a 4°C de acordo com Laemmli (1970). Os géis foram corados para detecção de proteína com Coomassie blue (SDS-PAGE).

Para detecção da atividade enzimática, foi utilizando o protocolo descrito a seguir como zimograma. Foram realizadas eletroforeses em géis (8 x 10cm, 1,5 mm de espessura) de poliacrilamida a 10% (PAGE), em condições não desnaturantes, sem detergente (SDS), dos extratos dos queijos e dos microrganismos selecionados que foram corridas a 4°C de acordo com Laemmli (1970).

## 5.9 ZIMOGRAMA

### 5.9.1 Queijos

Amostras de 10 g de cada queijo foram triturados e homogeneizados em 100 mL de NaPB 20 mM, pH 6,5 por duas horas, a 4°C e agitação constante. A suspensão foi centrifugada a 10.000g, por 30 min e 4°C em rotor SS34 da centrífuga Sorvall. O sobrenadante foi filtrado em gaze umedecida, resultando em um extrato límpido, que foi dialisado em fita com corte de 10 kDa contra o mesmo tampão.



### **5.9.2 Microrganismos**

Os microrganismos para o zimograma foram preparados da mesma forma que no item **5.7.2**

### **5.9.3 Determinação da atividade arilamidásica nos zimogramas**

Para detecção da atividade arilamidásica após a eletroforese, os géis foram cortados obtendo-se tiras das canaletas das amostras; cada tira de gel foi então fracionada a cada 2,5 mm; cada fração de gel foi colocada em um tubo eppendorf, adicionando-se tampão NaPB pH 6,5 em uma concentração final de 15 mM e o substrato para detecção da atividade aminopeptidásica, na concentração final de 60  $\mu$ M, totalizando um volume final de 1 mL. As frações de gel foram incubadas por 24h a temperatura ambiente, em seguida, a  $\beta$ NA formada difundida para o meio foi lida em placa de ELISA em SpectraMax a 525 nm, utilizando 160  $\mu$ L do meio reacional e 25  $\mu$ L de solução de Garnet.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A apresentação dos resultados desta tese está organizada em forma de capítulos assim constituídos:

Capítulo 1. Evolução das características microbiológicas e físico-químicas durante a elaboração e maturação do queijo Serrano. (ANEXO B – ARTIGO).

Capítulo 2. Caracterização de atividades enzimáticas, com ênfase em aminopeptidases, em queijo Serrano.

## 6.2 ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS

### 6.2.1 Atividade caseinolítica

Os resultados dos ensaios realizados por nós para a avaliação da atividade caseinolítica, que representa a proteólise primária após a elaboração do queijo, não foram significativos; provavelmente pelas razões apresentadas por Fox e MacSweeney (1996) em que o coalho constituído por pepsina bovina apresenta menor estabilidade; porém, os valores de  $A_{280}$  verificados nos extratos (FPS) indicaram alta proteólise primária nos queijos o que é característico em queijos com baixos níveis de sal (IRIGOYEN et al., 2002) e com maior quantidade de gordura (FENELON; GUINNEE, 2000), duas características dos queijos em estudo e que favorece a ação de enzimas responsáveis pela formação de pequenos peptídeos e aminoácidos livres (SOUSA et al., 2001; TAVARIA et al., 2003); assim, para a avaliação do processo de maturação dos queijos, foram considerados os resultados das atividades secundárias através da verificação de atividades arilamidásicas.

### 6.2.2 Atividades arilamidásicas de aminopeptidases

O estudo das aminopeptidases ativas, no primeiro momento, visou descobrir o produtor cujos queijos apresentassem a maior atividade arilamidásica sobre os

substratos aminoacil- $\beta$ NA testados, utilizando, para tanto, substratos que representassem os diferentes grupos de cadeias laterais dos aminoácidos (Asp  $\beta$ -NA, Leu  $\beta$ -NA, Arg  $\beta$ -NA, Tyr  $\beta$ -NA) e o substrato Gly  $\beta$ -NA e encontram-se nas Tabelas 9, 10, com os maiores resultados na Tabela 13.

Para obter informações da influência do meio nas atividades, estas foram avaliadas em pH 5,5 (Tabelas 9), que é um pH muito próximo do pH dos queijos e pH 7,0 (Tabelas 10), valor considerado ideal para a atividade de muitas enzimas.

**Tabela 9 - Atividade total de aminopeptidases a pH 5,5, em  $\mu$ mol de  $\beta$ -NA /h (U), da fração de proteína solúvel (FPS) de 1g do extrato seco (ES) do queijo Serrano.**

Amostra		FPS	Substratos				
		mg P/g Q	Asp $\beta$ -NA	Leu $\beta$ -NA	Arg $\beta$ -NA	Tyr $\beta$ -NA	Gly $\beta$ -NA
<b>Coalhada</b>							
Verão	Produtor A	26	<b>19</b>	0	<b>74</b>	<b>19</b>	<b>45</b>
	Produtor B	17	2	0	3	2	5
	Produtor C	26	4	2	6	1	1
Inverno	Produtor A	15	6	6	1	4	3
	Produtor B	26	4	9	9	4	5
	Produtor C	46	2	2	2	3	3
<b>Q 14 dias</b>							
Verão	Produtor A	19	5	<b>18</b>	5	4	6
	Produtor B	9	2	0	4	1	4
	Produtor C	24	1	1	0	0	1
Inverno	Produtor A	9	9	3	2	2	2
	Produtor B	25	3	0	8	4	14
	Produtor C	8	2	2	7	7	8
<b>Q 28 dias</b>							
Verão	Produtor A	8	0	2	<b>20</b>	7	10
	Produtor B	9	1	0	1	0	1
	Produtor C	29,7	0	4	1	0	3
Inverno	Produtor A	14	11	<b>60</b>	7	11	<b>30</b>
	Produtor B	44	0	0	0	<b>18</b>	1
	Produtor C	10	2	3	5	5	5

Nota: FPS – fração de proteína solúvel (FPS) determinada pelo método de Bradford em mg de proteína · g<sup>-1</sup> do ES do queijo. Destacados em negrito os maiores resultados, levando em consideração o período do ano e o pH do ensaio

**Tabela 10 - Atividade total de aminopeptidases a pH 7,0, em  $\mu\text{mol}$  de  $\beta\text{-NA}$  /h (U), da fração de proteína solúvel (FPS) de 1g do extrato seco (ES) do queijo Serrano.**

Amostra		FPS mg P/g Q	Substratos				
			Asp $\beta\text{-NA}$	Leu $\beta\text{-NA}$	Arg $\beta\text{-NA}$	Tyr $\beta\text{-NA}$	Gly $\beta\text{-NA}$
<b>Coalhada</b>							
Verão	Produtor A	26	2	2	3	0	0
	Produtor B	17	0	0	0	1	0
	Produtor C	26	<b>23</b>	11	19	5	8
Inverno	Produtor A	15	7	5	5	0	0
	Produtor B	26	0	0	0	0	0
	Produtor C	46	1	1	2	0	1
<b>Q 14 dias</b>							
Verão	Produtor A	19	0	0	0	0	0
	Produtor B	9	0	0	0	0	0
	Produtor C	24	8	6	3	1	2
Inverno	Produtor A	9	3	3	3	0	1
	Produtor B	25	0	0	0	0	1
	Produtor C	8	0	0	0	0	0
<b>Q 28 dias</b>							
Verão	Produtor A	8	1	2	1	0	0
	Produtor B	9	0	0	0	0	0
	Produtor C	30	2	1	1	0	1
Inverno	Produtor A	14	1	2	1	0	1
	Produtor B	44	0	0	0	0	0
	Produtor C	10	1	1	1	0	0

Nota: FPS – fração de proteína solúvel determinada pelo método de Bradford em mg de proteína · g<sup>-1</sup> do ES do queijo. Destacado em negrito os maiores resultados, levando em consideração o período do ano e o pH do ensaio.

Observando os resultados das atividades arilamidásicas totais (Tabelas 9 e 10) verifica-se que a atividade das FPS apresentou maiores valores quando em pH

5,5 e nos queijos de verão. Dos três produtores destacou-se o produtor A, que nas atividades específicas e nas atividades totais apresentou, quando não os maiores resultados, bons resultados para quase todos os extratos (valores sinalizados).

Os resultados das atividades totais (Tabelas 9, 10) variam com o pH, o período de produção das coalhadas e dos queijos, e com o produtor.

Para os diferentes substratos os melhores resultados que estão sinalizados em negrito nas Tabelas 9 e 10 foram colocados na Tabela a seguir:

**Tabela 11 - Apresentação dos maiores resultados obtidos para cada substrato em  $\mu\text{mol de } \beta\text{NA h}^{-1} (\text{U}) \cdot \text{g}^{-1}$  de ES de queijo; indicando o período em que foi maturado o queijo e o pH do ensaio.**

<b>Substrato</b>	<b>Produtor</b>	<b>Atividade específica (FPS)</b>	<b>pH</b>	<b>Período</b>	<b>Valor U</b>
<b>Asp <math>\beta</math>-NA</b>	C	Coalhada	7,0	Verão	23
	A	Q 14 dias	5,5	Verão	19
<b>Leu <math>\beta</math>-NA</b>	A	Q 28 dias	5,5	Inverno	60
	A	Q 14 dias	5,5	Verão	18
<b>Arg <math>\beta</math>-NA</b>	<b>A</b>	Coalhada	5,5	Verão	74
	A	Q 28 dias	5,5	Verão	20
<b>Tyr <math>\beta</math>-NA</b>	A	Coalhada	5,5	Verão	19
	B	Q 28 dias	5,5	Inverno	18
<b>Gly <math>\beta</math>-NA</b>	A	Coalhada	5,5	Verão	45
	C	Q 28 dias	5,5	Inverno	30

Uma vez verificado que o produtor A apresentou os maiores resultados, completou-se o estudo da atividade peptidásica até o fim da maturação, ou seja 60 d (Tabela 12). Os resultados revelam que, para os queijos de verão, as maiores atividades ocorrem na coalhada e no queijo de 14 dias, enquanto que, para os queijos de inverno, as maiores atividades ocorrem no queijo de 28 dias, e, a partir de então, as atividades se mantêm com valores mais elevados, quando comparadas com os queijos de verão para todos os substratos utilizados, até o tempo máximo de maturação (60 d).

**Tabela 12 - Atividade específica de aminopeptidases a pH 5,5, em  $\mu\text{mol}$  de  $\beta\text{-NA}$  /h (U), da fração de proteína solúvel (FPS) de 1g do extrato seco (ES) dos queijos do produtor A até a maturação de 60 d.**

Amostras	Substratos				
	Asp $\beta\text{-NA}$	Leu $\beta\text{-NA}$	Arg $\beta\text{-NA}$	Tyr $\beta\text{-NA}$	Gly $\beta\text{-NA}$
<b>Verão</b>					
Coalhada	19	0	74	19	45
Q. 14 d	5	18	5	4	6
Q. 28 d	0	2	20	7	10
Q. 42 d	3	1	1	1	1
Q. 60 d	3	1	1	1	1
<b>Inverno</b>					
Coalhada	6	6	1	4	3
Q. 14 d	9	3	2	2	2
Q. 28 d	11	60	7	11	30
Q. 42 d	5	3	2	2	4
Q. 60 d	5	2	1	2	1



### 6.3 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS AMINOÁCIDOS LIVRES (AAL) NAS AMOSTRAS DOS QUEIJOS DO PRODUTOR A

Como os queijos do produtor A apresentaram os maiores resultados nas atividades aminopeptidasicas, eles foram selecionados para a continuidade do estudo e para a correlação com a sua flora bacteriana.

Durante a proteólise, após a ação da enzima coagulante que leva a formação dos produtos primários (polipeptídeos) segue a formação dos produtos secundários como médios e pequenos peptídeos e eventuais aminoácidos livres (AAL) pela ação de peptidases e aminopeptidases (DESMAZEAUD; GRIPON, 1977). A proteólise leva a produção de substâncias que são importantes para o sabor e aroma, ou servem como precursoras de substâncias aromáticas (ADDA et al., 1982). Certos AAL são extremamente importantes no desenvolvimento do aroma e sabor, como Arg que é relevante para o sabor amargo, enquanto Pro, Ser e Asn são relacionados com o sabor adocicado (IZCO; TORRE, 2000), os aminoácidos estão também associados à fração volátil do queijo (SALLES et al., 2000).

Considerando as afirmações acima, foram realizadas as análises de aminoácidos livres (AAL) nos queijos do produtor A, a partir do tempo médio (28 dias) até o período final da maturação para este estudo (60 dias). Na Tabela 8 estão representados os tempos médios de retenção de cada aminoácido, com o respectivo desvio padrão e desvio médio.

Os resultados na Tabela 13 e nas figuras 12 e 13 mostraram que o aminoácido Glu encontra-se em maior quantidade com 20 a 25% nas amostras de inverno e 14 a 20% nas amostras de verão, 28 e 60 dias de maturação

respectivamente. Os outros AAL presentes em quantidades significativas foram: Arg, Asp, Leu, Lys, Pro, Trp, Ala, em ordem decrescente para os queijos de inverno, e Arg, Lys, Ala, Trp, Leu, Pro, Asp em ordem decrescente para os queijos de verão, todos com mais de 5% do total de AAL aos 60 dias de maturação.

Os AAL Glu, Arg, Leu, Lys e Pro representam 58% do total de AAL nos queijos de inverno e 61% nos queijos de verão.

Muitos queijos foram avaliados quanto à presença de AAL durante a maturação (BARCINA et al., 1995; FREITAS et al., 1998; FRESNO et al., 1993; GONZÁLEZ DE LLANO et al., 1991; MARCOS; MORA, 1982).

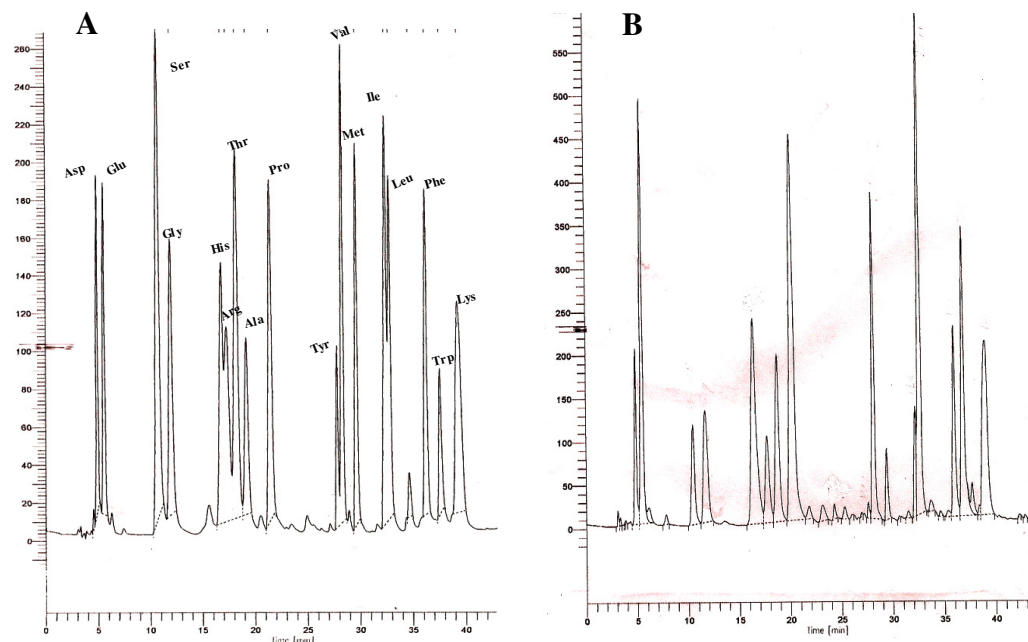
Os AAL com maior quantidade no queijo Serena foram Leu, Val, Lys e Arg; o queijo Idiazábal, aos 12 meses de maturação apresentava 1300 mg AAL 100g<sup>-1</sup> de ES de queijo e os AAL dominantes foram Glu, Val, Leu e Phe (BARCINA et al., 1995). O queijo Manchego típico apresentou 1.728mg 100g<sup>-1</sup> de ES, Cheddar 1.592mg 100g<sup>-1</sup> de ES, Edam 1.056mg 100g<sup>-1</sup> de ES, Romano 650mg 100g<sup>-1</sup> de ES (FERNÁNDEZ-SALQUERO; SANJUÁN, 1999). O queijo Serra da Estrela apresentou 3.250mg 100g<sup>-1</sup> de ES (TAVARIA et al., 2003).

Como se pode observar o valor em AAL do queijo Serra da Estrela é o que mais se assemelha aos valores em AAL do queijo Serrano (Tabela 13 e Figuras 12 e 13), valor atribuído, segundo Tavaría et al. (2003), há uma grande atividade peptidásica e ao desenvolvimento da microflora. Outra semelhança entre os dois queijos foi a presença do Glu como o AAL de maior quantidade.

Na Tabela 14 é apresentada a evolução em percentual dos AAL de maior relevância nas etapas de maturação e que, a partir destes resultados, foram levados

em consideração neste estudo, nela constata-se que os queijos de inverno apresentaram um percentual de acréscimo de uma etapa para a outra maior que os de verão. Observa-se, também uma desaceleração na etapa de 42 para 60 dias, mas com mais intensidade no período de verão.

As razões que podem contribuir para este fenômeno são: primeiro a maior temperatura média durante a maturação dos queijos de verão, que favorece o crescimento da microflora em tempo mais curto e, assim, uma aceleração da atividade das aminopeptidases antes dos 28 dias; segundo a menor quantidade de água nos queijos de verão na fase final da maturação, que diminuem as atividades enzimáticas (SOUZA, 2002; SOUZA et al., 2003). Comparadas a outros queijos as atividades aminopeptidásicas no queijo Serrano podem ser consideradas muito altas, tornando relevante seu estudo na microflora e no queijo.



**Figura 11 - Cromatogramas: A) Exemplo da Cromatografia dos padrões e B) Exemplo da Cromatografia de uma amostra (42 d de verão). Apresentados como demonstrativo dos cromatogramas realizados.**

**Tabela 13** Evolução dos AAL durante a maturação do Queijo Serrano resultados de seis aplicações duplas dos queijos produzidos a partir de duas bateladas, obtidas em períodos diferentes (verão e inverno) e expressos em  $\text{mg } 100 \cdot \text{g}^{-1}$  ES do queijo.

AA	Amostras de verão			Amostras de inverno		
	Q. V. 28 d	Q. V. 42 d	Q. V. 60 d	Q. I. 28 d	Q. I. 42 d	Q. I. 60 d
Asp	141	182	254	51	97	198
<b>Glu</b>	<b>301</b>	<b>519</b>	<b>826</b>	<b>120</b>	<b>259</b>	<b>522</b>
Ser	37	43	55	10	19	31
Gly	42	66	93	11	27	49
His	0	0	0	0	0	43
<b>Arg</b>	<b>485</b>	<b>517</b>	<b>613</b>	<b>104</b>	<b>164</b>	<b>207</b>
Thr	34	46	59	8	17	27
Ala	188	298	396	35	64	126
<b>Pro</b>	<b>103</b>	<b>231</b>	<b>266</b>	<b>45</b>	<b>79</b>	<b>138</b>
Tyr	6	8	11	10	17	33
Val	99	134	182	29	53	91
Met	24	37	56	6	14	26
Ile	21	32	49	6	11	22
<b>Leu</b>	<b>167</b>	<b>218</b>	<b>281</b>	<b>47</b>	<b>92</b>	<b>174</b>
Phe	78	107	137	27	54	89
Trp	152	195	285	28	55	134
<b>Lys</b>	<b>195</b>	<b>318</b>	<b>488</b>	<b>46</b>	<b>96</b>	<b>166</b>
<b>TOTAL</b>	<b>2073</b>	<b>2951</b>	<b>4051</b>	<b>583</b>	<b>1118</b>	<b>2076</b>

ND – não determinado.

Em negrito os aminoácidos livres (AAL) com resultados significativos para este estudo.

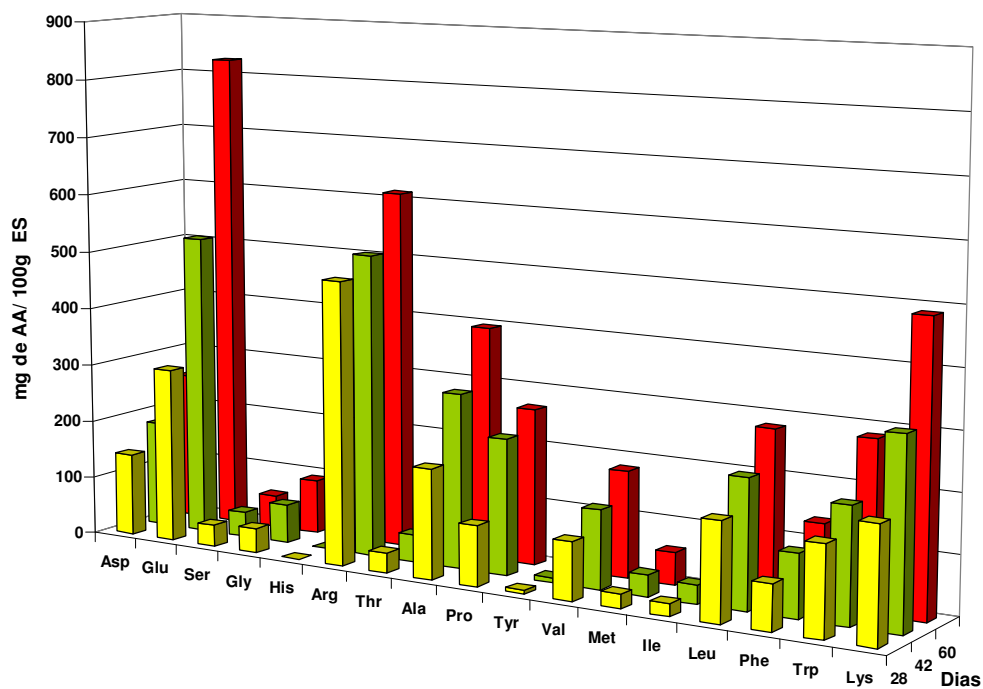
Todos os resultados foram analisados estatisticamente com o software Statistica for Windows (StatSoft, 1996), sendo considerados os que apresentaram 5% nos níveis de significância.

Os resultados foram processados por TurboChrom™ 4.0 software.

**Tabela 14 - Percentual de aumento dos AAL com o tempo de maturação**

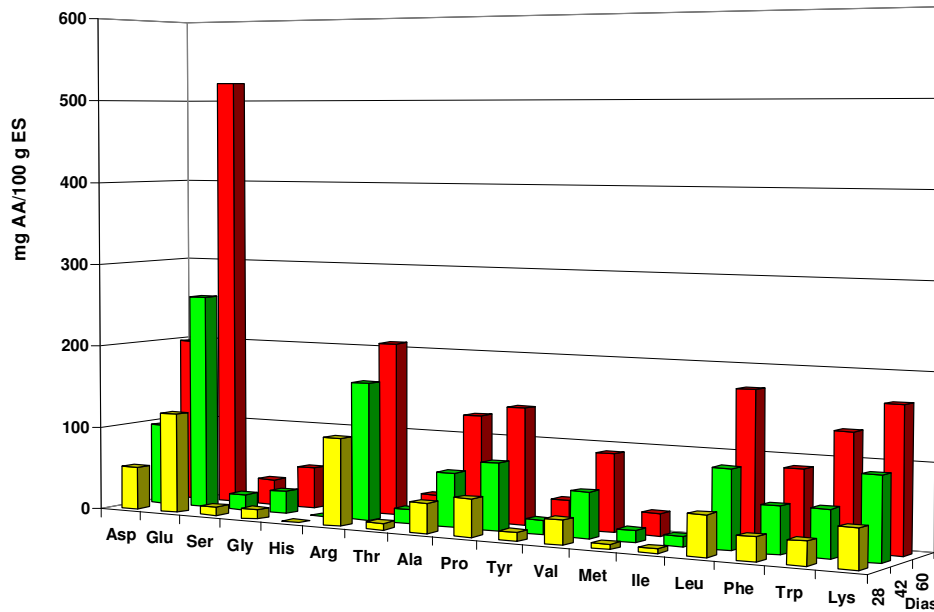
AA	Aumento no inverno		Aumento no verão	
	28 to 42 d	42 to 60 d	28 to 42 d	42 to 60 d
<b>Glu</b>	116%	102%	72%	59%
<b>Arg</b>	58%	26%	7%	19%
<b>Leu</b>	94%	90%	31%	29%
<b>Lys</b>	110%	74%	63%	53%
<b>Pro</b>	78%	75%	56%	15%

**Nota:** Aumento do AAL em percentual no intervalo de tempo de maturação entre 28-42 dias e 42-60 dias para os queijos de inverno e verão do produtor.



**Figura 12 – Aminoácidos Livres dos queijos do produtor A no período de verão**

**Nota:** Gráfico representando os resultados da presença de aminoácidos livres (AAL) nos queijos de verão com 28, 42 e 60 dias de maturação e expressos em mg de AAL/ 100 g de Extrato Seco (ES).



**Figura 13 – Aminoácidos Livres dos queijos do produtor A no período de inverno**

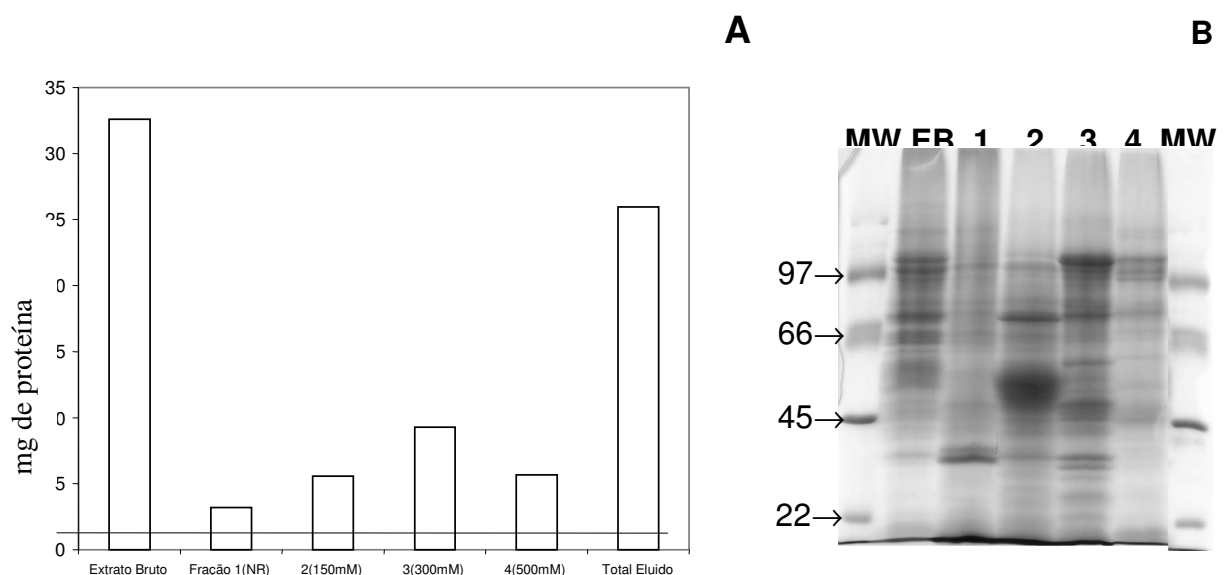
Nota: Gráfico representando os resultados da presença de aminoácidos livres (AAL) nos queijos de inverno com 28, 42 e 60 dias de maturação, e expressos em mg de AAL/ 100 g de Extrato Seco (ES)

## 6.4 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

### 6.4.1 Análise de aminopeptidases presentes em microrganismos isolados dos queijos de 28 e 60 dias.

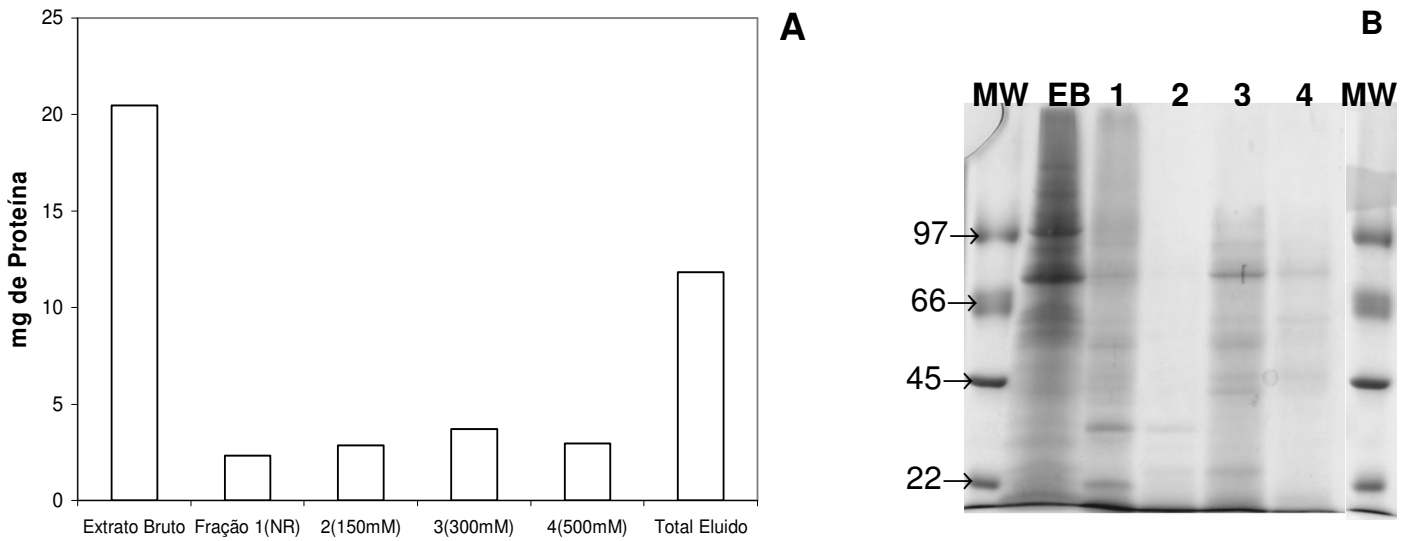
Para identificar as principais aminopeptidases, PepA, PepN, PepL, PepC e PepI, presentes nos extratos das bactérias ácido lácticas (EB), estes foram submetidos à uma purificação parcial por cromatografia de troca iônica em resina Q-Sepharose®, tampão fosfato 20mM, pH 7,5; resultando em quatro frações protéicas: material não retido (NR), somente tampão, eluído com tampão e 150 mM de NaCl

(FI), eluído com tampão e 300mM de NaCl (FII) e eluído com tampão e 500 mM de NaCl (FIII). O extrato bruto (EB) e cada uma das frações obtidas na eluição foram caracterizados quanto às diferentes atividades aminopeptidásicas; também, para confirmar a presença de proteínas nas frações, foi realizado o perfil eletroforético do EB e das frações de cada grupo de microrganismos estudados e assim denominados: lactobacilos do queijo de 28 dias de maturação (L-28, Figura 14), lactobacilos do queijo de 60 dias de maturação (L-60, Figura 15) e enterococos do queijo de 60 dias de maturação (E-60, Figura 16).



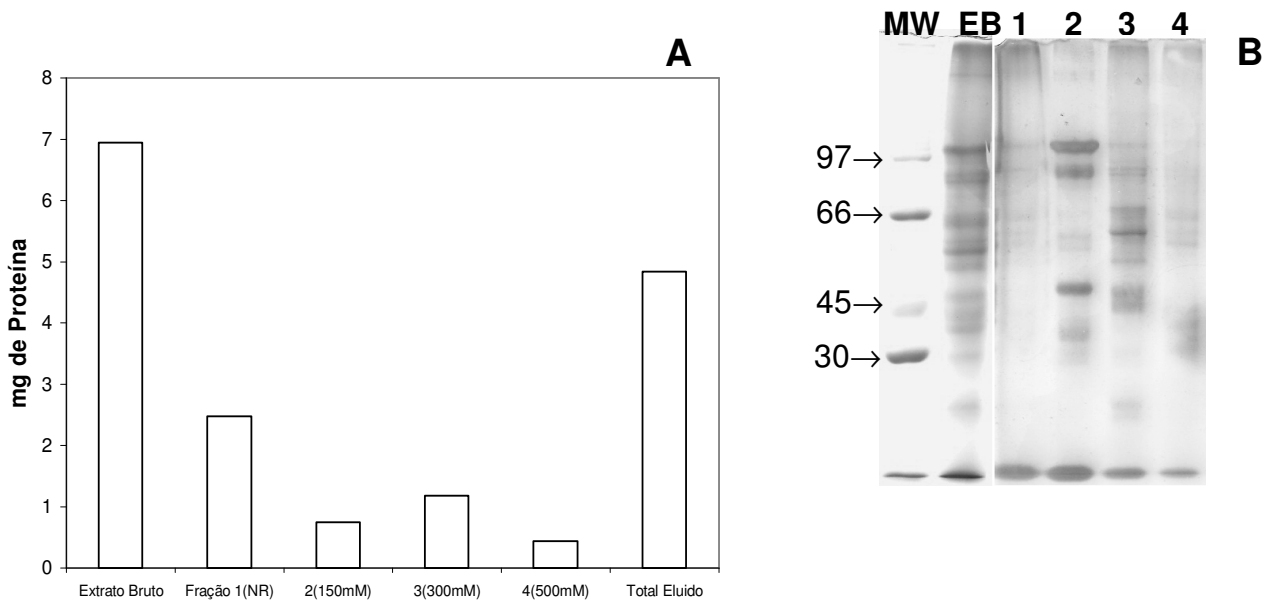
**Figura 14 - Fracionamento por cromatografia de troca iônica do extrato de *Lactobacillus sp.* do queijo de 28 dias de maturação (L-28)**

Nota: Em **A**: conteúdo protéico das frações da purificação. **B**: perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% do extrato bruto (EB), e das frações (1) não retido (NR), (2) 150 mM de NaCl (FI), (3) 300 mM de NaCl (FII), (4) 500 mM de NaCl (FIII) .



**Figura 15 - Fracionamento por cromatografia de troca iônica do extrato de *Lactobacillus sp.* do queijo de 60 dias (L-60)**

Nota: Em **A**: conteúdo proteico das frações da purificação. **B**: perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% do extrato bruto (EB), e das frações (1) não retido (NR), (2) 150 mM de NaCl (FI), (3) 300 mM de NaCl (FII), (4) 500 mM de NaCl (FIII).

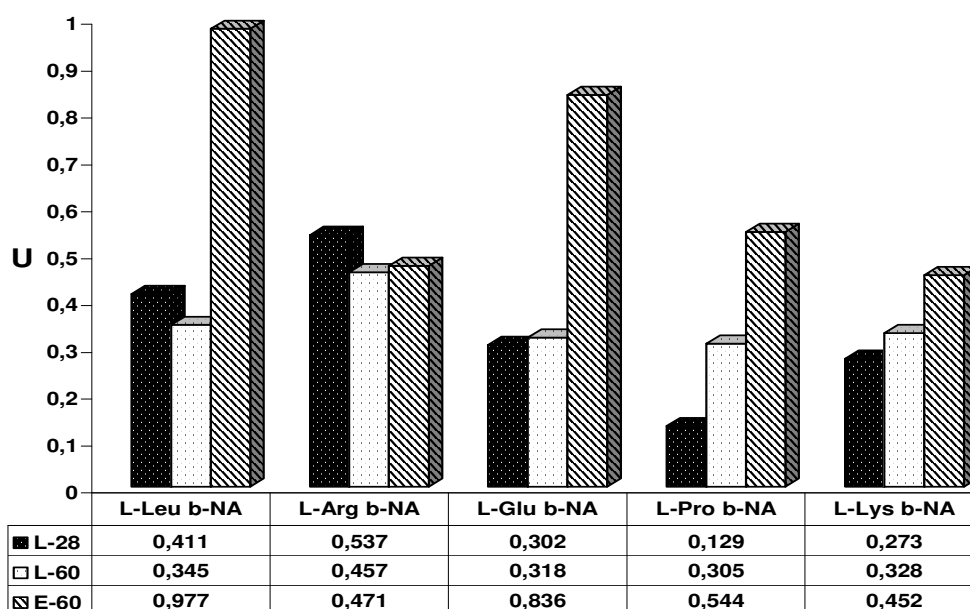


**Figura 16 - Fracionamento por cromatografia de troca iônica do extrato de *Enterococcus sp.* do queijo de 60 dias (E-60).**

Nota: Em **A**: conteúdo protéico de frações da purificação. **B**: perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% do extrato bruto (EB), e das frações (1) não retido (NR), (2) 150 mM de NaCl (FI), (3) 300 mM de NaCl (FII), (4) 500 mM de NaCl (FIII).



Na Figura 17 estão os resultados das atividades aminopeptidásicas dos extratos brutos (EB) obtidos para cada microrganismo em  $\mu\text{mol}$  de  $\beta\text{-NA}/\text{h}$ . Os resultados mostram que por  $\text{mg}$  de proteína os E-60 foram os mais ativos para quatro dos cinco substratos. Para o substrato Arg- $\beta\text{NA}$  os três grupos de microrganismos apresentaram atividade semelhante. Em relação aos *lactobacilos* há um significativo aumento de atividade dos L-28 para os L-60 para o substrato Pro- $\beta\text{NA}$ .



**Figura 17 - Atividade arilamidásica específica das aminopeptidases dos extratos brutos das células dos microrganismos (EB) em  $\mu\text{mol}$  de  $\beta\text{-NA}$   $\text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  por  $\text{mg}$  de proteína (U/  $\text{mg}$  de proteína).**

A Figura 17 apresenta os resultados das cromatografias de troca iônica e a distribuição da atividade específica arilamidásica das aminopeptidases nas frações dos extratos solúveis dos diferentes microrganismos isolados do queijo Serrano do produtor A, cuja unidade (mU) é expressa como  $1\text{nmol}$  de  $\beta\text{NA}$  / hora por  $\text{mg}$  de proteína, e a Tabela 15 apresenta os resultados em atividade total cuja unidade (mU) é expressa em  $1\text{nmol}$  de  $\beta\text{NA}$  / hora.

Os substratos utilizados (Leu- $\beta$ NA, Arg- $\beta$ NA, Glu- $\beta$ NA, Pro- $\beta$ NA e Lys- $\beta$ NA) para a determinação das atividades específicas e totais foram selecionados a partir dos melhores resultados obtidos com a cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação dos AAL presentes nos queijos (Tabela 13).

Ao contrário dos extratos brutos (EB), as frações da cromatografia de troca iônica dos extratos de L-28 e L-60 apresentaram maior atividade aminopeptidásica que as frações dos extratos de E-60. As atividades específicas decaem de 28 para 60 dias para Leu- $\beta$ NA, Arg- $\beta$ NA e Glu- $\beta$ NA e aumentam para Pro- $\beta$ NA e Lys- $\beta$ NA nos *lactobacilos* (Figura 17).

Os L-28 apresentaram uma grande atividade sobre Arg- $\beta$ NA (PepC ou PepN), seguida por Leu- $\beta$ NA (PepL). O fracionamento do EB concentrou toda a atividade para o substrato Arg- $\beta$ NA, na fração eluída com 300 mM NaCl; para Leu- $\beta$ NA, a maior parte da atividade estava presente na mesma fração indicando uma fração contendo, basicamente, aminopeptidases PepC, PepN e PepL. A atividade de PepA, avaliada com o substrato Glu- $\beta$ NA, concentrou-se toda sobre a fração RN, indicando proteína(s) de caráter básico.

As atividades aminopeptidásicas apresentadas pelos L-60 foram menores que as apresentadas pelos L-28 para Leu- $\beta$ NA, Arg- $\beta$ NA e Glu- $\beta$ NA e foram maiores para Lys  $\beta$ NA e Pro- $\beta$ NA, sendo que a atividade sobre Arg- $\beta$ NA foi menor que 10%, se comparada com L-28.

**Tabela 15 - Atividade arilamidásica total das aminopeptidases dos extratos brutos das células dos microrganismos (EB) e das frações obtidas após a cromatografia de troca iônica dos extratos (EB) em nmols de  $\beta$ -NA·h<sup>-1</sup> (mU).**

Microorganismo	mg de proteína	Fração	Substratos				
			Leu $\beta$ -NA	Arg $\beta$ -NA	Glu $\beta$ -NA	Pro $\beta$ -NA	Lys $\beta$ -NA
<b>L 28</b>	32,6	EB	13406	17533	9831	4202	8885
	3,2	NR	1096	0	907	150	155
	5,5	FI	797	0	0	124	162
	9,3	FII	3999	25596	0	157	208
	8,0	FIII	1607	5780	0	121	221
<b>L 60</b>	20,5	EB	7051	9350	6500	6240	6721
	2,3	NR	521	521	287	118	944
	2,9	FI	1291	315	215	125	2345
	3,7	FII	668	245	333	383	575
	3,0	FIII	549	216	0	0	410
<b>E 60</b>	6,9	EB	6741	3247	5775	3756	3118
	3,5	NR	408	277	104	242	173
	0,9	FI	79	59	0	46	41
	1,2	FII	0	80	0	102	68
	1,0	FIII	0	52	0	90	56

Nota: EB – Extrato bruto dos L 28, L 60 e E 60; NR – não retido da cromatografia de troca iônica; FI – fração eluída com 150 mM de NaCl; FII – fração eluída com 300 mM de NaCl; FIII – fração eluída com 500 mM de NaCl.

A maior atividade de L-60 foi sobre Lys  $\beta$ NA seguida por Leu- $\beta$ NA, que se concentraram na fração eluída da Q-Sepharose com 150 mM de NaCl (FI), provavelmente proteína(s) PepC, PepN e PepL diferente(s) da existente nos L-28, sugerindo mudanças no complexo das peptidases dos microrganismos com o tempo.

Os E-60 apresentaram atividades bem mais baixas nas frações (cerca de 1% a 5%) quando comparadas com as atividades dos L-28 e L60 sobre todos os aminoacil- $\beta$ NA derivados testados. A atividade mais alta foi sobre Leu- $\beta$ NA, sendo

eluída na fração do NR, a mais ativa para todos os substratos, indicando proteína(s) com caráter básico; a atividade apresentada no EB, e mais tarde confirmada nos zimogramas dos EB de E-60, não é observada nas frações da cromatografia de troca iônica, supõe-se que a(s) enzima(s) não estava(m) nas partes das frações com maior quantidade de proteína tomada para os ensaios ou foram excessivamente diluídas a ponto de não serem sensíveis à reação, outra possibilidade é que estas enzimas sejam sensíveis aos íons  $\text{Cl}^-$ . De fato, os efeitos na atividade das enzimas das NSLAB dependem da interação de muitas variáveis independentes como: temperatura, pH, e concentração de NaCl para as diferentes espécies (Gobbetti et al., 1999).

A Tabela 16 resume os principais resultados das cromatografias e a distribuição das atividades arilamidásicas de extratos solúveis dos microrganismos isolados do Queijo Serrano.

**Tabela 16 - Atividades totais arilamidásicas com maiores relevâncias nas frações da cromatografia de troca iônica**

Substrato	Microrganismos								
	L 28			L 60			E 60		
	EB	Fração	Atividade	EB	Fração	Atividade	EB	Fração	Atividade
<b>Leu <math>\beta</math>-NA</b>	13406	FII	3999	7051	FI	1291	6741	RN	408
	17533	FII	25596	9350	NR	521	3247	RN	277
<b>Glu <math>\beta</math>-NA</b>	9831	NR	907	6500	FII	333	5775	RN	104
<b>Pro <math>\beta</math>-NA</b>	4202	FII	157	6240	FII	383	3756	RN	242
<b>Lys <math>\beta</math>-NA</b>	8885	FIII	221	6721	FI	2345	3118	RN	173

Nota: Maiores resultados de atividades totais arilamidásicas, em nmol de  $\beta$ NA  $\text{h}^{-1}$  (mU), das aminopeptidases e respectiva fração da cromatografia de troca iônica dos extratos de microrganismos isolados do Queijo Serrano.

As bactérias ácidoláticas (lactococos e lactobacilos) desenvolveram um complexo sistema de peptidases para prover as suas necessidades de aminoácidos a partir das caseínas do leite (CHRISTENSEN et al., 1999). Um número significativo de aminopeptidases foi tabulado (Tabela 6) e estas informações foram obtidas com uma variedade de substratos sintéticos capazes de elucidar a específica função de uma enzima através de sua ação de hidrólise (CHRISTENSEN et al., 1999).

As principais aminopeptidases livres e ativas nos extratos dos queijos são provenientes do interior das células das LAB e NSLAB (KUNJI et al., 1996).

Partindo desta premissa e da afirmação de Gobbetti et al., (1999) que as aminopeptidases são as mais importantes enzimas das NSLAB a atuarem na maturação do queijo, por produzirem os AAL e os peptídeos de baixa massa molecular, ambos responsáveis direta e indiretamente (ao serem convertidos em outros produtos) pelo aroma e o sabor do queijo, verificou-se a atividade aminopeptidásica nos extratos aquosos das NSLAB dos queijos em estudo.

Os resultados obtidos com a utilização de substratos  $\beta$ -naftilamida derivados, neste trabalho, apresentaram-se significativos para Lys- $\beta$ NA, Arg- $\beta$ NA e Leu- $\beta$ NA, mas não tão significativos para Pro- $\beta$ NA, o que está de acordo com GAGNAIRE et al. (1998).

Os resultados das atividades dos extratos dos microrganismos estudados sobre o substrato Glu- $\beta$ NA, indicaram uma baixa atividade de PepA, o que não corresponde à quantidade de ácido glutâmico livre observado nas análises dos AAL.

Estudos realizados com extratos de *Lc. Lactis* (BACON et al. 1993; NIVEN 1991) e de *S. thermophilus* (RUL; MONNET; GRIPON, 1994), demonstraram que a

PepA, também definida como glutamil aminopeptidase, apresenta uma atividade de hidrólise essencialmente sobre resíduos de aminoácidos N-terminal. A PepA hidrolisou Glu e Asp-pNA, mas apresentou baixa atividade para Glu- e Asp-βNA com PepA de *S. thermophilus* (RUL; MONNET; GRIPON, 1994), provavelmente esta seja a razão dos resultados obtidos neste estudo.

Certamente, as atividades enzimáticas aqui estudadas não são as únicas existentes nos extratos das LAB e NSLAB, e nem representam todas as atividades enzimáticas envolvidas na maturação dos queijos por três razões; primeiramente, muitas delas tenham sido inativadas na extração ou pelas condições do experimento (pH, alta força iônica); segundo, muitas não tenham sido eficientemente extraídas e, finalmente, muitas tenham perdido parte ou toda a sua atividade durante a conservação pelo congelamento. De qualquer modo, os níveis de aminoácidos livres (AAL) nos queijos mostram que as atividades aminopeptidasicas são altas para as amostras consideradas, permanecem ativas durante todo o período de maturação e estão presentes nos microrganismos obtidos dos queijos.

A análise por eletroforese foi realizada para verificar os diferentes perfis das extrações e das frações. Algumas observações são relevantes; a primeira, é que muitas proteínas coincidem, em termos de massa molecular, com os valores apresentados na Tabela 6 para as diferentes aminopeptidases; a segunda é que a eletroforese realizada com as frações dos L-28 apresentou diferenças consideráveis nas bandas quando comparadas com as frações dos L-60 (Figuras 14-B e 15-B) e a terceira, foi a presença das bandas mais fortes da figura das eletroforese (Figura 16 – B) nas FI, FII e FIII (2, 3, 4) dos E-60, que não apresentaram significativas atividades sobre os substratos em análise.

Estudos realizados em queijos artesanais italianos, feitos a partir de leite de cabra sem tratamento, comprovam a importância da presença dos enterococcus durante a manufatura e a maturação dos queijos, apresentando relevantes atividades proteolíticas e lipolíticas, bem como uma atividade antagonista para *Listeria innocua* (SUZZI et al., 2000).

## 6.5 ZIMOGRAMA PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE ARILAMIDÁSICA EM EXTRATOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE QUEIJOS E DOS EXTRATOS DAS AMOSTRAS DE QUEIJOS DO PRODUTOR A

Para correlacionar as principais atividades proteolíticas presentes nos queijos com os microrganismos destes obtidos realizou-se zimogramas dos extratos dos queijos e dos microrganismos. As Figuras 19, 20, 21, 22 e 23 mostram os resultados destes zimogramas para cada um dos substratos sintéticos estudados.

Nesta técnica as amostras foram submetidas à eletroforese em condições não desnaturantes e caracterizou-se a presença de atividade aminopeptidásica sobre os cinco substratos  $-\beta$ -NA derivados para cada amostra.

Uma importante observação deve ser feita, ao se utilizar o gel nativo, nas condições do ensaio, somente as proteínas carregadas negativamente em pH 8.9 entraram no gel de separação e migraram em direção ao pólo positivo.

Verificou-se que a atividade sobre o substrato Lys- $\beta$ NA foi a maior para todos os microrganismos, apresentando resultados até 80% superiores a alguns substratos.

Os maiores resultados de atividade para Lys- $\beta$ NA ocorreram nos Rfs 0,5 e 0,9 do extrato de E-60, nos Rfs 0,1, 0,7 e 0,9 do extrato de L-60; e nos Rfs 0,4 e 0,7 do extrato de L-28. Estes valores de Rfs coincidem com os valores encontrados nos queijos de 28 e 60 dias de maturação.

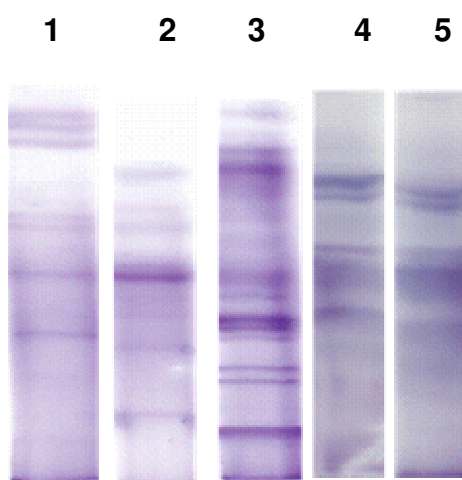


Figura 18 – Geís das Eletroforeses nas condições não desnaturantes

Nota: Zimogramas dos extratos dos microrganismos e dos extratos dos queijos: 1) Lactobacilos dos queijos de 28 dias (L-28); 2) Lactobacilos dos queijos de 60 dias (L-60); 3) Enterococos dos queijos de 60 dias (E-60); 4) Queijos de 28 dias (Q 28); 5) Queijos de 60 dias (Q 60).

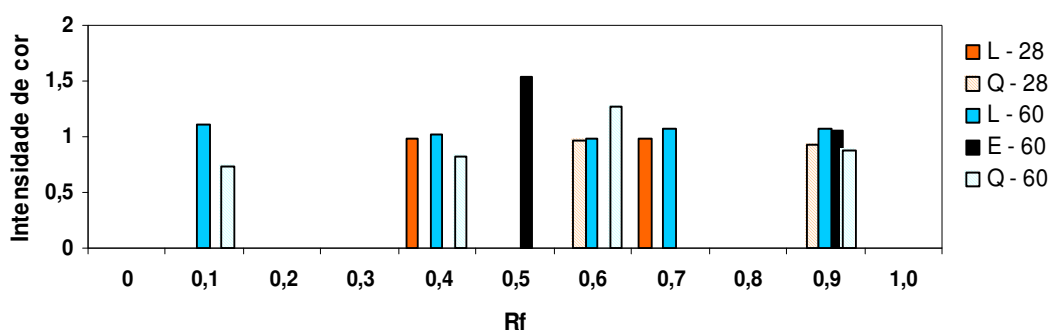


Figura 19. Zimograma da atividade sobre Lys- $\beta$ NA dos extratos de Lactobacilos do queijo com 28 d e 60 d de maturação, do extrato de Enterococos do queijo de 60 d de maturação, e dos extratos dos queijos de 28 d e 60 d de maturação do produtor A. Indicando os Rfs com atividade representativa e os valores expressos em nmol de  $\beta$ -NA·24h (Intensidade de cor).



A atividade sobre Pro- $\beta$ NA, apresentou o segundo maior resultado nos L-60 e nos E-60, mostrando a existência de atividade em dois diferentes Rfs do gel, 0,2 e 1,0 para L-60, e nos Rfs 0,05 e 1,0 para E-60, indicando dois grupos diferentes de aminopeptidases; nos L-28 a atividade foi maior no Rf 0,1 e 1,0, sendo, porém, duas vezes menor que nos L-60 e E-60. As duas regiões (0,1 e 1,0) coincidem com os Rfs dos queijos, porém estes apresentam uma atividade no Rf 0,6 sugerindo a ação de enzimas de outra origem.

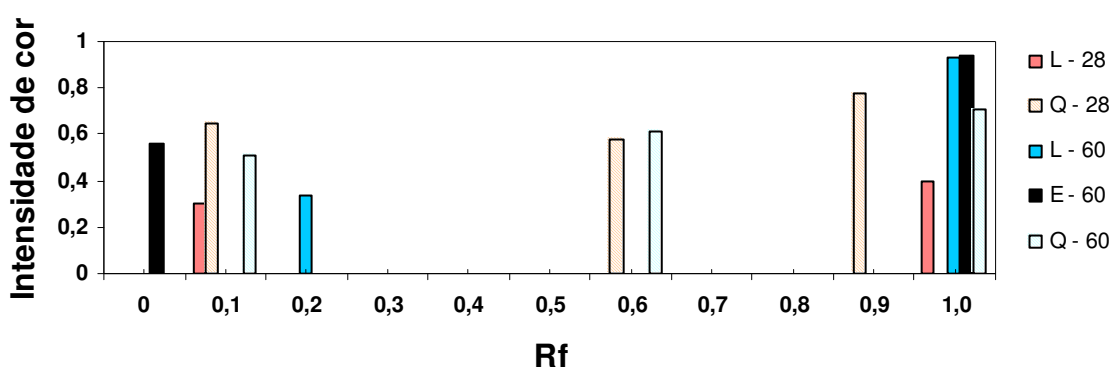


Figura 20. Zimograma da atividade sobre Pro- $\beta$ NA dos extratos de Lactobacilos do queijo com 28 d e 60 d de maturação, do extrato de Enterococos do queijo de 60 d de maturação, e dos extratos dos queijos de 28 d e 60 d de maturação do produtor A. Indicando os Rfs com atividade representativa e os valores expressos em nmol de  $\beta$ -NA·24h (Intensidade de cor).

A atividade sobre Arg- $\beta$ NA foi a terceira em ordem de intensidade e os E-60 foram os que apresentaram os maiores valores, destaca-se a atividade no Rf 0,2 e no Rf 0,4; nos L-28 a atividade estava presente nos Rfs 0,3 (segunda em ordem de intensidade) e 0,8; nos L-60 os Rfs com atividade foram 0,2 e 0,5. Nos queijos,

observa-se atividade no Rf 0,2 para Q-60, E-60 e L-60, e no Rf 0,8 a atividade coincide para Q-28 e L-28, indicando que as proteínas com atividade nos queijos e nos microrganismos dos queijos com 28 dias de maturação são diferentes das proteínas com atividade nos queijos e nos microrganismos dos queijos com 60 dias de maturação .

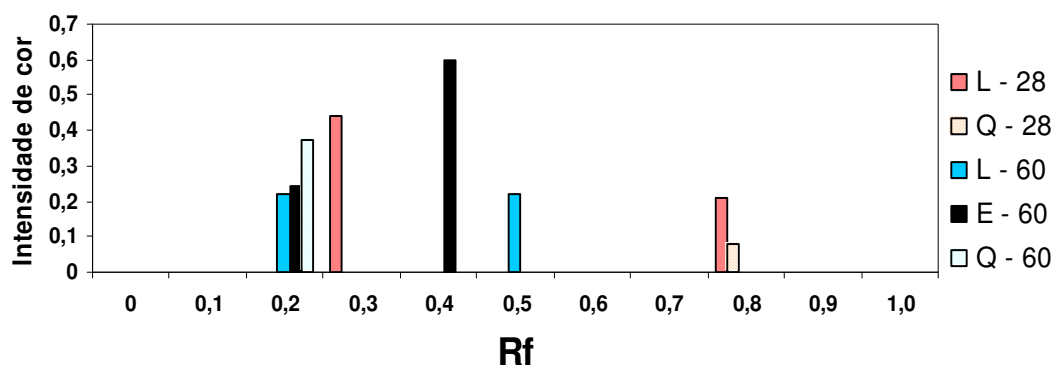


Figura 21. Zimograma da atividade sobre Arg- $\beta$ NA dos extratos de Lactobacilos do queijo com 28 d e 60 d de maturação, do extrato de Enterococos do queijo de 60 d de maturação, e dos extratos dos queijos de 28 d e 60 d de maturação do produtor A. Indicando os Rfs com atividade representativa e os valores expressos em nmol de  $\beta$ -NA $\cdot$ 24h (Intensidade de cor).

A atividade sobre o substrato Leu- $\beta$ NA para os lactobacilos L-28 e L-60 estava presente no Rf 0,1, sugerindo ser a mesma proteína, no Rf 0,9 e 1,0 observa-se atividade para os E-60, L-60 e Q-60 sugerindo uma mesma proteína no queijo e nos microrganismos. Nos Rfs 0,2, 0,6 os E-60 e o Q-28 apresentam atividade. Os resultados sugem a presença de uma mesma proteína com atividade Pep L no queijo e nos microrganismos com 60 dias de maturação.

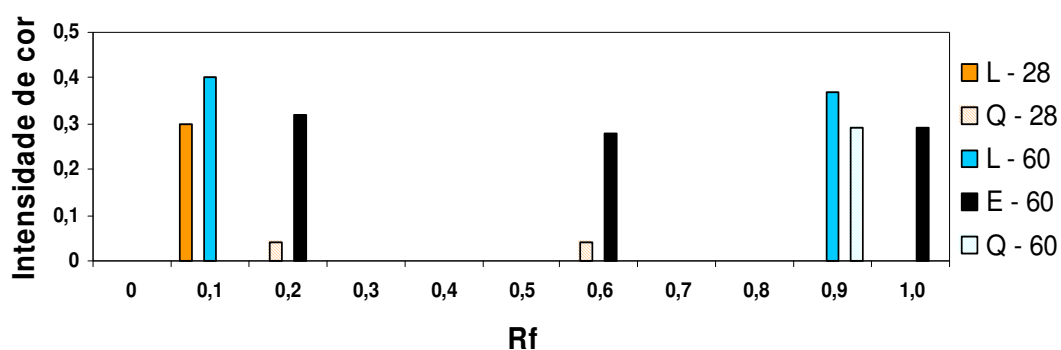


Figura 22. Zimograma da atividade sobre Leu- $\beta$ NA dos extratos de Lactobacilos do queijo com 28 d e 60 d de maturação, do extrato de Enterococos do queijo de 60 d de maturação, e dos extratos dos queijos de 28 d e 60 d de maturação do produtor A. Indicando os Rfs com atividade representativa e os valores expressos em nmol de  $\beta$ -NA·24h (Intensidade de cor).

A atividade sobre Glu- $\beta$ NA foi muito baixa de maneira geral para os extratos dos microrganismos e a atividade nos Rfs 0,7 e 0,8 pode ser devido a uma aminopeptidase geral, concordando com o carácter básico dessas enzimas, que não entrariam no gel na situação experimental utilizada. Os queijos, diferentemente dos microrganismos, nos Rfs 0,0, 0,1 e 0,2 apresentaram significativa atividade, sugerindo que estas enzimas não pertençam aos microrganismos estudados.

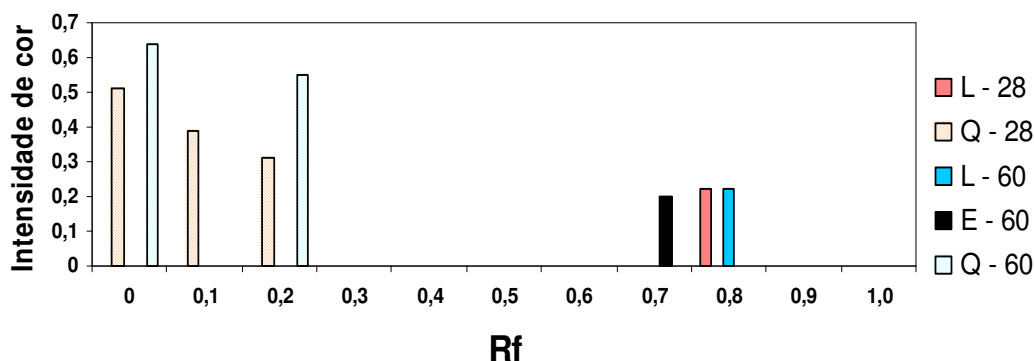


Figura 23. Zimograma da atividade sobre Glu- $\beta$ NA dos extratos de Lactobacilos do queijo com 28 d e 60 d de maturação, do extrato de Enterococos do queijo de 60 d de maturação, e dos extratos dos queijos de 28 d e 60 d de maturação do produtor A. Indicando os Rf s com atividade representativa e os valores expressos em nmol de  $\beta$ -NA·24h (Intensidade de cor).

Comparativamente, a atividade aminopeptidásica nos extratos de L-28, para os substratos utilizados, foi mais intensa para Lys- $\beta$ NA e Arg- $\beta$ NA, média para Pro- $\beta$ NA e Leu- $\beta$ NA; nos extratos do L-60 foi mais intensa para Lys- $\beta$ NA, Pro- $\beta$ NA, média para Leu- $\beta$ NA e menos intensa para Arg- $\beta$ NA; nos extratos de E-60 foi mais intensa para Lys- $\beta$ NA, Pro- $\beta$ NA e Arg- $\beta$ NA, média para Leu- $\beta$ NA e menos intensa para Glu- $\beta$ NA.

Ao confrontar os zimogramas dos extratos dos microrganismos com os extratos dos queijos (Figura 24), os resultados mostram coincidência no comportamento para os substratos Lys- $\beta$ NA, Pro- $\beta$ NA, Arg- $\beta$ NA e Leu- $\beta$ NA. Os extratos dos dois queijos apresentaram uma significativa atividade para o substrato Glu- $\beta$ NA, tendo essa atividade se concentrado no início do gel, o que não aconteceu com os extratos dos microrganismos.

Em trabalho semelhante, realizado sobre lactobacilos termófilos (GAGNAIRE; et al., 1998), foi observado uma difusa atividade no gel sobre Lys- $\beta$ NA, Arg- $\beta$ NA e Leu- $\beta$ NA para todos os extratos de lactobacilos, indicando a presença de PepN e PepL ativas nos extratos (KUNJI et al., 1996). A resposta positiva para PepN em extratos de lactobacilos termófilos, quando avaliados por  $\beta$ NA derivados, é comum, porém estes microrganismos não apresentam atividade para o substrato Pro- $\beta$ NA (GATTI et al., 2004); para o substrato Pro- $\beta$ NA, que indica presença de PepI, são ativos extratos de *Lb. Casei sp* e *Lb. Plantarum* (GOBBETTI et al., 1999).

A presença de PepA, ativas sobre Glu- $\beta$ NA e Asp- $\beta$ NA, como consta na Tabela 6, são atribuídos a *Lc. Lactis* e *S. thermophilus* (CHRISTENSEN et al., 1999), microrganismos não disponíveis para este estudo, mas que são comumente

empregados como LAB iniciadores na elaboração de muitos queijos e, embora não disponíveis para este estudo, estavam presentes nos queijos de 28 e 60 dias de maturação.

Tendo em vista o predomínio que os lactobacilos (NSLAB) tiveram durante todo o processo de elaboração e maturação do queijo Serrano, acredita-se que esses são os microrganismos que potencialmente têm maior importância no processo de maturação, conseqüentemente, no desenvolvimento de aroma e sabor diferenciado do queijo Serrano, devido as suas atividades proteolíticas (LÓPEZ-DÍAZ, 2000).

No zimograma observam-se duas diferentes enzimas responsáveis pela atividade arilamidásica sobre Arg- $\beta$ NA dos L-28 e em Rfs diferentes dos L-60, indicando não estar presente nos L-60, como sugere a atividade dos L-60 ser menor que 10% em comparação com L-28 (Tabela 15 e 16). Essa conclusão é reforçada quando se analisa o comportamento cromatográfico na Q-Sepharose dessa atividade nos dois tempos de maturação: enquanto a atividade sobre Arg-BNA de L-28 é acídica e fica retida, a enzima presente em L-60 é básica, não sendo retida na resina (Tabela 15). Outra indicação de que houve mudança no perfil de enzimas produzidas pelos lactobacilos ao longo da maturação é a preferência dos extratos de L-28 em relação a L-60 para os diferentes substratos nos zimogramas.

A atividade sobre Leu- $\beta$ NA, substrato com aminoácido hidrofóbico/não carregado, observada nos zimogramas dos lactobacilos foi bastante baixa se comparada àquela detectada nos extratos e frações cromatográficas, sugerindo que a metodologia empregada pode resultar na perda dessa atividade, pela desnaturação da enzima, por exemplo.

Por outro lado, as enzimas ativas sobre Glu- $\beta$ NA detectadas nos zimogramas dos extratos de queijo não são as mesmas observadas nos extratos de microrganismos, uma vez que essas tinham caráter básico e não penetraram no gel em condições nativas. Pode-se pensar que essa atividade, que contribui positivamente para as propriedades organolépticas do queijo, seja produzida por outros microrganismos existentes nos queijos e não disponíveis para este estudo como lactococos, e por essa razão, não foram detectadas nos extratos dos microrganismos utilizados. Outra possibilidade é que, nas condições de fabricação do queijo, esses microrganismos teriam outras condições de desenvolvimento, contribuindo de maneira mais expressiva para a produção dessa(s) enzima(s), sendo o meio indutor de fenótipo.

Glutamil aminopeptidases (PepA) são descritas, na literatura, como altamente específicas na hidrólise de substratos com resíduos de aminoácidos ácidos (glutâmico e aspártico) (CHRISTENSEN et al., 1999). Possuem em torno de 40 kDa, formando trímeros e hexâmeros; em condições nativas possuem pI 4,35, alta estabilidade térmica e são altamente hidrofóbicas em cromatografias de interação hidrofóbica (BARRET et al., 1998). As descrições dessas enzimas na literatura corroboram os resultados apresentados nos zimogramas dos queijos, mas não correspondem com as enzimas que apresentaram atividade de hidrólise sobre Glu- $\beta$ NA na fração não retida (NR) na cromatografia em Q-Sepharose.

O extrato bruto (EB) dos E-60 apresentou atividade arilamidásica superior ao EB dos L-28 e L-60 (Figura 17) como nos zimogramas, enquanto que nas frações da cromatografia de troca iônica dos E-60 (Tabela 15) as atividades foram baixas para todos os substratos, e todas na fração do não retido (NR); devido à baixa

especificidade de alguns tipos de aminopeptidases (BARRET et al., 1998), esses resultados podem indicar a presença de uma única enzima nessa fração.

Nos queijos possivelmente enzimas de membrana, que possuem maior hidrofobicidade, apresentam maior atividade devido à presença de compostos com baixa polaridade de origem lipídica. Os extratos aquosos dos queijos possuiriam uma menor polaridade no sistema, o que pode facilitar a extração dessas enzimas ou mesmo estabilizar a sua atividade.

A eletroforese para o zimograma foi realizada a 4°C, mas mesmo assim essa metodologia submete as enzimas a condições pouco favoráveis como a alta voltagem, excessos de reagentes não polimerizados no gel e o cisalhamento decorrente do caminho percorrido pela enzima no interior do gel. Isso pode resultar na perda da atividade de algumas enzimas menos estáveis.

Como seqüência deste trabalho, experimentos adicionais poderão ser realizados em trabalhos futuros e em queijos com manufatura utilizando culturas iniciadoras e, como culturas adjuntas, as NSLAB aqui estudadas. As informações obtidas com os zimogramas poderiam ser ampliadas se o campo elétrico fosse invertido para o PAGE nativo, com isso as proteínas com características básicas, portanto com carga negativa no pH utilizado, entrariam no gel. Outra possibilidade é a utilização de SDS-PAGE, seguido de renaturação das enzimas, por retirada do detergente, possibilitando ainda informações sobre massa molecular das proteínas; ou ainda usando gel nativo de poro limitado.

Para classificar as enzimas dentro dos grupos de aminopeptidases, uma possibilidade de aprofundar o estudo seria a utilização de inibidores conhecidos para cada classe de enzimas como EDTA para metalo, iodoacetamida para cisteíno, etc.

A utilização de diferentes substratos sintéticos como -p-nitroanilida derivados (-pNA), X-Pro-βNA, e outros substratos cromogênicos ou pequenos peptídeos, frações de caseína e outros já utilizados em muitos trabalhos para identificar particulares atividades proteolíticas (CAIRA et al., 2003; CHRISENSEN et al., 1999), possibilitando uma maior comparação dos resultados obtidos com os resultados encontrados na literatura.

Tabela 17. Zimograma dos extratos de lactobacilos com 28 d e 60 de maturação, do extrato de enterococos do queijo 60 d de maturação e dos extratos dos queijos de 28 e 60 d.do produtor A. Indicando os Rf s com atividade representativa e os valores expressos em nmol de β-NA·24h.

Substratos	Amostras									
	L -28		Q-28		L - 60		E - 60		Q - 60	
	Rf	nmol βNA	Rf	nmol βNA	Rf	nmol βNA	Rf	nmol βNA	Rf	nmol βNA
<b>Lys-βNA</b>	-	-	-	-	0,18	1,11	-	-	-	-
	0,41	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	0,59	0,96	-	-	0,52	1,53	0,66	1,26
	0,77	0,98	0,96	0,92	0,77	1,08	-	-	-	-
<b>Leu-βNA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,14	0,25	0,27	0,04	0,10	0,40	-	-	-	-
	-	-	0,68	0,04	-	-	0,29	0,32	-	-
	-	-	-	-	0,90	0,37	-	-	0,95	0,30
<b>Arg-βNA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,36	0,44	-	-	-	-	-	-	0,27	0,37
	0,86	0,21	0,82	0,08	-	-	0,41	0,60	-	-
<b>Pro-βNA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,16	0,3	0,17	0,65	0,24	0,34	0,03	0,56	-	-
	-	-	0,93	0,78	-	-	-	-	-	-
	1,0	0,4	-	-	1,00	0,93	1,00	0,94	1,00	0,71
<b>Glu-βNA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	0	0,51	-	-	-	-	-	-
	-	-	0,19	0,39	-	-	-	-	0,19	0,55
	-	-	-	-	-	-	0,77	0,20	-	-
	0,82	0,22	-	-	0,86	0,20	-	-	-	-



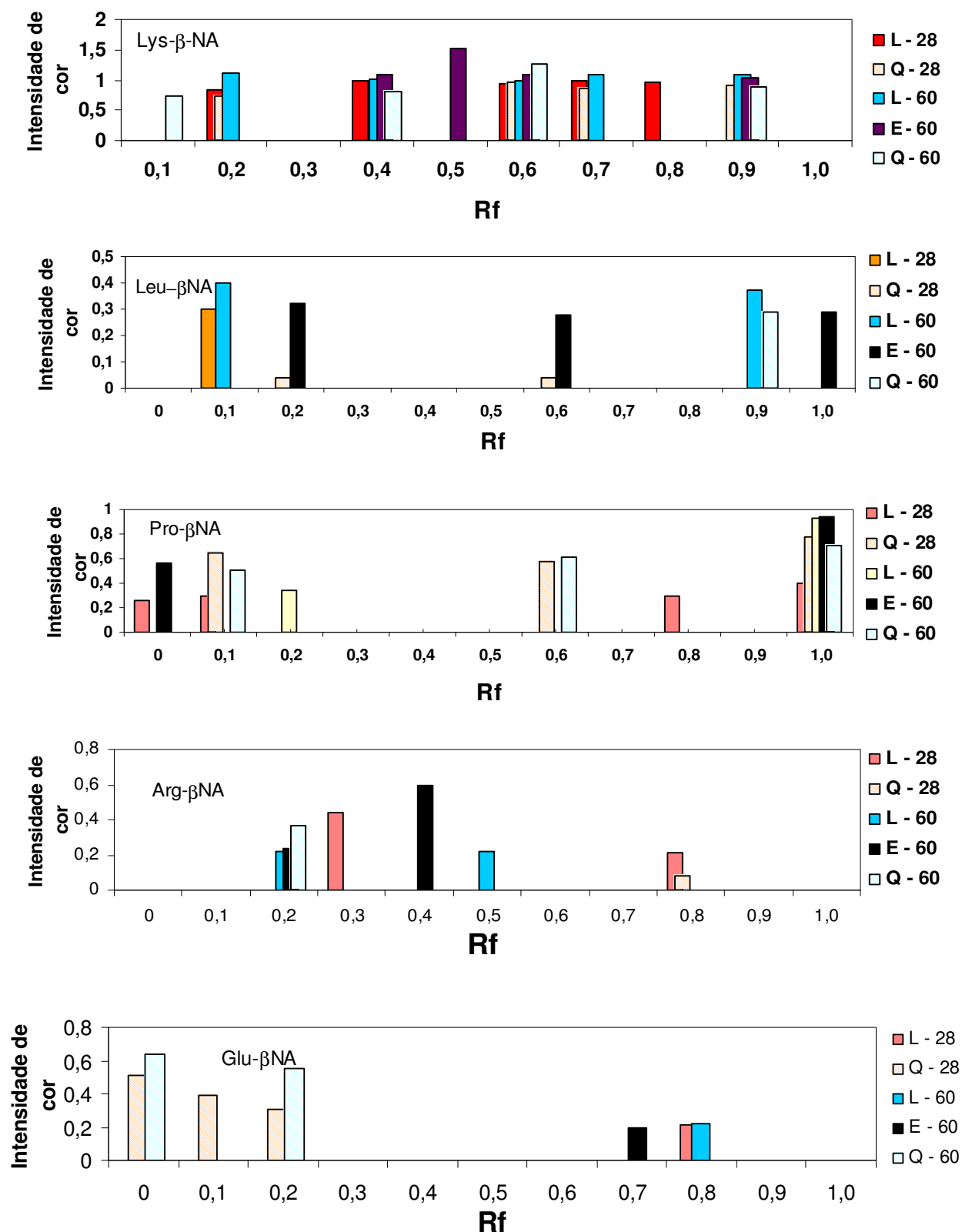


Figura 24 Especificidade dos substratos e mobilidade eletroforética das principais aminopeptidases presentes em amostras dos queijos (Q-28 e Q-60) de 28 e 60 dias de maturação (produtor A) e nos extratos dos microrganismos deles isolados (L-28, L-60, E-60).

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que não há uma relação no comportamento das amostras de queijo dos produtores quando confrontados entre si, e que, embora exista semelhança no procedimento tecnológico durante a manufatura e as condições ambientais durante o tempo de maturação, o fato da não utilização de culturas iniciadoras e culturas adjuntas na formação da coalhada inviabiliza um abaixamento de pH para a formação da mesma.

Todas as amostras do produtor A apresentaram maior atividade enzimática quando comparadas às dos demais produtores.

Da mesma forma constata-se que as amostras do verão diferem nas atividades arilamidásicas em relação às do inverno o que indica um comportamento variado durante a maturação dos queijos ao longo do ano.

A atividade enzimática na presença de substrato de caseína, não apresentou um acréscimo significativo em relação à atividade na própria amostra, indicando um resíduo muito pequeno da enzima coagulante.

Os resultados revelam, também, que a atividade enzimática não apresenta uma relação de crescimento com o tempo de maturação do queijo. Este comportamento deve-se aos fatores físico-químicos na massa do queijo e às diferentes condições ambientais de temperatura e umidade que ao longo da maturação sofrem alterações.

A atividade aminopeptidásica foi maior com os aminoácidos Asp, Leu e Arg em todas as amostras, mostrando um predomínio de aminopeptidases que atuam sobre aminoácidos cujas cadeias laterais são iônicas ou polares.

Entre os microorganismos estudados, os *Lactobacillus* contribuem significativamente com aminopeptidases durante o processo de maturação, cuja atividade pode ser evidenciada até o 60º dia.

Os extratos dos *Lactobacillus sp.*, isolados de queijos de 28 dias e 60 dias, após purificação parcial através de cromatografia por troca iônica, apresentaram atividades aminopeptidásicas com diferentes características físico-químicas e preferência de substrato nas suas frações, evidenciando que o perfil de enzimas produzidas e/ou as espécies desses microorganismos mudam ao longo do processo de maturação.

Os *Enterococcus sp.*, isolados do queijo de 60 dias, apresentaram maiores atividades aminopeptidásicas no extrato bruto (EB), mas as frações obtidas após purificação parcial por cromatografia de troca iônica, todas na fração do NR, foram significativamente inferiores aos *Lactobacillus sp.*. Sugerindo uma menor estabilidade das suas enzimas às condições salinas, pois nos zimogramas as atividades aminopeptidásicas confirmam os resultados obtidos no extrato bruto (EB).

Os zimogramas dos queijos apresentaram diferenças entre o 28º.dia e o 60º dia de maturação sugerindo ativações e supressões de enzimas durante a maturação. Muitas das atividades são correlacionadas entre os extratos dos microorganismos analisados nesse trabalho e os extratos dos queijos, sugerindo que os microorganismos estudados podem ser utilizados, como culturas adjuntas, em trabalhos visando estabelecer um padrão de qualidade no queijo Serrano.

## REFERÊNCIAS

Adda J. Les mecanismes de formation de la flaveur dans les fromages. In: Milk: the vital force. Dordrecht: D. Reidel Publishing; 1997. p.169-77.

Adda J., Gripon JC, Vassal L.. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. Food Chem. 1982;9:115-29.

Alonso ML., Alvarez AL, Zapico J. Rapid Analysis of free amino acids in infant foods. J Liq Chromatogr. 1994;17:4019-30.

Aston JW, Dulley JR. Cheddar cheese flavour. Aust. J. Dairy Technol. 1982;37:59-64.

Bacon CL, Wilkinson M, Jennings PV, Ni Fhaolain I, O'Cuinn G. Purification and characterization of an aminotripeptidase from cytoplasm of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. Int. Dairy J. 1993;3:163-77.

Balduino R, Oliveira AS, Haully MCO. Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas. Cienc Tecnol Aliment. 1999;19:363-9.

Barcina Y, Ibáñez FC, Ordóñez AI. Evolution of free amino acids during Idazábal cheese ripening. Food Control. 1995;6:161-4.

Barret AJ. Lysosomal enzymes. In: Dingle JT, Editor. Lysosomes, a laboratory Handbook. Amsterdam: North-Holland Publishing Company; 1972. p. 46-135.

Barret, AJ, Rawlings ND, Woessner JF. Handbook of Proteolytic Enzymes. London: Academic Press; 1998.

Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. Recent advances in cheese microbiology. Int Dairy J. 2001;11:259-74.

Bhowmik T, Marth EH. Role of Micrococcus and Pediococcus species in cheese ripening: A review. J Dairy Sci. 1990;73:859-66.

Bockelmann W, Beuck HP, Lick S, Heller K. Purification and characterization of a new tripeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* B14. *Int Dairy J.* 1995;5: 493-502.

Boudjellab N, Rolet-Repecaud O, Collins JC. Detection of residual chymosin in cheese by an enzyme – linked immunosorbent assay. *J Dairy Res.* 1994;61:101-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Caira S et al. Synthetic peptides as substrate for assaying the proteolytic activity of *Lactobacillus helveticus*. *J Dairy Res.* 2003;78:315-25.

Chander H, Ranganathan B, Singh J. Purification and some properties of lipase from *Streptococcus faecalis*. *J Dairy Res.* 1979;44:1747-51.

Chapot-Chartier MP, Deniel C, Rousseau M, Vassal I, Gripon JC. Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *Int Dairy J.* 1994;4:251-69.

Chen L, Daniel RM, Coolbear T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int Dairy J.* 2003;13:255-75.

Choisy C, Desmazeaud M, Gripon JC, Lamberet G, Lenoir J, Tourneur C. Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado. In: ECK, A, coordination. *El Queso*. Barcelona: Omega; 1990.

Chapman HR, Sharpe ME. Microbiología del queso. In: Robinson RK, editor. *Microbiología Lactológica: Microbiología de los productos lácteos*. España: Acribia; 1987. v.2. p.147-221.

Corsetti A, Gobbetti M, Smacchi E, De Angelis M, Rossi J. Accelerated ripening of Pecorino Umbro Cheese. *J Dairy Sci* 1998;65:631-42.

Christensen JF, Dudley EG, Pederson JA, Steele JL. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1999;76:217-46.

Crow VL, Martley FG, Coolbear T, Roundhill SJ. The influence of phage-assisted lysis of *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* ML8 on Cheddar cheese ripening. *Int Dairy J.* 1995;5:451-72.

Dalgleish DG. Aspects of stability in milk and milk products. In: Bee RD, Richmond P, Mingins J. Food Colloids. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 1990. p.295-305.

Desmazeaud MJ, Gripon JC. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 1977;32:731-4.

Dilanjan SC. Fundamentos de la elaboración del queso. Espanha: Acribia; 1984.

Driessen FM. Inactivation of lipases & proteinases (indigenous & bacterial). *Bul FIL-IDF* 1989;238:71.

Dulley JR, Grieve PA. Volatile fatty acid production in Cheddar cheese. *Aust J Dairy Technol.* 1974 Sept;29:120-123.

Eck A. El Queso. Barcelona: Omega; 1990.

Ennahar, S., Deschamps, N. Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol.* 2000;88:449-57.

Estepar J. Biochemical and microbiological characterization of artisanal "Peñamellera" cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 1999;9:737-46.

Fairbairn DJ, Law BA. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J Dairy Res.* 1986;53:139-77.

Fenelon MA, Guinee TP. Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *Int Dairy J.* 2000;10:151-8.

Fernandez-Salguero J, Alcalá M, Marcos A., Esteban MA. Measurement and calculation of *a<sub>w</sub>* in Blue cheese. *J Dairy Res.* 1986;53:639-96.

Fernandez-Salguero J, Sanjuán E. Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewe's milk cheese. *Food Chem.* 1999;64:177-83.

Fitz-Gerald CH, Deeth HC. Factors influencing lipolysis by skim milk cultures of some psychrotrophic microorganisms. *Aust J Dairy Technol.* 1983;38:97-103.

Folkertsma B, Fox PF, McSweeney PLH. Acceleration of Cheddar cheese ripening at elevated temperatures. *Int Dairy J.* 1996;6:1117-34.

Fox PF. Proteinases in dairy technology. *Neth Milk Dairy J.* 1981;35:233-53.

Fox PF. Developments in the biochemistry of cheese ripening. In: *Proceedings of 25th International Dairy Congress*; Denmark: Aarhus; 1998. p.11-37.

Fox PF, editor. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2th ed. London: Chapman & Hall; 1993. v.1.

Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg: Aspen Publishers; 2000.

Fox PF, Lucey JA, Cogan TM. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* 1990;29:237-53.

Fox PF, McSweeney PLH. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev Int.* 1996;12:457-509.

Fox PF, McSweeney PHL. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Gaithersburg: Aspen Publishers; 1998.

Fox PF, McSweeney PLH, Lynch CM. Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar Cheese. *Austr J Dairy Technol.* 1998;53:83-9

Fox PF, O'Connor TP, McSweeney PLH, Guinee TP, O'Brien NM. Cheese: Physical, chemical, biochemical and nutritional aspects. *Adv Food Nutr Res.* 1996;39:163-328.

Fox PF, Tobin J. Acceleration and modification of proteolysis. *Proceedings of the 36<sup>o</sup> Annual Marshall Cheese Symposium, Santa Clara, USA.: Gateway to Success; Sept. 9-10, 1999.*

Freitas AC, Fresno JM, Prieto B, Franco I, Malcata FX, Carballo, J. Influence of milk source and ripening time on free amino acid profile of Picnte cheese. *Food Control.* 1998;9:187-94.

Fresno JM, Carballo J, Bernardo A, González J. Evolucion de los aminoacidos libres durante la maduracion del queso de Armada (variedad Sobado). Proceedings of the 9<sup>o</sup> Congreso Nacional de Química, Sevilla, Spain, 1993. v.3. p.227-232.

Furtado MM, Ferreira CLLF, Chaves JBP. Queijo Prato fabricado com cultura láctica isolada de leite cru e soro de queijo artesanal da região do Serro, Minas Gerais. Rev Inst Laticionios Candido Tostes. 1990;45:14-7.

Gagnaire V, Lortal S, Leonil J. Free active peptidase are detected in Emmental juice extracted before ripening in the warm room. J Dairy Res. 1998;65:119-28.

Gatti M, Fornasari ME, Mucchetti G, Addeo F, Neviani E. Presence of peptidase activities in different varieties of cheese. Lett Appl Microbiol. 1999;28: 368-72.

Gatti M, Fornasari ME, Mucchetti G, Addeo F, Neviani E. Crescita di batteri lattice e cinetica di rilascio di attività enzimatiche in formaggi a pasta dura prodotti con differenti cicli termici de caseificazione. Scienza e Tecnica Lattiero Cassearia 2000;51:133-42.

Gatti M, Forasari ME, Lazzi C, Mucchetti G, Neviani E. Peptidase activity in various species of dairy thermophilic lactobacilli. Lett Appl Microbiol. 2004;96:223-9.

Gianette N. Conservazione e Transformazione degli Alimenti. Bologna: Arti Grafiche Emiliane; 1979.

Gobbetti M, Lanciotti M De A, Corbo MR, Massini R, Fox PF. Study of the effects of temperature, pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. Int Dairy J. 1999;9:865-75.

Gómez R, Peláez C, De La Torre E. Microbiological study of semi-hard goat's milk cheese (Majorero). Int J Food Sci Technol. 1989;24:147-51.

González de Llano D, Polo MC, Ramos M, Martín-Alvarez P. Free and total amino acids in the non-protein fraction of an artisan blue cheese during ripening. Z Lebensm Unters Forsch. 1991;193:529-32.

Guinee TM, Wilkinson MG. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. J Soc Dairy Technol. 1992;45:94-104.



Holt C, Horne D. The hairy casein micelle evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Neth Milk Dairy J.* 1996;50:85-111.

Holt C, Sawyer L. Caseins as rheomorphic proteins. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1993;89:2683-90.

Horne DS. Casein structure, self-assembly and gelation. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2002;7:456-61.

Humbert G, Alais C. Review of the progress of dairy science: The milk proteinase system. *J Dairy Res.* 1979;46:559-71.

Irigoyen A, Izco JM, Ibáñez FC, Torre P. Influence of cal for lamb rennet on the physicochemical, proteolytic, and sensory characteristics of na ewe's-milk cheese. *Flavour Fragr J.* 2002;12:27-34.

Izco JM, Torre P. Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the purge and trap method and analysed by GC-MS. *Food Chem.* 2000;70:409-17.

Jensen RG, editor. *Handbook of milk composition.* San Diego, CA: Academic Press; 1995.

Kalogridou-Vassiliadou D, Alichanidis A. Effect of refrigerated storage of milk on the manufacture and quality of Teleme cheese. *J Dairy Res.* 1984;51:629-36.

Karahadian C, Lindsay RC. Integrated roles of lactate, ammonia and calcium in texture development of mold surface-ripened cheese. *J Dairy Sci.* 1987;70:909-18.

Khalid NM, Marth, EH. Partial purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Syst Appl Microbiol.* 1990;13:311-9.

Kruif CG. Casein micelle interactions. *Int Dairy J.* 1999;9:183-8.

Kunji ERS, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konings WN. The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek,* 1996;70:187-221.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:196-204.

Lane CN, Fox PF. Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int Dairy J*. 1996;6:715-28.

Law BA. Flavour development in cheeses. In: Davies FL, Law BA, editors. *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Hardbound: Elsevier Appl. Sci. Publ; 1984.

Law J, Haandrilman A. Proteolytic enzymes of lactic acid acteria. *Int Dairy J*. 1997;7:1-11.

Law BA, Sharpe E, Chapman HR. The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *J Dairy Res*. 1976;43:459-68.

Lawrence RC, Creamer LK., Gilles J. Texture development during cheese ripening. *J Dairy Sci*. 1987;70:1748-60.

Lawrence RC, Gilles J. The formation of bitterness in cheese: a critical evaluation. *N Z J Dairy Sci Techn*. 1969;4:189-96.

Lawrence RC, Gilles J, Creamer LK. The relationship between cheese texture and flavour. *N Z J Dairy Sci Technol*. 1983;18:175-90.

Lemieux L, Simard RE. Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait*. 1991;71:599-636.

Lenoir J. Note sur la composition en matières azotées des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. *Ann Technol Agri*. 1963;12:51-7.

López S, Mayo B. Identification and characterization of homofermentative mesophilic *lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheese. *Lett Appl Microbiol*. 1997;25:233-8.

Lopez-Díaz TM. Lactis acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol*. 2000;17:23-32.

Lynch CM, McSweeney PLH, Fox PF, Cogan TM, Drinan FD. Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with controlled microflora. *Lait*. 1997;77:441-59.

Madkor SA, Tong PS, El Soda M. Ripening of Cheddar cheese with attenuated adjunct cultures of lactobacilli. *J Dairy Sci*. 2000;83:1684-91.

Magboul AAA, McSweeney PLH. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *Int Dairy J*. 1999;9:107-16.

Malin EL, Brow EM. Molecular modeling of conformational changes in solvated  $\alpha_{s1}$  – Casein peptides. *Int Dairy J*. 1999;9:207-13.

Marcos A, Mora T. Proteolysis in Manchego cheese: Evolution of free amino acid. *Arch Zoo*. 1982;31:115-29.

Marilley L, Casey MG. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J Food Microbiol*. 2004;90:139-59.

Martin-Hernandez MC. Proteasas y lipasas de la leche. Enzimas termorresistentes de bacterias psicrófilas y su efecto en la leche y productos lácteos. *Rev Agroquim Tecnol Aliment*. 1991;31:1-18.

Martley FG, Crow VL. Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int Dairy J*. 1993;3:461-83.

Mathenson AR. The immunological determination of chymosin activity in cheese. *N Z J Dairy Sci Techn*. 1981;16:33-6.

McMahon DJ, Brown RJ, Richardson GH, Ernstrom CA. Effects of calcium, phosphate, and bulk culture media on milk coagulation properties. *J Dairy Sci*. 1984;67:930-8.

McSweeney PLH, Fox PF, Lucey JA, Jordan KN, Cogan TM. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *Int Dairy J*. 1993;3:613-34.

Medina M, Gaya P, Nuñez M. Gredos goats' milk cheese: microbiological and chemical changes throughout ripening. *J Dairy Res*. 1992;59:563-6.

Mor-Mur M et al. Microbiological changes during ripening of Cendrat del Montsec, a goat's milk cheese. *Food Microbiol.* 1994;11:177-85.

Muchlenkamp-Ulate MR, Warthesem JJ. Evaluation of several non starter lactobacilli for their influence on Cheddar cheese slurry. *J Dairy Sci.* 1999;82:1370-8.

Nakae T, Elliott JA. Volatile fatty acids produced by some lactic acid bacteria. I. factors influencing production of volatile fatty acids from casein hydrolysate. *J Dairy Sci.* 1965a;48:287-92.

Nakae T, Elliott JA. Production of volatile fatty acids by some lactic acid bacteria II. Selective formation of volatile fatty acids by degradation of amino acids. *J Dairy Sci.* 1965b;48:293-9.

Nath KR. Cheese. In: Hui YH, editor. *Dairy Science and Technology Handbook*. USA: VCH Publishers; 1993. v.2. p.161-255.

Nhuch EL. Estudio Bioquímico del Proceso Madurativo del Queso de San Simón da Costa Elaborado por Procedimientos Artesanales e Industriales com Vistas a la Mejorra de su Tecnología de Fabricación. [Tese]. León (Espanha): Universidade de León; 2000.

Niven GW. Purification and characterization of aminopeptidase A from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 712. *J Gen Microbiol.* 1991;137:1207-12.

Olivecrona T. Biochemical aspects of lipolysis in bovine milk. *IDF Doc.* 1980;118:19-26.

Oliveira JS. Queijo: Fundamentos tecnológicos. 2th ed. São Paulo: Ícone; 1986.

Olson JC, Mocquot YG. Leche y productos lácteos. In: Elliott RP et al, editors. *Ecología Microbiana de los Alimentos: Productos Alimenticios*. Espanha: Acribia, 1985. v.2. p.472-525.

Olson NF. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiol Rev.* 1990;87:131-48.

Peterson SD, Marshall RT. Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese: A review. *J Dairy Sci.* 1990;73:1395-410.

Prieto B. Biochemical characteristics of León raw cow milk cheese, a Spanish craft variety. *Sci Aliments*. 1994;14:203-15.

Pritchard GG, Coolbear T. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993;12:179-206.

Quaglia G. *Scienza e tecnologia degli alimenti*. Pinerolo: Chiriotti; 1992.

Raksakulthai R, Rosenberg M, Haard NF. Accelerated Cheddar Cheese ripening with an Aminopeptidase Fraction from Squid Hepatopancreas. *J Food Sci.* 2002;67(3):923-9.

Rul F, Monnet V, Gripon JC. Purification and characterization of a general aminopeptidase (St – Pep N) from *Streptococcus salivarius* ssp. *Thermophilus* CNRZ 302. *J Dairy Sci.* 1994;77:2880-9.

Salles C, Septier C, Demaizères D, Lesschaeve I, Issanchou S, Le Quere JL. Evaluation of taste compounds in water-soluble extract of goat cheeses. *Food Chem.* 2000;68:429-35.

Sawyer L et al. Milk protein structure – what can it tell the dairy industry? *Int Dairy J.* 2002;12:299-310.

Sharpe ME. *Identification of lactic acid bacteria methods for microbiologist*. New York: Academic Press, 1979.

Schlesser JE, Schmidt SJ, Speckman R. Characterization of chemical and physical changes in Camembert cheese during ripening. *J Dairy Sci.* 1992;75:1753-60.

Schmidt DG. Association of caseins and casein micelle structure. In: Fox PF. *Developments in Dairy Chemistry 1*. London: Elsevier Applied Science; 1982. p.61-86

Sing H, Creamer LK. A sensitive quantitative assay for milk coagulants in cheese and whey products. *J Dairy Sci.* 1990;73:1150-7.

Singh TK, Fox PF, Healy A. Isolation and identification of further peptides from diafiltration retentate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese. *Int Dairy Res.* 1997 Aug;64:433-43.

Singh TK, Drake MA, Cadwallader KR. Flavor of Cheddar Cheese and Sensory Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2003;2:139-62.

Soda M. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. In: XII Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes; 1994. p.77-88.

Sousa MJ., Ardo Y, McSweeney PLH. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int Dairy J.* 2001;11:327-45.

Souza CFV. Evolução das características microbiológica durante a elaboração e maturação do queijo Serrano. [Dissertação] Porto Alegre: RSPMMA – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.

Stadhouders J, Veringa HA. Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. *Neth Milk Dairy J.* 1973;27:77-91.

Suzzi G, Caruso, M. Gardini, F. Lombardi, A. Vannini, L. Guerzoni, ME. Andrighetto, C. Lanorte, MT. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *J Appl Microbiol.* 2000;89:267-74.

Swaigood HE. Chemistry of the Caseins. In: Fox PF, editor. *Advanced Dairy Chemistry.* Gaithersburg: Aspen; 1992. v.1. p.63-110.

Tavaria FK, Franco I, Carballo FJ, Malcata FX. Amino acid and soluble nitrogen evolution through out ripening of Serra da Estrela cheese. *Int Dairy J.* 2003;13:537-45.

Thomas TD, Pearce KN. Influence of salt on lactose fermentation and proteolysis in Cheddar cheese. *N Z J Dairy Sci Technol.* 1981;16:253-9.

Tornadijo ME. Evolución e identificación de los microorganismos responsables de la maduración del Queijo de Armada, variedad Sobado. [Doutorado]. Leon (Espanha): Facultad de Veterinária, Universidad de Leon; 1995.

Tornadijo ME. Study of *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiol.* 2001;18:499-509.

Tronco VM. Manual par inspeção da qualidade do leite, Santa Maria: Ed. da UFSM; 1994.

Trieu-Cuot P, Gripon JC. A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *J Dairy Res.* 1982;49:501-10.

Turner KW, Thomas TD. Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. *N Z J Dairy Sci Technol.* 1980;15:265-76.

Tzanetaki EL, Tzanetakis N. Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiol.* 1992;9:13-9.

Van Den Berg G, Exterkate FA. Technological parameters involved in cheese ripening. *Int Dairy J.* 1993;3:485-507.

Vedamuthu ER, Reinbold GM. (1967). Starter cultures for Cheddar Cheese. *J Milk Food Technol.* 1967;30:247-52.

Walstra P, Jenness R. Dairy chemistry and physics. New York, USA::Wiley; 1984.

Walstra P. On the stability of casein micelles. *J Dairy Sci.* 1990;73:1965-79.

Walstra P. Casein sub-micelles: do they exist? *Int Dairy J.* 1999;9:189-92.

Wilkinson MG, Guinee TIPIK, O'Callaghan DM, Fox PF. Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *J Dairy Res.* 1994;61:249-62.

Williams AG, Banks JM. Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar Cheese manufactured in the United Kingdom. *Int Dairy J.* 1997;7:763-74.

Williams AG, Xavier F, Banks JM. Aminopeptidase and dipeptidyl peptidase activity of *Lactobacillus* spp. and non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese. *Int Dairy J.* 1998;8:255-66.



## APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO

### VISITA AOS PRODUTORES DE QUEIJO

Produtor:

Localidade:

1. Rebanho:
  - Raça:
  - Quantidade:
2. Produção (quantidade, formato, etc.):
3. Leite
  - Tratamento (sim/não):
  - Gordura:
4. Coagulação do Leite
  - Tipo de coalho: (pasta/líquido/pó)
  - Poder coagulante:
  - Tempo de coagulação:
  - Temperatura:
5. Prensagem
  - Pressão (sim/não):
  - Tempo de prensagem:
6. Salga
  - Tipo (direta, superfície, seca, imersão) :
  - Tempo:
  - Quantidade:
7. Maturação  
Ações durante a maturação (limpeza, salga periódicas, tempo, outros tratamentos)
8. Conservação dos Queijos
  - Temperatura:
  - Umidade relativa:
  - Massa média das forma:
9. Tratamento da superfície (sim/não):
10. Defeitos Apresentados:

**APÊNDICE B - DADOS DIÁRIOS DE TEMPERATURA E UMIDADE DURANTE  
O PERÍODO DE COLETA DOS QUEIJOS.**

	TEMPERATURAS (°C)														
	Janeiro			Fevereiro			Março			Julho			Agosto		
<b>Dias</b>	<i>Min</i>	<i>Máx</i>	<i>Med</i>	<i>Min</i>	<i>Máx</i>	<i>Med</i>	<i>Min</i>	<i>Máx</i>	<i>Med</i>	<i>Min</i>	<i>Máx</i>	<i>Med</i>	<i>Min</i>	<i>Máx</i>	<i>Med</i>
1				19	24	21,5	17,5	29,5	23,5	11,4	20	15,7	15	26	20,5
2				18,2	29	23,6	18,1	29,1	23,6	11,6	15,8	13,7	16,8	28,5	22,7
3				18,8	24,6	21,7	18,8	27	22,9	11,4	22,4	16,9	16	27	21,5
4				17,1	21,9	19,5	18,2	27,7	22,9	12,9	23,5	18,2	16	25	20,5
5				18,5	26,8	22,6	19	29	24	6,4	15,3	10,9	14	25,2	19,6
6				19,5	27,2	23,4	19	28,5	23,8	6	18,8	12,4	13,5	25	19,3
7				18,1	30	24,1	17,9	25,7	21,8	12,3	22	17,2	14	19	16,5
8				20,4	31	25,7	18,2	27	22,6	12	22,2	17,1	12,2	24	18,1
9				19,8	28	23,9	18,8	26,3	22,6	15	24,9	19,9	13,7	22	17,9
10				19,8	28,6	24,2	17,5	28	22,8	14,3	20,4	17,4	12	12,2	13,6
11				20	30	25	15	24,8	19,9	14,3	17,4	15,9	10,9	19,5	15,2
12				20,4	23	21,7	15	24,2	19,6	0	9	4,5	10,8	22,9	16,9
13				17,4	24	20,7	18	29	23,5	1	14,6	7,8	11,8	24	17,9
14				17,8	26,8	22,3	19,5	29,2	24,4	5,6	17,7	11,7	13	24,4	18,7
15				18,2	24	21,1	20	26,2	23,1	9,1	20,1	14,6	13	24	18,5
16				15,2	24	19,6	18,2	24,5	21,4	13,6	24,9	19,3	12,8	24	18,4
17				16	27	21,5	18,8	26	22,4	16,5	23,3	19,9	11,9	23,2	17,6
18				18,8	25	21,9	18,8	25,5	22,2	14	18	16	14,1	24,5	19,3
19				17,8	24,8	21,3	17,5	24,3	20,9	12,5	22,4	17,5	16,2	21,4	18,8
20				17,3	26	21,7	17,5	26,8	22,2	14	19,1	16,6	9,2	14,4	11,8
21				17,2	28,2	22,7	17,6	28	22,8	7,1	13,5	10,3	7,8	13,7	10,8
22				19,5	26,7	23,1	20	29	24,5	5,8	9,2	7,5	4,8	14	9,4
23				18,8	29	23,9	19,7	24,3	22	0	11,4	5,7	7,1	14,5	10,8
24				19,6	28	23,8	18,2	22	20,1	3	13,2	8,1	9	21	15
25				19	27	23	17,9	26,8	22,4	7	19	13	11,5	23,6	17,6
26				20	28,1	24	18,3	21	19,7	11	14,4	12,7	16	28,6	22,3
27				19	28,5	23,8	14,7	20	17,4	2	7,5	4,75	15	21,8	18,4
28				20	28	24	13	22	17,5	-2	9,4	3,7	9,6	14,5	12
29							13,1	22,3	17,7	0,7	17	8,9	9,6	22	15,8
30	17	24,5	20,8				15	25,5	20,3	7,2	21,6	14,4	12,6	23,3	18
31	18,2	23,8	21				16	26	21	11,1	25,3	18,2	16,4	22,2	19,3

	UMIDADE RELATIVA (%)																			
	Janeiro				Fevereiro				Março				Julho				Agosto			
<b>Dias</b>	9	15	21	Med	9	15	21	Med	9	15	21	Med	9	15	21	Med	9	15	21	Med
1					87	80	94	87	69	40	80	63	73	54	75	67,3	70	44	55	56,3
2					75	46	94	71,7	71	41	89	67	96	87	90	91	60	30	45	45
3					95	80	96	90,3	87	74	70	77	80	55	79	71,3	44	30	31	35
4					91	91	89	90,3	82	50	75	69	77	43	95	71,7	51	38	55	48
5					85	91	94	90	89	40	79	69,3	98	94	94	95,3	59	36	38	44,3
6					96	56	80	77,3	80	58	93	77	88	55	85	76	59	39	51	49,7
7					80	41	75	65,3	96	60	92	82,7	86	46	75	69	88	98	99	95
8					80	39	76	65	94	55	89	79,3	66	49	64	59,7	98	40	91	76,3
9					76	49	66	63,7	82	76	90	82,7	80	41	54	58,3	80	50	91	73,7
10					81	49	76	68,7	84	44	80	69,3	92	54	74	73,3	99	86	95	93,3
11					80	45	89	71,3	89	50	80	73	96	95	87	92,7	92	40	81	71
12					90	93	96	93	75	56	91	74	90	35	75	66,7	89	34	46	56,3
13					95	65	85	81,7	70	40	88	66	59	22	59	46,7	90	31	69	63,3
14					91	54	81	72	79	70	86	78,3	54	35	44	44,3	70	30	50	50
15					92	80	89	87	88	92	95	91,7	57	33	54	48	74	31	60	55
16					92	53	91	78,7	85	63	86	78	56	39	56	50,3	80	37	62	59,7
17					80	46	83	69,7	93	56	84	77,7	58	45	94	64,7	92	45	66	67,7
18					79	65	89	77,7	94	60	89	81	91	95	90	92	72	36	53	53,7
19					90	69	90	83	96	70	92	86	84	65	71	73,3	74	94	97	88,3
20					90	51	71	70,7	90	50	92	77,3	96	96	97	96,3	99	83	96	92,7
21					75	49	80	68	75	53	80	69,3	96	50	94	80	90	59	93	80,7
22					74	54	85	71	87	54	70	70,3	97	81	95	91	89	66	95	83,3
23					65	45	72	60,7	80	66	84	76,7	94	35	94	74,3	96	52	60	69,3
24					76	56	81	71	94	90	93	92,3	90	61	96	82,3	90	34	82	68,7
25					89	74	85	82,7	94	56	75	75	82	62	94	79,3	81	55	66	67,3
26					85	85	85	85	96	82	93	90,3	99	97	99	98,3	51	29	51	43,7
27					60	36	82	59,3	86	60	80	75,3	99	78	81	86	70	87	95	84
28					72	54	80	68,7	71	42	80	64,3	97	44	74	71,7	98	89	90	92,3
29									81	46	78	68,3	65	30	74	56,3	95	60	80	78,3
30									75	38	89	67,3	74	31	75	50	82	45	61	62,7
31									76	70	91	79	79	36	53	56	86	97	80	87,7

**APÊNDICE C - CALENDÁRIO DAS COLETAS DAS AMOSTRAS  
NO VERÃO E INVERNO**

**Verão**

30/01/01	Elaboração dos queijos coleta dos leites e coalhadas
06/02/01	Coleta dos queijos de 7 dias
13/02/01	Coleta dos queijos de 14 dias
27/02/01	Coleta dos queijos de 28 dias
13/03/01	Coleta dos queijos de 42 dias
31/03/01	Coleta dos queijos de 60 dias

**INVERNO**

01/07/01	Elaboração dos queijos coleta dos leites e coalhadas
08/07/01	Coleta dos queijos de 7 dias
15/07/01	Coleta dos queijos de 14 dias
29/07/01	Coleta dos queijos de 28 dias
12/08/01	Coleta dos queijos de 42 dias
30/08/01	Coleta dos queijos de 60 dias

## APÊNDICE D - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES:

### Preparação dos padrões:

Os volumes em  $\mu\text{L}$  dos diferentes aminoácidos indicados acima foram secados em nitrogênio e derivatizados com  $20\mu\text{L}$  da solução derivatizante: Etanol, Trietilamina, água, e fenilisotiocianato em proporções 7:1:1:1 (v/v);

A diluição considerada 1:0 representa a diluição do derivatizado em  $3,2\text{mL}$  da solução de diluição.

As demais diluições foram realizadas a partir da diluição 1:0, como explicitado abaixo:

1:1 –  $500\mu\text{L}$  da diluição 1:0 +  $500\text{mL}$  do diluente;

1:2 –  $500\mu\text{L}$  da diluição 1:0 +  $1000\text{mL}$  do diluente;

1:3 –  $250\mu\text{L}$  da diluição 1:0 +  $750\text{mL}$  do diluente;

1:4 –  $250\mu\text{L}$  da diluição 1:0 +  $1000\text{mL}$  do diluente;

1:6 –  $200\mu\text{L}$  da diluição 1:0 +  $1200\text{mL}$  do diluente.

### Azida sódica, $\text{NaN}_3$ a 20 %

- ✓ Dissolver 4 g de  $\text{NaN}_3$  em 16 mL de água destilada.
- ✓ Cuidado no manuseio !!!

### Preparação da solução de NaPB 20 mM

Massa de 1,4196g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  diluída em 500mL de água destilada

Obs. completar o volume após ajustar o pH

Obs. Quando for utilizado para extração da proteínas dos queijo e dos extratos dos microrganismos, adicionar os  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaN}_3$  20% necessários para uma concentração de 0,02% na solução.

#### **Preparação da solução de NaPB 20 mM com 150mM de NaCl, pH 7,5**

2,8392g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mais 8,766g de NaCl diluída em 1L de água destilada

Obs. completar o volume após ajustar o pH

#### **Preparação da solução de NaPB 20 mM com 300mM de NaCl, pH 7,5**

2,8392g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mais 17,532g de NaCl diluída em 1L de água destilada

Obs. completar o volume após ajustar o pH

#### **Preparação da solução de NaPB 20 mM com 500mM de NaCl, pH 7,5**

2,8392g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mais 29,22g de NaCl diluída em 1L de água destilada

Obs. completar o volume após ajustar o pH

#### **Preparação dos substratos:**

Glu- $\beta$ NA – 5,71mg em 20mL de água destilada

Arg- $\beta$ NA – 7,05 mg em 21mL de água destilada

Leu- $\beta$ NA – 6,30mg em 20,49mL de água destilada

Pro- $\beta$ NA – 5,8mg em 20mL de água destilada

Lys- $\beta$ NA – 5,7mg em 20mL de água destilada

Gly- $\beta$ NA – 5mg em 20,12mL de água destilada

**Preparação da solução 0,4mM de  $\beta$ NA (solução de estoque para curva padrão).**

0,0058g de  $\beta$ NA em 100mL de água destilada.

**Preparação de Caseína 2,5%**

2,5g de caseína dissolvida em 100mL de água destilada.

**Preparação dos padrões de aminoácidos**

**Tabela 1 preparação das soluções dos padrões para a análise dos aminoácidos**

AA	massa g	água mL	$\mu$ L no padrão
Ala	0,2241	50	40
Lys	0,2289	50	40
Thr	0,1498	50	40
Gly	0,0948	50	40
Asp	0,1666	50	50
Glu	0,1844	50	50
His	0,2634	50	50
Tyr	0,1139	100	50
Arg	0,2644	50	50
Pro	0,1447	50	30
Trp	0,1274	50	20
Ser	0,1315	50	60
Met	0,1864	50	30
Ile	0,1645	50	20
Val	0,1467	50	35
Phe	0,2071	50	25
Leu	0,1648	50	25

**Solução de acetato de sódio –ácido acético:** 11,48 g de acetato de sódio anidro em 1L de H<sub>2</sub>O, ajustar o pH para 6.65 com ácido acético.

**BSA 2 %**

Pesar 1 g de BSA (Bovine Serum Albumine) e dissolver em 50 mL de água destilada. Adicionar 100 uL de Azida 20%.

OBS.: Colocar o pó em um pote e adicionar a água lentamente (gota a gota).

### **Corante para a Eletroforese (Coomassie Blue)**

Coomassie Blue R – 250	0,3 g
Metanol	10 mL
Ácido Acético	7,5 mL

- ✓ Completar o volume com água destilada para 100 mL.
- ✓ Deixar decantar e filtrar.
- ✓

### **Coomassie Blue para Bradford**

OBS: Observe que todos os frascos (de vidro ) utilizados para esta preparação estejam MUITO BEM LIMPOS e SECOS.

Coomassie Blue G	100 mg
Etanol 95%	50 mL
Ácido Ortofosfórico 85%	100 mL

- ✓ Dissolver o corante no álcool, sob agitação.
- ✓ Adicionar o Ácido Ortofosfórico.
- ✓ Diluir para 1 L com água destilada.
- ✓ DEIXAR NO ESCURO OVERNIGHT E FILTRAR.
- ✓ Estocar em frasco âmbar.



- ✓ Padrão: BSA: 1 mg/mL

### Marcadores de Massa Molecular pré –corados para SDS Page

Kit Sigma MW – SDS – Blue

#### **Marcadores separados:**

- ✓ Ressuspender o pó de cada vial em 250  $\mu$ L de Urea 8M.
- ✓ Adicionar 250  $\mu$ L de tampão de amostra [ 2x] + 100  $\mu$ L de SDS 10% para concentração final de ~ 2,6 %.

OBS: a concentração final de cada marcador é de aproximadamente 2x em relação ao recomendado no boletim técnico.

- ✓ Aplicar 2  $\mu$ L de cada para gel 10 x 10.
- ✓

#### **Padrão de Peso Molecular para Eletroforese**

- ✓ Para cada frasco, colocar 100  $\mu$ L de água destilada e 100  $\mu$ L de tampão de amostra [ 2x ] com SDS .
- ✓ Ferver por pelo menos 3 minutos. Colocar em eppendorfs com 50  $\mu$ L em cada.
- ✓ Manter no freezer.
- ✓ Aplicar 5  $\mu$ L em cada poço.

<u>Proteínas</u>	<u>Peso Molecular</u>
Fosforilase B	97,000
Albumina	66,000

Ovalbumina	45,000
Anidrase carbônica:	30,000
Inibidor de Tripsina:	20,100
$\alpha$ Lactalbumina:	14,400

### **Bis – Acrilamida 30%**

- ✓ Dissolver 29,2 g de Acrilamida e 0,8 g de N-N-Bis-Metileno-Acrilamida em 100 mL de água destilada.
- ✓ Filtrar e se possível, deaerar.
- ✓ Conservar em frasco âmbar a 4°C.

### **SDS 10%**

- ✓ Dissolver 10 g de SDS em 100 mL de água destilada com leve agitação.
- ✓ Se possível, filtrar.
- ✓

### **Tampão de Amostra com SDS não redutor [2x]**

✓ Água destilada	4,0 mL
✓ 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8	1,0 mL
✓ Glicerol P.A.	0,8 mL
✓ SDS 10 % [f = 2%]	1,6 mL
✓ <u>Bromofenol Blue 0,05%</u>	<u>0,2 mL</u>
✓ Volume final	7,6 mL

OBS: Ao colocar o tampão com a amostra, aquecer a 95°C por pelo menos 2 minutos.

### **Tampão de Amostra SEM SDS não redutor**

✓ Água destilada	5,3 mL
✓ 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8	1,0 mL
✓ Glicerol P.A.	0,8 mL
✓ <u>Bromofenol Blue 0,05%</u>	<u>0,5 mL</u>
✓ Volume final	7,6 mL

### **Tampão de Corrida [ 5 x ]**

- ✓ Dissolver 9 g de Tris-base, mais 43,2 g de Glicina em 500 mL de água destilada.
- ✓ NÃO AJUSTAR O pH !!!
- ✓ Acrescentar 3 g de SDS (SOMENTE PARA GEL DESNATURANTE) e acertar o volume para 600 mL.

### **Caseína 1 %**

Caseína : 1 g

Dissolver em 100 mM de NaAc 0,3 M pH 4,5

### **TBS [5 X]**

Tris Base (M.M = 121,14) : 10 mM [f]

NaCl (M.M = 58,44): 150 mM [f]

50 mM Tris → 10 mM

750 mM NaCl → 150 mM

Completar para 1L e ajustar o pH para 7,5 com Ácido Fosfórico e Hidróxido de Sódio

#### **Tampão A: 1,5 M de Tris HCl pH 8,8**

- ✓ Dissolver 18,2 g de Tris base em 80 mL de água destilada com posterior ajuste de pH para 8,8 (com HCl 5 M).
- ✓ Depois de ajustar o pH, elevar o volume à 100 mL.

#### **Tampão B: 0,5 M de Tris HCl pH 6,8**

- ✓ Dissolver 6 g de Tris-Base em 60 mL de água destilada com posterior ajuste de pH 6,8 (com HCL 5M).
- ✓ Após ajuste do pH, elevar o volume para 100 mL.

#### **TCA - 10%**

Solução de TCA – 50% diluída 1:5 em água Milli-Q

✓ TCA 50%            2 mL

✓ Água Milli-Q            8 mL

## ANEXO A - TABELAS

### TABELA 3 -RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS DO VERÃO

Produtor A

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
pH externo	-	5,53	6,04	5,39	5,40	5,46
pH interno	6,23	4,82	5,10	5,32	5,37	5,41
pH em solução	6,36	5,35	5,55	5,45	5,51	5,45
Acidez titulável (g ácido láctico/100g)	0,190	0,946	0,922	1,217	1,285	1,404
Acidez titulável (g ácido láctico/ 100g EST)	0,376	1,602	1,457	1,829	1,783	1,917
Umidade (g/100g)	49,50	40,97	36,72	33,45	27,93	26,76
Extrato seco (g/100g)	50,50	59,03	63,28	66,55	72,07	73,24
Cinza (g/100g)	2,47	2,59	2,84	3,09	3,16	3,45
Cinza (g/100g EST)	4,89	4,39	4,49	4,64	4,38	4,71

Continua

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
Gordura (g/100g)	21,07	27,10	27,31	32,63	34,52	35,54
Gordura (g/100g EST)	41,72	45,91	43,16	49,03	47,90	48,52
Nitrogênio total (g/100g)	4,23	4,41	4,68	4,29	4,71	5,39
Nitrogênio total (g/100g EST)	8,38	7,47	7,39	6,45	6,53	7,36
Proteína (g/100g)	27,01	28,17	29,87	27,38	30,08	34,37
Proteína (g/100g EST)	53,48	47,72	47,20	41,14	41,74	46,93
Cloretos (g NaCl/100g)	0,428	0,489	0,564	0,521	0,547	0,555
Cloretos (g NaCl/100g EST)	0,847	0,828	0,891	0,783	0,759	0,758
Cloretos (%NaCl na	0,857	1,179	1,513	1,534	1,921	2,032
Lactose (g/100g)	1,91	0,63	Nd	Nd	nd	nd
Lactose (g/100g EST)	3,78	1,07	Nd	Nd	nd	nd
A <sub>w</sub>	0,987	0,970	0,968	0,957	0,948	0,943

**Produtor B**

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
pH externo	-	5,58	5,98	5,55	5,54	5,69
pH interno	6,36	4,94	5,10	5,59	5,54	5,69
pH em solução	6,55	5,41	5,55	5,77	5,62	5,63
Acidez titulável (g ácido láctico/100g)	0,209	1,195	1,283	0,792	1,731	1,783
Acidez titulável (g ácido láctico/ 100g EST)	0,427	1,855	1,963	1,295	2,416	2,482
Umidade (g/100g)	51,04	35,58	34,66	38,85	28,36	28,16
Extrato seco (g/100g)	48,96	64,42	65,34	61,15	71,64	71,84
Cinza (g/100g)	3,04	3,97	4,15	4,20	4,44	4,50
Cinza (g/100g EST)	6,21	6,16	6,35	6,86	6,20	6,26
Gordura (g/100g)	19,78	25,41	27,42	29,03	31,41	31,94
Gordura (g/100g EST)	40,40	39,44	41,96	47,47	43,84	44,46
Nitrogênio total (g/100g)	3,78	4,79	4,73	4,10	4,82	5,35

Continua

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
Nitrogênio total (g/100g EST)	7,72	7,43	7,24	6,70	6,73	7,45
Proteína (g/100g)	24,14	30,58	30,17	26,19	30,78	34,11
Proteína (g/100g EST)	49,30	47,47	46,17	42,83	42,96	47,48
Cloretos (g NaCl/100g)	1,018	1,057	1,174	1,634	1,357	1,388
Cloretos (g NaCl/100g EST)	2,079	1,641	1,797	2,672	1,894	1,932
Cloretos (%NaCl na	2,068	2,885	3,276	4,036	4,566	4,697
Lactose (g/100g)	2,05	0,26	Nd	Nd	nd	nd
Lactose (g/100g EST)	4,19	0,40	Nd	Nd	nd	nd
A <sub>w</sub>	0,984	0,966	0,956	0,945	0,928	0,928



### Produtor C

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
pH externo	-	5,92	6,03	5,79	6,19	5,88
pH interno	5,94	4,80	4,85	6,26	6,39	6,17
pH em solução	6,17	5,23	5,47	6,17	6,13	5,91
Acidez titulável (g ácido láctico/100g)	0,255	1,076	1,033	0,594	0,770	1,044
Acidez titulável (g ácido láctico/ 100g EST)	0,529	1,956	1,698	0,922	1,139	1,445
Umidade (g/100g)	51,81	45,00	39,17	37,59	32,39	27,78
Extrato seco (g/100g)	48,19	55,00	60,83	62,40	67,61	72,22
Cinza (g/100g)	2,43	2,84	3,17	3,52	3,75	3,75
Cinza (g/100g EST)	5,04	5,16	5,21	5,64	5,55	5,19
Gordura (g/100g)	19,17	24,69	27,82	29,41	29,81	33,71
Gordura (g/100g EST)	39,78	44,89	45,74	47,13	44,09	46,68
Nitrogênio total (g/100g)	3,16	4,10	4,31	4,21	4,58	4,65

Continua

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
Nitrogênio total (g/100g EST)	6,56	7,45	7,08	6,75	6,77	6,44
Proteína (g/100g)	20,21	26,15	27,53	26,89	29,23	29,67
Proteína (g/100g EST)	41,94	47,54	45,26	43,09	43,23	41,08
Cloretos (g NaCl/100g)	0,669	0,709	0,828	0,860	0,973	1,030
Cloretos (g NaCl/100g EST)	1,388	1,289	1,361	1,378	1,439	1,426
Cloretos (%NaCl na	1,275	1,551	2,070	2,237	2,916	3,575
Lactose (g/100g)	2,11	0,23	Nd	Nd	nd	nd
Lactose (g/100g EST)	4,38	0,42	Nd	Nd	nd	nd
A <sub>w</sub>	0,990	0,974	0,963	0,956	0,941	0,935

**TABELA 4 - Análise dos Leites no Verão**

	Produtor A	Produtor B	Produtor C
Acidez Titulável (g ácido lático/100mL)	0,175	0,206	0,247
pH	6,72	6,65	6,75
Gordura* (g/100mL)	3,55	3,27	2,67

\* Método do Butirômetro

**TABELA 5 - Resultados Físico-Químicos do Inverno****Produtor A**

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
pH externo	-	5,07	4,98	5,12	5,11	5,16
pH interno	6,42	4,99	4,98	5,11	5,08	5,15
pH em solução	6,55	5,03	5,03	5,11	5,18	5,26
Acidez titulável (g ácido lático/100g)	0,299	0,921	1,035	1,200	1,070	1,030

Continua

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
Acidez titulável (g ácido láctico/ 100g EST)	0,644	1,635	1,833	1,977	1,708	1,597
Umidade (g/100g)	53,56	43,67	43,54	39,29	37,35	35,52
Extrato seco (g/100g)	46,44	56,33	56,46	60,71	62,65	64,48
Cinza (g/100g)	2,34	2,72	2,82	2,80	3,08	3,31
Cinza (g/100g EST)	5,04	4,83	4,99	4,61	4,92	5,13
Gordura (g/100g)	19,14	23,54	24,81	27,50	28,29	28,81
Gordura (g/100g EST)	41,21	41,79	43,94	45,30	45,15	44,68
Nitrogênio total (g/100g)	3,48	4,10	4,23	4,32	4,55	4,68
Nitrogênio total (g/100g EST)	7,49	7,28	7,49	7,11	7,26	7,26
Proteína (g/100g)	22,21	26,18	26,99	27,63	29,05	29,87
Proteína (g/100g EST)	47,82	46,48	47,80	45,51	46,37	46,32
Cloretos (g NaCl/100g)	0,266	0,297	0,310	0,366	0,386	0,386
Cloretos (g NaCl/100g EST)	0,573	0,527	0,549	0,603	0,616	0,599

Continua

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
Cloretos (%NaCl na umidade)	0,494	0,675	0,707	0,923	1,023	1,075
Lactose (g/100g)	2,42	0,30	0,43	Nd	nd	nd
Lactose (g/100g EST)	5,21	0,53	0,76	Nd	nd	nd
A <sub>w</sub>	0,987	0,974	0,971	0,972	0,967	0,967

**Produtor B**

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
pH externo	-	5,31	5,34	5,35	5,38	5,35
pH interno	6,65	5,15	5,31	5,36	5,38	5,37
pH em solução	6,67	5,34	5,48	5,46	5,57	5,51
Acidez titulável (g ácido láctico/100g)	0,118	0,654	0,623	0,730	0,546	0,817
Acidez titulável (g ácido láctico/ 100g EST)	0,303	1,197	1,081	1,230	0,873	1,261
Umidade (g/100g)	61,08	45,35	42,38	40,64	37,47	35,23

Continua

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
Extrato seco (g/100g)	38,92	54,65	57,62	59,36	62,53	64,77
Cinza (g/100g)	2,87	3,48	3,88	4,06	4,30	4,54
Cinza (g/100g EST)	7,37	6,37	6,73	6,84	6,88	7,01
Gordura (g/100g)	16,96	22,936	22,88	23,88	26,48	26,44
Gordura (g/100g EST)	43,58	41,96	39,70	40,23	42,35	40,82
Nitrogênio total (g/100g)	2,78	3,91	4,31	4,22	4,69	4,90
Nitrogênio total (g/100g EST)	7,14	7,15	7,48	7,11	7,50	7,56
Proteína (g/100g)	17,73	24,95	27,50	26,93	29,95	31,29
Proteína (g/100g EST)	45,55	45,65	47,73	45,37	47,90	48,31
Cloretos (g NaCl/100g)	1,165	1,100	1,171	1,299	1,321	1,387
Cloretos (g NaCl/100g EST)	2,99	2,01	2,03	2,19	2,11	2,14
Cloretos (%NaCl na umidade)	1,872	2,368	2,689	3,097	3,405	3,788
Lactose (g/100g)	1,92	0,24	0,36	Nd	nd	nd
Lactose (g/100g EST)	4,93	0,44	0,62	Nd	nd	nd
A <sub>w</sub>	0,979	0,968	0,964	0,961	0,954	0,951

**Produtor C**

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
pH externo	-	4,96	4,96	5,04	5,04	5,03
pH interno	5,65	4,81	4,84	5,03	4,98	4,92
pH em solução	5,65	4,93	5,08	5,14	5,15	5,14
Acidez titulável (g ácido láctico/100g)	0,452	1,040	1,203	1,236	1,160	1,156
Acidez titulável (g ácido láctico/ 100g EST)	1,057	1,966	2,152	2,043	1,800	1,609
Umidade (g/100g)	57,26	47,10	44,10	39,50	35,57	28,18
Extrato seco (g/100g)	42,74	52,90	55,90	60,50	64,43	71,82
Cinza (g/100g)	2,17	3,61	3,30	3,43	3,51	4,46
Cinza (g/100g EST)	5,08	6,82	5,90	5,67	5,45	6,21
Gordura (g/100g)	16,57	19,66	20,61	21,84	23,09	29,95
Gordura (g/100g EST)	38,77	37,16	36,97	36,10	35,84	41,70
Nitrogênio total (g/100g)	3,44	4,10	4,45	4,86	5,22	5,54

Continua

	Coalhada	Queijo de 7 dias	Queijo de 14 dias	Queijo de 28 dias	Queijo de 42 dias	Queijo de 60 dias
Nitrogênio total (g/100g EST)	8,05	7,75	7,96	8,03	8,10	7,71
Proteína (g/100g)	21,97	26,16	28,38	31,02	33,29	35,37
Proteína (g/100g EST)	51,40	49,45	50,77	51,27	51,67	49,25
Cloretos (g NaCl/100g)	0,136	1,207	0,816	1,056	1,479	1,345
Cloretos (g NaCl/100g EST)	0,318	2,282	1,460	1,745	2,295	1,873
Cloretos (%NaCl na umidade)	0,237	2,499	1,817	2,604	3,992	4,555
Lactose (g/100g)	2,17	0,36	nd	Nd	nd	nd
Lactose (g/100g EST)	5,08	0,68	nd	Nd	nd	nd
A <sub>w</sub>	0,987	0,967	0,967	0,964	0,951	0,943



**TABELA 6 - ANÁLISE DOS LEITES DO INVERNO**

	Produtor A	Produtor B	Produtor C
Acidez Titulável (g ácido lático/100mL)	0,159	0,171	0,164
pH	6,64	6,71	6,63
Gordura* (g/100mL)	2,67	3,10	4,13
Lactose (g/100mL)	4,76	4,82	4,94
Nitrogênio Total (g/100mL)	0,52	0,58	0,56
Proteína (g/100mL)	3,35	3,70	3,60
Cloretos (g NaCl/100mL)	0,235	0,180	0,175
Cinzas (g/100mL)	0,731	0,767	0,729

\* Método do Butirômetro

ANEXO B – ARTIGO

**ANEXO B – ARTIGO**

Braz. J. Microbiol. vol.34 no.3 São Paulo July/Sept. 2003

→[download article in PDF format](#)

doi: 10.1590/S1517-83822003000300016



[Curriculum ScienTI](#)



[How to cite this article](#)

**FOOD MICROBIOLOGY**

## **Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of *Serrano* cheese during manufacture and ripening**

**Evolução das características microbiológicas e físico-químicas durante a elaboração e maturação do queijo Serrano**

**Claucia Fernanda Volken de Souza; Tiziano Dalla Rosa; Marco Antônio Zachia Ayub\***

BiotecLab, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

---

### **ABSTRACT**

Changes in the microbial flora present in six *Serrano* cheese batches (3 ripened in Summer and 3 in Winter) were studied during production and ripening, to microbiologically characterize this cheese, which is traditionally manufactured by farmers in the south of Brazil, using raw cow milk, without the addition of starter cultures. The levels of several

microbial groups were enumerated in the milk, curd and different stages of the 60-day long ripening period. Values of some physicochemical parameters, such as pH, titratable acidity, water activity, moisture and NaCl content were also determined. The correlation coefficients between these parameters and the microbial groups throughout ripening were determined. The influence of the season of the year was also studied. Results demonstrated that the microflora and the physicochemical characteristics of *Serrano* cheese changed significantly during the 60-day ripening period, especially in Summer. Almost all microbial groups reached their highest counts after the 7<sup>th</sup> day of maturation, steadily decreasing towards the end of the process. Higher microbial counts during the first week of ripening was accompanied by lactic acid production and, as a consequence, a sharp drop in the pH of cheese was observed. Lactic acid bacteria comprised the main microbial group present in *Serrano* cheese and their counts were similar to the total viable counts at all sampling points. The abundance of lactobacilli during the manufacture and ripening suggests that these microorganisms may play an important role in the production of *Serrano* cheese. In conclusion, this work shows the importance of ripening time being longer than 30 days to allow for microbiological stabilization of this artisanal product. Also, except for halotolerants and moulds counts, and for moisture content, there were no significant differences observed either for microbial counting or for physicochemical characteristics of the cheese concerning the season of the year in which the product was manufactured.

**Key words:** Serrano cheese, cheese ripening, food microbiology, lactic acid bacteria.

---

## RESUMO

As variações da microbiota de seis bateladas do queijo Serrano (3 maturadas no verão e 3 maturadas no inverno) foram estudadas durante a produção e maturação, com o objetivo de caracterizá-lo microbiologicamente. Este queijo é tradicionalmente elaborado com leite cru, sem a adição de cultura láctica, por produtores rurais do sul do Brasil. Vários grupos microbianos foram enumerados no leite, na coalhada e em diferentes estágios ao longo dos 60 dias de maturação. Também foram investigados alguns parâmetros físico-químicos, tais como pH, acidez titulável, atividade de água, umidade e teor de NaCl. Determinaram-se os coeficientes de correlação entre os valores desses parâmetros e as contagens dos microrganismos ao longo da maturação. A influência da estação do ano também foi estudada. Os resultados demonstraram que a microbiota e as características físico-químicas do queijo Serrano apresentaram variações significativas durante o período de maturação de 60 dias, principalmente no verão. A maioria dos grupos microbianos atingiram suas contagens máximas no queijo aos 7 dias, diminuindo progressivamente até o final da maturação. O aumento nas contagens durante a primeira semana de maturação foi acompanhado por um declínio acentuado no valor do pH, devido à produção de ácido pelos microrganismos. As bactérias lácticas constituíram-se no principal grupo microbiano do queijo Serrano e suas contagens foram similares as de microrganismos viáveis totais em todos os pontos amostrados. O grande número de lactobacilos durante a elaboração e maturação do queijo sugere que estes microrganismos possam ter um papel importante na produção deste queijo. Em conclusão, o trabalho aponta a importância de um tempo de maturação superior a trinta dias como fator de estabilização microbiológica deste produto artesanal, bem como o fato de ser um produto bastante homogêneo quanto às suas características físico-químicas e microbiológicas, independente da estação do ano, exceto para as contagens de halotolerantes e de bolores e do teor de umidade, que apresentaram diferenças significativas entre o verão e o inverno.

**Palavras-chave:** queijo Serrano, maturação do queijo, microbiologia de alimentos, bactérias lácticas.

---

## INTRODUCTION

As food markets expand and diversify, there is a growing interest in traditional dairy products manufactured at the farm level due to the uniqueness of such foods and the difficulties in mimicking them on an industrial scale. *Serrano* cheese, produced in the highlands of Rio Grande do Sul, south of Brazil, is a small scale industrial product with high acceptance by the consumer.

There is very little information available on the microbiology and physicochemical characteristics of artisanal Brazilian cheese. Presently, only the *Minas* cheese has been studied (14,15). *Serrano* cheese is a farm-made variety manufactured from raw milk, in a region located in an altitude of 950 m above sea level and the average temperatures range from 4°C to 13°C in winter and from 18°C to 26°C in Summer.

*Serrano* cheese is an uncooked, semihard product, with a strong flavour. Its rind is thin, uniform and smooth, with a soft straw-yellow colour and the cheese bulk has a whitish colour with irregularly distributed holes. It is consumed after a short period of ripening, usually 30 days, although the present Brazilian regulation on food safety for cheeses made from raw milk states a minimum ripening period of 60 days prior to consumption (5).

Although *Serrano* cheese is highly appreciated and consumed, its microbial flora and physicochemical characteristics are unknown. Such lack of knowledge is particularly critical, specially the microbiological quality, because this cheese is manufactured with raw milk and no commercial starters are used in its manufacture, fermentation occurring, therefore, by a natural process. Ripening depends entirely on natural microflora. These artisanal techniques, which include the use of raw milk, acidification by the indigenous lactic acid bacteria present in milk and absence of control of temperature and relative humidity in the maturation room, result in a lack of uniformity and quality of the final product.

The knowledge of microbiological and biochemical reactions in cheese can help to introduce process modifications necessary to improve the quality of products, without any loss in its characteristics. The aims of the present study were to investigate the changes in levels of the main microbial groups and in the physicochemical characteristics throughout the ripening process of *Serrano* cheese and the influence of the season of the year over these interactions. It is expected that this study will contribute to the establishment of microbiological quality standards for *Serrano* cheese, as well as to provide further scientific basis for the understanding of ripening process, which is necessary to improve farmhouse procedures.

## MATERIALS AND METHODS

### Cheese manufacturing

*Serrano* cheese is manufactured according to the following procedure. Whole raw milk is filtered and salted with 4-18g NaCl per litre of milk. Coagulation takes place at an average temperature of 35°C for 60-75 min by adding 4 g of commercial calf rennet (1: 65000 strength) per litre of milk. Once the right degree of consistency is attained, the curd is cut

and the whey is drained at 35-37°C. Then, the curd is transferred into perforated plastic molds following whey drainage for 24 h under pressure. Cheeses are allowed to mature without any temperature or humidity control, with variables changing only with year season, in a special maturing house. During ripening they are inverted daily and washed with warm water once a week, with ripening lasting for as long as 30 days. Approximately 10L milk are used to obtain flat-cylinder shaped cheeses with 14-17 cm of diameter, 4-7 cm high and weighing around 800-1200 g.

### **Sampling**

Six batches of *Serrano* cheese manufactured in three different dairies by experienced cheese makers following the traditional method, as described above, were studied. Three were manufactured in Summer (January), the others in winter (July). For every batch, milk, curd and cheeses of 7, 14, 28, 42 and 60 days of maturation were analyzed. Each sample consisted of one whole cheese. Sampling was performed according to International Dairy Federation (IDF) Standard 50B (18). All samples were transported to the laboratory under refrigeration at 4°C and analyzed on arrival.

### **Microbiological analysis**

Representative 25 g curd or cheese samples were homogenized with 225 mL of a sterile 2% (w/v) sodium citrate solution, previously warmed to 45°C, in a Stomacher Lab-Blender 400 (Seward Medical, England) for 1 min. Decimal dilutions were prepared in 90 mL of sterile 0.1% (w/v) peptone water and aliquots were plated in duplicate on a variety of media. Total viable count (TVC) and psychrotrophics were made on plate count agar incubated at 32°C for 48 h and 7°C for 10 days, respectively. Lactobacilli were enumerated on Rogosa agar acidified to pH 5.4 with acetic acid after incubation at 30°C for 5 days in an anaerobic jar (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, England) with anaerobiose produced by Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Germany). Lactococci were determined on M17 agar incubated at 30°C for 72 h. Proteolytic and lipolytic organisms were enumerated on plate count agar supplemented with reconstituted skim milk at 10% and tributyrin agar respectively, after incubation at 32°C for 72 h. Moulds and yeasts were determined on potato dextrose agar acidified with 10 mL/L of 10% (w/v) sterile tartaric acid incubated at 25°C for 5 days. Halotolerants were enumerated using mannitol salt agar at 32°C for 72 h. Fecal and total coliforms were enumerated on violet red bile agar after incubation for 24 h at 44 and 32°C, respectively. The surface spread technique was used for psychrotrophics, proteolytic and lipolytic organisms, halotolerants and for moulds and yeasts. The pour plate technique was used for TVC. The pour plate and overlay technique was used for lactobacilli, lactococci and fecal and total coliforms. After incubation, plates with 25-250 colonies were counted. All microbiological analysis were performed according to American Public Health Association (1). All media were from Oxoid (Unipath Ltd., Basingstoke, England).

### **Isolation procedure and identification of lactic bacteria**

For all sampling points, plates corresponding to dilutions of 25-50 colonies/plate were selected from M17 and Rogosa media. From each of these plates five to eight colonies, representing all different morphologies, were then picked at random. The isolates were purified by 4 cycles of subcultures on MRS broth and agar at 30°C and stored in MRS broth containing 20% (v/v) glycerol, at -12°C. Isolates were identified according to the criteria of Sharpe (28). In order to identify the genera several tests were applied: Gram staining, microscopic examination, catalase, growth at 10 and 45°C in MRS broth, salt tolerance (6.5% NaCl in MRS broth), L-arginine hydrolysis and production of carbon dioxide from glucose. These tests were performed according to techniques described by Harrigan and McCance (16).

### Physicochemical analysis

The pH of the milk was measured directly with a pHmeter DM 20 (Digimed, Brazil) and the titratable acidity of milk was measured following the method 947.05 (3). The pH and titratable acidity of curd and cheese were measured as described by the methods 14.022 (2) and 920.124 (4), respectively. The moisture content and the water activity ( $a_w$ ) were determined instrumentally using a MA30 Moisture Analyzer (Sartorius, Germany) and an Aqua Lab CX-2 Water Activity System (Decagon Devices, USA), respectively. The NaCl content was determined according to method 935.43 (4). All analyses were carried out in duplicates.

### Statistical analysis

Plate count data were transformed into logarithms prior to statistical treatment. Statistical analysis was performed using the SPSS software (29). Differences between the treatment means were compared at the 5% level of significance. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) in order to assess the statistical significance of the effect of ripening time in the microbial counts and physicochemical parameters and the Tukey's or Dunnett T3 test were performed for comparison of means. Comparison of means by the t test was used to determine the influence of the season of the year on the microbiological and physicochemical characteristics of cheese. Statistical correlations between log counts of the major microbial groups and physicochemical parameters investigated were assessed by the Pearson's correlation coefficient.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Changes in the microbial groups counts during ripening

The counts of the different microbial groups investigated during the manufacturing and ripening of Serrano cheese are shown in [Table 1](#).

An increase of around 1 log was found from milk to curd in the counts of the different microbial groups investigated, except for filamentous fungi. This increase in the number of microorganisms is a normal phenomenon in the manufacturing of cheese and it results partially from microbial multiplication during curdling and partially from the physical retention of these microorganisms in the curd when whey is run off. The low increase in the counts of all microbial groups of Serrano cheese may be explained by the short time interval between the collection of milk and curd samples (approximately 1.5 h), in which microbial multiplication is minimum. According to Tatini *et al.* (30), the physical retention of microorganisms in the curd allows for the 1 log increase in the counts, the remaining being due to microbial multiplication. For most microbial groups maximum counts were attained after 1 week of ripening, both in Summer and winter.

Significant differences in the counts of halotolerants and moulds were only detected in association to the season in which the cheeses were manufactured and ripened. For moulds, an increase in the counts was observed in the Summer production when compared to the winter, perhaps due to lower temperatures, which decreased the growth rate of this microbial population. For halotolerants a more pronounced decrease in Summer counts was observed, possibly due to environmental conditions, which is in agreement with the high coefficient of correlation ( $r=0.732$ ) between  $a_w$  and halotolerants in this season.

In the raw milk mean counts of 6.07 and 5.70 log were achieved for TVC. These high counts are likely to stem from poor hygiene conditions during milking and are similar to those found in milk used for the production of other cheeses (7,11,13,24) but lower than those determined in milk used in the manufacturing of Tafi (10) and León cheese (21). The number of CFU increased during the first week of ripening, achieving counts around 9.2-9.3 log, which, despite being higher than those found for Ulloa cheese (24), are similar to counts found for other varieties (7,8,10,21,27). According to Kosikowski (19), values of 9 log are normal in cheese produced with raw milk. The coefficients of correlation found between pH values and the TVC in Summer ( $r=-0.819$ ) and winter ( $r=-0.827$ ) suggest that this microflora may be comprised mainly of acid-tolerant microorganisms, as suggests correlations found between these counts and the titratable acid values ( $r=0.607$  and  $r=0.647$ , respectively).

The psychrotrophic counts in milk, 6.0 and 5.49 log, are similar to those found by other authors (13,21). A significant increase was observed in the number of these microorganisms in milk until the first week of ripening, attaining values similar to those of San Simón (13) and León (21) cheeses. From the maximum count achieved at the 7<sup>th</sup> day, a constant drop-off was observed until the end of the 60-day period. However, this reduction was more pronounced in Summer (3 log) in comparison with winter (1 log), possibly due to environmental conditions, which contributed to a quicker decrease in this microbial population; this is in agreement with the coefficient of correlation between  $a_w$  and these microorganisms in Summer ( $r=0.548$ ). The high amount of psychrotrophics in Serrano cheese represents a potential risk of deterioration of this product. This problem becomes even more important as most cheeses are sold within 30 days of production and consumers store them at refrigeration temperatures. There is a significant difference between the psychrotrophic counts in the 60-day cheese and that of younger cheeses showing that a 2-month ripening period is the key to a reduction of these counts.

The proteolytic counts were higher than the lipolytics, this may be an indication that proteolytic activity is greater than lipolytic activity in this cheese, which is common in this kind of short ripening period cheese (17). The coefficients of correlation attained between the titratable acidity values and the proteolytic counts in Summer ( $r=0.733$ ) and in winter ( $r=0.675$ ) suggest that this population may be mainly comprised of acid-tolerant microorganisms. The correlations obtained between these counts and the pH values of Summer samples ( $r=-0.758$ ) and winter samples ( $r=-0.701$ ) are in accordance with this hypothesis.

The counts of lactococci of the milk until the cheeses at 2 weeks were  $10^1$  to  $10^3$  times higher than those of lactobacilli, both being similar in the following stages due to a higher death rate of the lactococci population during the final phase. The same phenomenon was observed by Fontán *et al.* (13). Ordóñez and Burgos (24) observed an increase of lactobacilli during the ripening of Ulloa cheese and Tornadijo *et al.* (31) found that lactobacilli were the prevalent microbial group in the late ripening stages of Armada cheese. According to Peterson *et al.* (25), during the fermentative process of cheese the formation of several metabolites, such as lactate, citrate, glycerol, and amino acids, among others, which are better utilized by lactobacilli, takes place.

The halotolerant microflora found in milk and cheese (5-6 log) were similar to those of other cheese varieties, such as Casar de Cáceres (26), Arzúa (7), Tetilla (22) and San Simón (13). For León (21), Cebreiro (8), Afuega'l Pitu (9) and Anevato (17) cheeses, counts by 2-3 log units lower were found. These differences were probably due to pH variations, since these microorganisms are acid-sensitive. In this cheese and others that had a similar halotolerant microorganisms count, the pH was maintained around 5.0, favoring the development of this population. As these microorganisms were found in significant levels they might contribute

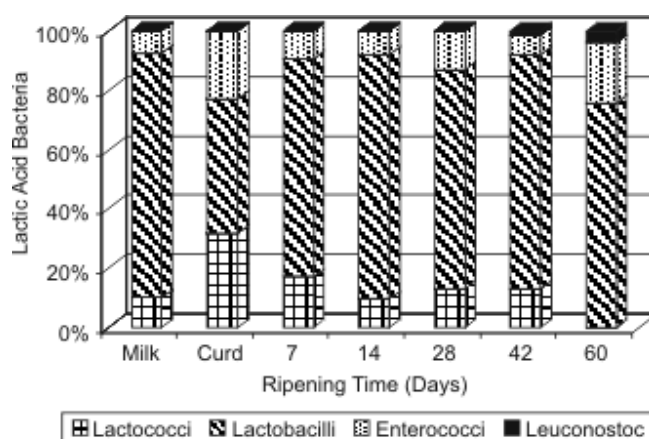
to the ripening process to some extent, through their lipolytic and proteolytic activities, playing a role in the change in texture and aroma development. However, as halotolerants include mainly the *Micrococcaceae* family, which is comprised of the genera *Micrococcus* and *Staphylococcus*, one must pay heed to this result, since there is a potential risk for consumer health if enterotoxin-producing coagulase-positive *Staphylococcus aureus* are present.

The counts of moulds and yeasts during ripening were similar to those found in other cheeses, such as Tetilla (22) and Arzúa (7). As ripening advances, there is an increase in cheese matrix compaction, which reduces the diffusion of the oxygen required for the multiplication of these microbial populations.

The high amount of total and fecal coliforms detected in raw milk is again an indication of the low hygienic quality of the raw material used in the manufacturing of this cheese. These microbial groups did not present significant variations in winter while, in Summer, the time of ripening had a significant influence over the counts of these populations and the 60-day ripening time was important for their reduction. An important feature regarding the sanitary-hygienic aspect is the absence of fecal coliforms in the end of the ripening process in Summer. The coefficients of correlation among the counts of total coliforms,  $a_w$  ( $r=0.527$ ) and moisture content ( $r=0.569$ ) show that these parameters influenced the decrease of this population in Summer. Total coliforms were not detected in Tafi cheese after 30 days of ripening due to low  $a_w$  (10). The higher temperatures at the maturation room in this season also showed influence over the coliform population. The 60-day old Manchego cheese ripened at 10°C had a count of 2.07 and 2.24 log for total and fecal coliforms, respectively; however, when ripening took place at 20°C, neither population was detected (23). Total coliforms had a higher decrease rate in La Serena cheeses ripened at 16.9°C than in those ripened at 13.6°C (12). The high levels of total and fecal coliforms may be the main cause for the formation of holes in Serrano cheese.

### Lactic acid bacteria isolated during ripening

Of a total of 484 isolates in cheese, 431 were identified as LAB. [Fig. 1](#) shows the distribution rate of lactic bacteria identified throughout the process of manufacturing and ripening.



**Figure 1.** Evolution of genera of LAB (431 strains) during manufacturing and ripening of *Serrano* cheese. Percentage of strains of each genera isolated from M17 and Rogosa at each stage.



The lactobacilli were the most abundant lactic bacteria, followed by enterococci and lactococci. The lactobacilli prevailed throughout the manufacturing and ripening process, especially in the late steps of the process, suggesting that these microorganisms play an important role in the production of this cheese and could be part of its lactic culture. Maybe the low ratio of lactococci and leuconostoc in the lactic isolates stems from adding salt to milk during cheese preparation, inhibiting the growth of these microorganisms. The low amount of heterofermentative lactobacilli and *Leuconostoc* spp. supports the hypothesis that the great number of holes in this cheese results from the high count of coliforms.

### **Changes in the physicochemical characteristics during ripening**

[Table 2](#) shows the evolution of the physicochemical characteristics investigated during the manufacturing and ripening of Serrano cheese.

The pH around 6.7 in raw milk used for the manufacturing of this cheese is similar to that of milk used for the production of other cheeses made from bovine milk (7,9,11,13,21). During the curdling process, the pH decreased significantly during the first week of ripening, when it hit the lowest values in the whole process; 5.3 in Summer and 5.1 in winter. This decrease by approximately 1.5 units is a consequence of the lactic acid production by lactic bacteria. Manchego cheese ripened at 10°C and 20°C had pH values of 5.07 and 5.28, respectively (23). The significant increase in pH between the first and the fourth ripening week in Summer result from the metabolic activity of mould and yeast, which use lactic acid as a source of carbon, and/or the proteolytic process that releases great amounts of nitrogenated alkaline compounds (31). In winter, the pH did not present significant variations after the 7<sup>th</sup> day of ripening. The lower temperatures of this period are likely to have reduced the intensity of biochemical reactions, resulting in a constant pH until the end of the process. The pH values during the ripening, mainly in Summer, favored the action of microbial proteases, which present maximum activity in the pH interval between 5.5-6.5 (6).

The more pronounced decrease in  $a_w$  in Summer is probably due to the greater water evaporation and hydrolysis of proteins during ripening in this hotter temperature period. The mean  $a_w$  values in the end of ripening was not low enough in order to control the growth of most microbial groups analyzed. No significant variation in  $a_w$  was detected between season productions. Cheese moisture, however, significantly varied between the two periods. Therefore, the reduction was better evidenced in the samples ripened in Summer, due to high temperature and lower relative air humidity in the maturation room, which cause an extensive dehydration. Margolles *et al.* (20) analyzed the effect of climatic conditions of the different seasons on the features of some Spanish cheeses and observed that only cheese moisture varied significantly, with the higher values detected in winter.

The low concentration of NaCl at the watery phase during the ripening process was not enough to inhibit the growth of microbial groups.

The evolution that physicochemical parameters undergo with the ripening of Serrano cheese does not produce markedly antagonistic conditions for any of the microbial groups investigated. Therefore, the progressive reduction of the microorganisms in the core of the cheese is not a consequence of a single inhibitory effect, but rather the combination of several factors.

Although the microbiological countings and the main physico chemical characteristics of Serrano cheese have shown to vary significantly during ripening, the production itself did not

present any important variations considering the season of the year, except for halotorant counts, moulds and moisture content of cheeses.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank CNPq, CAPES and FAPERGS for their financial support.

## REFERENCES

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. APHA, Washington, 1993.
2. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. AOAC, Washington, 1980.
3. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. AOAC, Arlington, 1990.
4. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. AOAC, Maryland, 1996.
5. Brasil. Portaria n. 146, de 7 de março de 1996. Aprova Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. *Diário Oficial*, Brasília, 11 de março de 1996, seção 1, p.3977-3979.
6. Choisy, C.; Desmazeaud, M.; Gripon, J.C.; Lamberet, G.; Lenoir, J.; Tourneur, C. Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado. In: Eck, A.(ed). *El Queso*. Omega, Barcelona, 1990.
7. Centeno, J.A.; Rodríguez-Otero, J.L.; Cepeda, A. Microbiological study of Arzúa cheese (NW Spain) throughout cheesemaking and ripening. *J. Food Safety*, 14:229-241, 1994.
8. Centeno, J.A.; Menéndez, S.; Rodríguez-Otero, J.L. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *Int. J. Food Microbiol.*, 33:307-313, 1996.
9. Cuesta, P.; Fernández-García, E.; González de Llano, D.; Montilla, A.; Rodríguez, A. Evolution of the microbiological and biochemical characteristics of Afuega'l Pitu cheese during ripening. *J. Dairy Science*, 79:1693-1698, 1996.
10. De Giori, G.S.; Valdéz, G.F.; Holgado, A.P.R.; Oliver, G. Microflora of Tafí Cheese: changes during manufacture and maturation. *J. Food Prot.*, 46:518-521, 1983.
11. 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.*, 9:737-746, 1999.
12. Fernandez del Pozo, B.; Gaya, P.; Medina, M.; Rodríguez-Marín, M.A.; Nuñez, M. Changes in the microflora of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *J. Dairy Res.*, 55:449-455, 1988.

13. Fontán, M.C.G.; Franco, I.; Prieto, B.; Tornadijo, M.E.; Carballo, J. Microbiological changes in "San Simón"cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. *Food Microbiol.*, 18:25-33, 2001.
14. Gomes, M.I.F.V.; Bonassi, I.A. Aspecto microbiológico do queijo tipo Minas Prensado. *Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"*, 50:23-26, 1995.
15. Gomes, M.I.F.V.; Bonassi, I.A. Evolução da microbiota durante a cura do queijo Minas Padronizado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 16:179-183, 1996.
16. Harrigan, W.F.; McCance, M.E. Biochemical tests for bacteria. In: Harrigan, W.F.; McCance, M.E.(eds). *Laboratory methods in foods and dairy microbiology*. Academic Press, London, 1976, p.66-81.
17. Hatzikamari, M.; Litopoulou-Tzanetaki, E.; Tzanetakis, N. Microbiological characteristics of Anevato: a traditional Greek cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 87:595-601, 1999.
18. International Dairy Federation. *Milk and milk products. Methods of sampling*. IDF, Brussels, 1985.
19. Kosikowski, F. *Cheese and fermented milk foods*. Brooktondale, New York, 1977.
20. Margolles, A.; Rodriguez, A.; Reyes-Gavilan, C.G. Some chemical and bacteriological characteristics of regional cheeses from Asturias, Spain. *J. Food Prot.*, 59:509-515, 1996.
21. Medina, M.L.R.; Tornadijo, M.E.; Carballo, J.; Sarmiento, R.M. Microbiological study of León Raw Cow-Milk Cheese, a Spanish Craft Variety. *J. Food Prot.*, 57:998-1006, 1995.
22. Menéndez, S.; Godínez, R.; Centeno, J.A.; Rodríguez-Otero, J.L. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of "Tetilla"raw cows-milk cheese. *Food Microbiol.*, 18:151-158, 2001.
23. Nuñez, M.; Gaya, P.; Medina, M. Influence of manufacturing and ripening conditions on the survival of *Enterobacteriaceae* in Manchego cheese. *J. Dairy Sci.*, 68:794-800, 1985.
24. Ordóñez, J.A.; Burgos, J. Étude de la variété de fromage "Ulloa". *Le Lait*, 57:150-163, 1977.
25. Peterson, S.D.; Marshall, R.T. Non starter lactobacilli in Cheddar Cheese. a review. *J. Dairy Sci.*, 73:1395-1410, 1990.
26. Poulet, B.; Huertas, M.; Sánchez, A.; Cáceres, P.; Larriba, G. Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. *J. Dairy Res.*, 58:231-238, 1991.
27. Quinto, E.; Franco, C.; Rodríguez-Otero, J.L.; Fente, C.; Cepeda, A. Microbiological quality of Cebrero cheese from Northwest Spain. *J. Food Safety*, 14:1-8, 1994.
28. Sharpe, M.E. Identification of the lactic acid bacteria. In: Skinner, F.A.; Lovelock, D.W.(eds). *Identification Methods for Microbiologist*. 2.ed. Academic Press, London, 1979, p.233-259.
29. SPSS software. *User's Guide*, Release 8.0, SPSS Inc., Chicago, 1998.
30. Tatini, S.R.; Jezeski, J.J.; Morris, H.A. Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. *J. Dairy Sci.*, 54:815-825, 1971.

[ [Medline](#) ]

31. Tornadijo, M.E.; Fresno, J.M.; Bernardo, A.; Sarmiento, R.M.; Carballo, J. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Lait*, 75:551-570, 1995.

Received: October 21, 2002; Returned to Authors for corrections: May 22, 2003; Approved: July 08, 2003

\* Corresponding author. Mailing address: BiotecLab, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500. 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: (+5551) 3316-6685. E-mail: [mazayub@ufrgs.br](mailto:mazayub@ufrgs.br)

## Brazilian Journal of Microbiology

Print ISSN 1517-8382

© 2006 SBM

**Departamento de Microbiologia - ICB II - USP**  
**Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Sala 214**  
**Cidade Universitária**  
**05508-900 São Paulo SP - Brasil**  
**Tel. / Fax: (55 11) 3813-9647**



[bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)