

ELISÂNGELA MICHELE MIGUEL

**ATIVIDADE DE ETANOL DESIDROGENASE DURANTE A ESTOCAGEM
EM CULTURAS USADAS NA PRODUÇÃO DE IOGURTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – Brasil
2003**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M636a
2003

Miguel, Elisângela Michele, 1977-

Atividade de etanol desidrogenase durante a estocagem em culturas usadas na produção de iogurte / Elisângela Michele Miguel. – Viçosa : UFV, 2003.
39p. : il.

Orientador: Célia Alencar de Moraes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Etanol desidrogenase - Atividade enzimática. 2. Leite fermentado. 3. Bactérias produtoras do ácido láctico. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 589.950419258

CDD 20.ed. 589.950419258

ELISÂNGELA MICHELE MIGUEL

**ATIVIDADE DE ETANOL DESIDROGENASE DURANTE A ESTOCAGEM
EM CULTURAS USADAS NA PRODUÇÃO DE IOGURTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 22 de agosto de 2003.

Prof. Sebastião César Cardoso Brandão
(Conselheiro)

Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz
(Conselheira)

Prof^a. Miriam Terezinha dos Santos

Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti

Prof^a. Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

A meus pais, à tia Adelaide, a meus irmãos, a meus sobrinhos e a meus avós,
com muito amor, carinho e dedicação.

*Mas é claro que o sol
vai voltar amanhã.
Mais uma vez, eu sei,
escuridão já vi pior de endoidecer gente sã.
Espera que o sol já vem.
Nunca deixe que lhe digam
que não vale a pena acreditar
no sonho que se tem,
ou que seus sonhos nunca vão dar certo
ou que você nunca vai ser alguém.
Se você quiser alguém em quem confiar,
confie em si mesmo.
Quem acredita, sempre alcança.
(Renato Russo)*

AGRADECIMENTO

A Deus, que sempre me conduziu, proporcionando-me muita fé, força e determinação para vencer os obstáculos da vida.

À minha família, por ser meu alicerce e espelho de vida, pelo amor, pelo incentivo, conforto e compreensão e pelas palavras de carinho em todos os momentos, os quais foram imprescindíveis para seguir em frente, vencer e ser quem sou.

À minha mãe pelo exemplo de vida, dedicação, persistência e garra, para que sempre lutássemos e acreditássemos em nossos sonhos; pelo meu pai, pelo otimismo e pela segurança que nos fortalecem e nos levam a seguir em frente.

À Tia Adelaide, pelo amor, pelo carinho, pela compreensão e paciência e, sobretudo, pelos ensinamentos de conduta de vida... este ser mais humano e completo que conheço!!!

A minhas irmãs Elis, por ser minha *alma gêmea*, amiga, sincera e companheira e por me completar, fazer feliz e realizada; e à Eleusy, pelas palavras de afeto e amizade em todos os momentos.

Aos meus irmãos Miguel e Eliseu, companheiros inseparáveis que, com muito amor, carinho e compreensão, me fazem sentir feliz.

A Many, Du, Paula, Paty, Douglas e Sandrinha, crianças encantadoras que com candura e meiguice, me confortam com sorrisos, carinho e inocência e sempre me mostram o sentido da vida.

A minha avó, avô e tios, pelas lições de vida, pelos ensinamentos de amor à vida e por me proporcionarem os domingos inesquecíveis com muita paz e união, nos quais eu me renovava para ter forças pra seguir em frente.

Aos meus cunhados e cunhadas, por engrandecerem a minha família e fazerem meus irmãos e irmãs felizes.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento e pela oportunidade de realização deste curso.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela oportunidade e confiança para a realização deste trabalho.

Aos professores Maria Cristina Dantas Vanetti, Marisa Vieira de Queiroz, Sebastião César Cardoso Brandão e Míriam Terezinha dos Santos, membros da equipe, pela atenção e pelas oportunas considerações e sugestões.

Aos professores Jorge Luiz Cavalcante Coelho e Hilário Mantovane, que, embora não tenham feito parte da equipe, deram expressiva contribuição e incentivo, confortando-me com palavras amigas durante os momentos difíceis.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos e pelas experiências de vida.

Ao grande amigo Raul Raya, membro do CERELA da Argentina, pela atenção, pela compreensão, pelo incentivo e pelas importantes sugestões, essenciais para ter confiança em mim e desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos dos laboratórios do Departamento de Química, LASA e LPPN, que me acolheram com carinho e amizade, principalmente Eduardo e José Luiz, que estiveram ao meu lado ajudando-me com paciência e atenção, transferindo conhecimentos com muito companheirismo, e, nos momentos mais difíceis, sempre me fazendo sorrir e acreditar.

Aos professores Gulab Jam e Luiz Cláudio Almeida, que me acolheram e abriram as portas pra que eu realizasse meu experimento no Departamento de Química, pela compreensão, pela paciência e pelo incentivo.

A Fábio Coelho, pelo incentivo, pela amizade e pela paciência na realização das análises dos resultados.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente Nilcéia, Laura e Aparecida, Sr. Paulo, Toninho, Sr. Raimundo, Esquilo, José Reinaldo, Evandro, pela atenção e simpatia e por resolverem todos nossos problemas com boa vontade e compreensão, mesmo na última hora.

Aos amigos inesquecíveis do Laboratório de Microbiologia Industrial, Marciana, Néia, Simone, Inês, Léo, Fernanda, Maurício, Gustavo, Cida, Patrícia e Juliana que sempre me deram toda força com palavras amigas, principalmente Néia e Simone, que sempre me acolheram com carinho e paciência em todos os momentos, mesmo os de “choradeiras” no laboratório, quando tudo dava errado.

Ao meu amigo Zezinho, meu *fiel-escudeiro*, por ser essa pessoa maravilhosa e encantadora, por ter-me ajudado com carinho e afeto e pela amizade sincera que me põe pra cima nos momentos mais difíceis e sempre me acompanhava, mesmo com uma música bem legal, nos dias de faxina do laboratório.

À minha companheira de graduação e pós-graduação, Marciana (*Tico e Teco*), pela sinceridade e pelo companheirismo em todos os momentos, sempre pronta a me ajudar pro que der e vier.

Aos estagiários do Laboratório, Marta, Sílvia, Alessandra, Simone, Manoela, Ana, Lorena, Júlia, pela boa vontade e pelos momentos de descontração no cafezinho e nos intervalos entre os experimentos, com palavras de atenção e amizade, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Às companheiras Eliseth, Rachel, Patrícia, Natasha e Wanessa e aos companheiros André e Zeca, pessoas maravilhosas, agradeço pela amizade sincera, pela força e palavras de carinho e por estarem sempre presentes, ouvindo-me e ajudando-me em todos os momentos, além de momentos inesquecíveis que vivemos nas noites viçosenses...Sempre organizadas pela Rachelzinha!!

Às amigas Margarete, Patrícia, Cleusa, Aurélia, Marília e ao amigo Serginho, pelo companheirismo e pela compreensão e por quem tenho tanta admiração e carinho.

Aos colegas da Genética, Fisiologia e Micorriza, pelo agradável convívio e pela descontração pelos corredores do Bioagro.

Aos alunos de MBI 100, pelo excelente convívio e por ajudarem-me a lecionar a disciplina com afinco e prazer, fazendo-me crescer pessoal e profissionalmente.

BIOGRAFIA

Elisângela Michele Miguel, filha de José Miguel e Therezinha Martins Cunha Miguel, nasceu em 30 de julho de 1977, em Curitiba-PR.

Em 1995, ingressou no Curso de Tecnologia em Laticínios, na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2000.

Em agosto de 2000, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na mesma Instituição.

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	15
3.2. Atividade de etanol desidrogenase em meio sólido.....	16
3.3. Atividade de etanol desidrogenase em meio líquido.....	17
3.3.1. Extrato livre de células.....	17
3.3.2. Ensaio da atividade enzimática.....	18
3.4. Análise da produção de compostos de aroma.....	18
3.4.1. Preparo das amostras.....	18
3.4.2. Análise cromatográfica.....	18
3.4.3. Identificação dos compostos voláteis.....	19
3.5. Verificação do pH das amostras.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1. Atividade de etanol desidrogenase em meio sólido.....	20
4.2. Atividade de etanol desidrogenase em meio líquido.....	22
4.3. Produção de compostos de aroma.....	24
4.4. pH em culturas em LDR.....	30

5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

RESUMO

MIGUEL, Elisângela Michele, MS., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2003. **Atividade de etanol desidrogenase durante a estocagem em culturas usadas na produção de iogurte.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Conselheiros: Marisa Vieira de Queiroz e Sebastião César Cardoso Brandão.

A atividade de etanol desidrogenase, ADH, foi investigada em espécies de bactérias usadas na fabricação do iogurte, *Streptococcus thermophilus* NCDO 1968, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, e da linhagem probiótica *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, após crescimento a 37°C por 12 horas e estocagem a 4°C por 21 dias. Em meio indicador de álcool, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *L. acidophilus* apresentaram resultado positivo para atividade de ADH, enquanto *L. delbrueckii* UFV H2b20, resultado negativo. A detecção da atividade, nesse meio, não foi discriminatória para *S. thermophilus*. A atividade de ADH, em meio líquido, foi determinada pela medida da oxidação de NAD(P)H e expressa em μmoles de NAD(P)H oxidado por minuto por mg de proteína. A atividade em *L. acidophilus* foi, em média de $1,06 \times 10^{-7} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, aumentando para $9,17 \times 10^{-7} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, após a estocagem das células em meio MRS, por 5 dias, a 4°C. Também houve aumento de atividade de ADH nos extratos livres de células

de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*. Os resultados em meio líquido mostraram que as três culturas apresentaram baixa atividade de ADH durante a estocagem por 21 dias, a 4°C. A metodologia baseada em GC/MS, por *headspace*, permitiu detectar acetaldeído produzido por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* e *S. thermophilus*, o qual produziu acetaldeído somente após a estocagem a 4°C. Entretanto, a atividade de ADH não foi observada após a incubação para crescimento a 37°C, por 12 h, nem após a estocagem a 4°C por 21 dias, não sendo observada a produção de etanol, nas condições estudadas. Estes resultados não confirmam a hipótese de uma ADH que se manifestaria após longos períodos em baixas temperaturas, embora baixa atividade da enzima tenha sido detectada em meio líquido. Outros estudos são necessários.

ABSTRACT

MIGUEL, Elisângela Michele, MS., Universidade Federal de Viçosa, August, 2003.
Ethanol dehydrogenase activity in starter cultures for yoghurt under cold storage conditions. Adviser: Célia Alencar de Moraes. Committee members: Marisa Vieira de Queiroz and Sebastião César Cardoso Brandão.

Alcohol dehydrogenase, ADH, activity was investigated in *Streptococcus thermophilus* NCDO 1968, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, and the probiotic strain *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, after growth at 37°C for 12 hours, and storage at 4°C for 21 days. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. acidophilus* presented positive results for ADH activity in Alcohol Indicator Medium, while *L. delbrueckii* UFV H2b20 presented negative results after 21 days. This method was not discriminatory for *S. thermophilus*. ADH activity was also measured by the oxidation of NAD(P)H and expressed as μmol of NAD(P)H oxidized per min per mg protein. The average activity in *L. acidophilus* was $1,06 \times 10^{-7} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. The activity increased to $9,17 \times 10^{-7} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ after cells were kept in MRS medium at 4°C, for 5 days. Increases in ADH activity were also detected in cell free extracts of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus*. The three strains displayed low ADH activity in MRS broth after 21 days at 4°C. The headspace analysis by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy revealed

acetaldehyde production by *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* and *S. thermophilus*. The latter produced acetaldehyde only after storage at 4°C. Ethanol production was not detected. Despite some ADH activity was detected in liquid medium, the combined results do not support completely the hypothesis that ADH activity would be induced itself after storage at low temperatures. Other studies are still needed.

1. INTRODUÇÃO

O iogurte é um produto lácteo fermentado que sempre esteve presente em várias civilizações, a princípio fabricado de forma empírica e, posteriormente, pelo uso de recursos tecnológicos avançados. No mercado atual, o consumo desse produto tem aumentado gradualmente, em decorrência de alguns aspectos, como estabilidade econômica, investimentos em propagandas e estudos sobre novas tecnologias, pois produtos cada vez mais competitivos e de melhor qualidade estão disponíveis no mercado, respondendo às necessidades do consumidor.

A fermentação do iogurte é resultado da atividade de microrganismos das culturas *starter* que alteram os constituintes do leite e promovem a acidificação, o desenvolvimento da textura e viscosidade e a síntese de compostos aromáticos responsáveis pelo seu *flavor* característico.

O acetaldeído é o principal constituinte do aroma típico do iogurte, composto que pode ser formado por diferentes vias metabólicas das diversas culturas lácticas. Porém, relata-se que, durante certo período de estocagem do produto, ocorre a formação de etanol, a partir do acetaldeído, pela ação da enzima etanol desidrogenase. Esta redução acontece, provavelmente, pelo decréscimo na concentração de acetaldeído com incubação prolongada e sob condições de refrigeração. A deterioração do *flavor* na estocagem pode ser

causada pelos organismos da cultura *starter*, por meio da enzima etanol desidrogenase, o que afeta diretamente as suas características sensoriais, prejudicando, assim, a sua aceitação, bem como a sua comercialização no mercado de produtos lácteos.

Tendo em vista que a atividade dessa enzima diminui a vida-de-prateleira do iogurte e que as características sensoriais do iogurte desempenham papel importante para sua aceitação, este trabalho teve o objetivo geral de avaliar a atividade da enzima etanol desidrogenase em culturas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus* em meio à base de leite em temperaturas de refrigeração, durante o período equivalente à estocagem de iogurte. Assim, podem-se projetar e melhorar culturas mais adequadas para que o iogurte possa ter vida útil maior, melhores características sensoriais, bem como melhor qualidade, pois a qualidade do produto e a satisfação do consumidor são fundamentais para o sucesso e a comercialização dos produtos lácteos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A fermentação é um dos métodos de preservação do alimento que aumenta a vida-de-prateleira do leite, visto que a acidez preserva o produto. As tecnologias modernas de fermentação envolvem microrganismos lácticos específicos ao alcance da fermentação, sob condições exatas de pH, temperatura e conteúdo de água, e à produção produtos de qualidades nutricionais, físicas, químicas e sanitárias superiores. A modificação do leite por microrganismo afeta as propriedades físico-químicas e o valor econômico desse produto. As mudanças físico-químicas são refletidas em atributos como *flavor*, textura, aparência e valor nutritivo, enquanto as alterações econômicas são refletidas no aumento da vida-de-prateleira do leite, resultando na conversão de um leite fluido em produtos mais estáveis. A maioria dessas modificações ocorre pela ação de enzimas elaboradas por microrganismos que atuam em proteínas, lipídios e carboidrato no leite (KILARA e SHAHANI, 1978; SHAHANI e CHANDAN, 1979).

As bactérias do ácido láctico são caracterizadas por cocos e bastonetes Gram-positivos, não-esporulantes e normalmente não-móveis, os quais produzem ácido láctico como principal produto da fermentação. Crescem anaerobicamente, porém a maioria não é sensível a O₂, sendo, portanto, anaeróbios aerotolerantes (HOLZAPFEL e STILES, 1997; MADIGAN et al., 2000).

O iogurte é resultado da fermentação do leite por dois tipos de bactérias lácticas homofermentativas, *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que apresentam relação simbiótica durante o processamento do iogurte. O desenvolvimento da acidez é iniciado pelo *S. thermophilus* e finalizado pelo *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante os últimos estádios de incubação, a uma temperatura ótima de 45°C (RASH, 1990). Durante a fermentação, o *S. thermophilus* cresce rapidamente, utilizando-se de aminoácidos essenciais produzidos pelo *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que apresenta maior atividade proteolítica e hidrolisa a caseína em aminoácidos como glicina, histidina e valina (BAUTISTA et al., 1966). O *S. thermophilus* produz ácido láctico e ácido fórmico, reduzindo o pH a um nível ótimo para o crescimento do *Lactobacillus* (VERINGA et al., 1968; GALESLOT et al., 1968). A atividade proteolítica e o decréscimo do pH são importantes para determinar o crescimento associativo dessas bactérias (RAJAGOPAL e SANDINE, 1990). A temperatura de incubação dessas culturas pode influenciar a concentração, bem como os compostos produzidos por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que estimulam os cocos (MITCHELL-RADKLE e SANDINE, 1986). Os estreptococos são inibidos em valores de pH de 4,2 a 4,4, enquanto os lactobacilos suportam 3,5 a 3,8. Durante a fermentação, a taxa de crescimento de *S. thermophilus* decresce, enquanto o *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* continua a crescer e reduz o pH pela produção excessiva de ácido láctico (CAPLICE e FITZGERALD, 1999; HATTINGH e VILJOEN, 2001).

A produção de ácido láctico é o processo químico mais importante que ocorre durante a manufatura do iogurte. Esse ácido preserva o produto, desestabiliza a micela de caseína, o que leva à coagulação das proteínas, e exerce efeito antagonista contra microrganismos indesejáveis, além de contribuir para o aroma do iogurte (TAMINE e DEETH, 1980).

O defeito mais comum do iogurte é, provavelmente, a ausência de aroma e *flavor* característicos, a qual pode ser resultante do desenvolvimento inadequado do ácido. A superacidificação é o principal defeito, que pode ser decorrente do desbalanceamento da cultura utilizada na fabricação do iogurte. Isso indica que a acidez natural do iogurte, abaixo de pH 3,9, não é aceita pelos consumidores (RASH, 1990). Portanto, o iogurte é um produto de simbiose bacteriana, razão por que um controle adequado da proporção das bactérias presentes no produto não

é apenas recomendado, mas necessário. Em cultura desbalanceada (cocos: bastonetes 2:1), os lactobacilos ocorrem em baixas concentrações, quando comparado com a cultura balanceada (cocos: bastonetes 1:1), e os estreptococos têm crescimento limitado pelo baixo conteúdo de aminoácidos, o que diminui o metabolismo de ambas e prejudica a produção dos componentes do *flavor* do iogurte (BRANDÃO, 1980).

A transformação do leite em produtos organolepticamente aceitáveis, pelo processo fermentativo, requer atributos particulares das bactérias *starter*, dentre os quais se destaca o desenvolvimento de quantidades adequadas de compostos voláteis, como o acetaldeído e o diacetil. Esses compostos não devem ser produzidos em altas quantidades para não produzir defeitos nos produtos (MARSHALL, 1987).

O *flavor* típico do iogurte é devido ao ácido láctico e a vários compostos voláteis, como acetaldeído, acetona e diacetil, que são responsáveis pelo aroma e pelo *flavor* característicos e produzidos pelos microrganismos da cultura láctica (KEENAN e BILLS, 1968; SANDINE e ELIKER, 1970; SANDINE et al., 1972; TAMINE e DEETH, 1980; TAMINE e ROBSON, 1985; RYSSTAD e ABRAMSEN, 1987; KANG et al., 1988; GAAFAR, 1992; GEORGALA et al., 1995; OTT et al., 1997; KRANENBURG et al., 2002; WOUTERS et al., 2002).

Os componentes do *flavor* são produtos finais do metabolismo bacteriano, como conseqüência da necessidade da redução de piruvato, regenerando, assim, nucleotídeos de piridina para a via glicolítica. O lactato, CO₂, acetato e etanol são produtos finais do metabolismo, enquanto o acetaldeído e o diacetil são intermediários e sofrem, posteriormente, catabolismo, pois, uma vez presentes no produto final, podem ser reduzidos a outros compostos (MARSHALL, 1987).

Em concentrações relativamente altas de 15 a 30 ppm, o acetaldeído é considerado o principal componente do *flavor* do iogurte, embora essas concentrações em outros produtos lácteos, como queijo e manteiga, possam causar defeitos de *flavor*, descritos como “green” ou “yogurt-like” (LINDSAY et al., 1965; KEENAN e BILLS, 1968; SANDINE et al., 1972). O entendimento das vias metabólicas, a forma adequada de controlá-las e a escolha certa da cultura *starter* são muito importantes para a manufatura de produtos lácteos de boa qualidade (MARSHALL, 1987; OTT et al., 2000a).

A formação de acetaldeído no leite pelas bactérias do ácido láctico parece ser dependente das estirpes utilizadas na fermentação, que pode ser formado a partir de diferentes fontes: carboidratos, aminoácidos e ácido nucléico (LEES e JAGO 1978b; RAYA et al., 1986b; MARSHALL, 1987; GONZALEZ et al., 1994; OTT et al., 2000a). As principais vias que são sugeridas para formação de acetaldeído estão representadas na Figura 1.

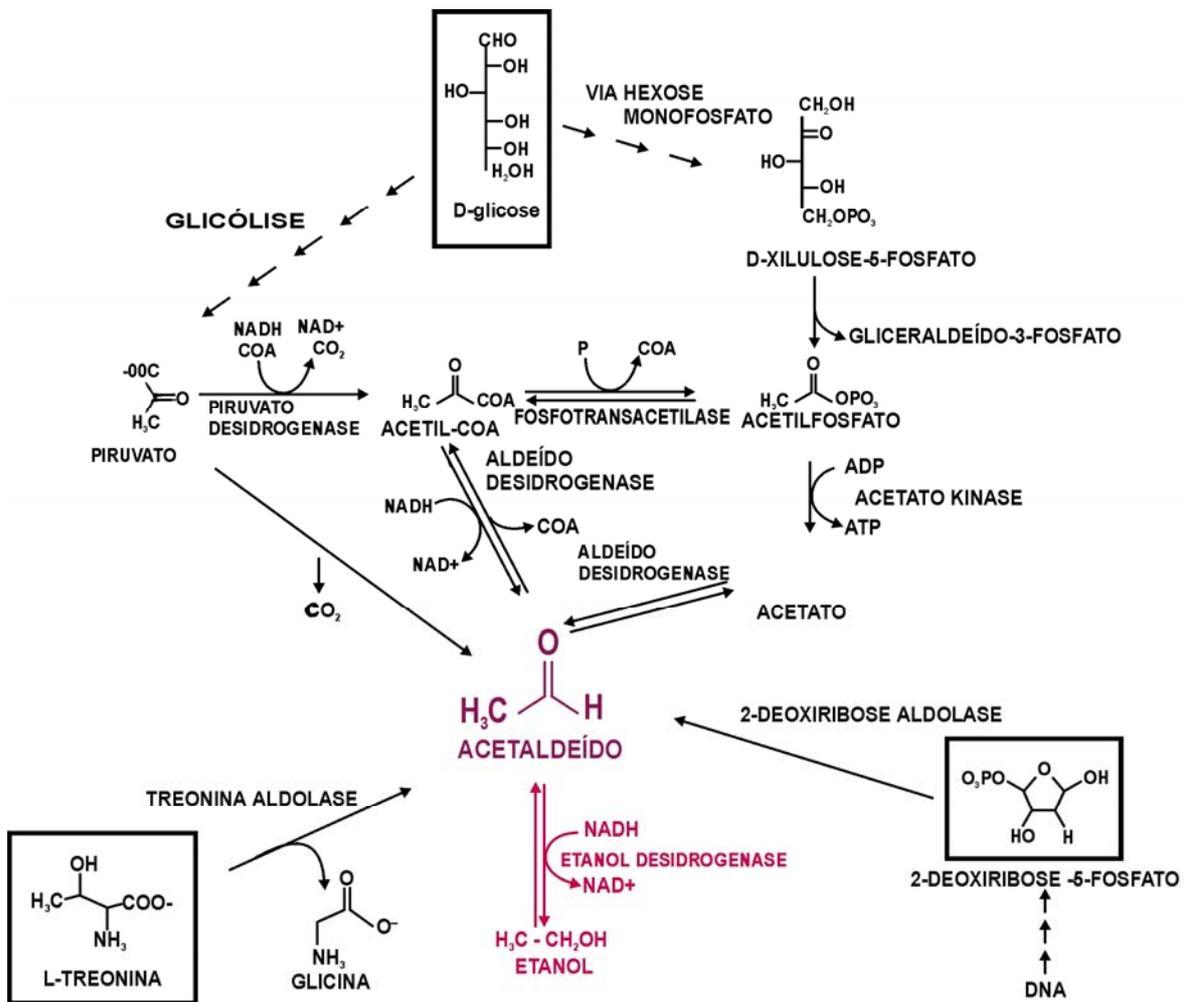


FIGURA 1 - Vias metabólicas de formação de acetaldeído (Adaptação de RAYA et al., 1986b).

2.1. Formação de acetaldeído a partir da glicose

Via **EMBDEN-MEYEHOF-PARNAS (EMP)**, que gera piruvato. Uma σ -carboxilase catalisa a formação de acetaldeído a partir do piruvato. A enzima aldeído desidrogenase pode também gerar acetaldeído a partir de Acetil-COA, que é formado a partir do piruvato pela ação da piruvato descarboxilase. As enzimas σ -carboxilase, aldeído desidrogenase e fosfocetolase foram detectadas por RAYA et al. (1986b), em duas estirpes de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Entretanto, LEES e JAGO (1976a) encontraram atividade de aldeído desidrogenase em quatro estirpes de cada espécie. A glicose foi o principal precursor de acetaldeído para *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (OTT et al., 2000a).

GONZALEZ et al. (1994) registraram ausência de atividade fosfocetolase e presença da enzima σ -carboxilase em estirpe de *L. acidophilus*. Em metabolismo homofermentativo, descarboxilações a partir da glicose não são freqüentemente observadas, no entanto, sob determinadas condições de crescimento, como baixa concentração de glicose, são possíveis de serem observadas.

Via **HEXOSE MONOFOSFATO (HMP)**, que gera acetil-fosfato. Uma fosfotranscetilase catalisa a formação de Acetil-COA a partir de acetilfosfato e uma acetato-kinase leva à formação de acetato. Embora RAYA et. al. (1986b) tenham detectado atividades em ambas as bactérias do iogurte, o acetaldeído não pode ser formado por essa via, uma vez que essas estirpes não possuem aldeído desidrogenase que catalisa a biossíntese de acetaldeído a partir de Acetil-COA ou acetato. Porém, LEES e JAGO (1976a) encontraram atividade da enzima aldeído desidrogenase nas bactérias do iogurte. As enzimas acetato-kinase e aldeído desidrogenase foram encontrados em estirpes de *L. acidophilus*, por GONZALEZ et al. (1994).

2.2. Formação de acetaldeído a partir de treonina

A treonina aldolase (E.C.2.1.2.1) catalisa a clivagem de treonina a acetaldeído e glicina e parece ser a via mais importante para produção de

acetaldeído no iogurte (SANDINE e ELLIKER, 1970; RAYA et al. 1986b, WOUTERS et al., 2002; CHAVES et al., 2002).

RAYA et al. (1986b) detectaram essa enzima em duas estirpes de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e ausência desta em duas estirpes de *S. thermophilus* investigadas. Porém, em outros estudos, essa enzima foi detectada em ambas as espécies (LEES e JAGO, 1976b; WILKINS et al., 1986a; MARRANZANI et al., 1989; OTT et al., 2000a).

A atividade treonina aldolase de *S. thermophilus* decresceu, significativamente, quando a temperatura de crescimento aumentou de 30 a 37°C (LEES e JAGO, 1976b) ou de 37 a 42°C (WILKINS et al., 1986b), mas não a de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que permaneceu quase idêntica a 30°C. A adição de 0,6% de treonina ou 2% de glicina ao meio de crescimento não afetou, significativamente, a atividade específica de treonina aldolase em extratos livres de células (LEES e JAGO, 1976b). *S. thermophilus* é mais sensível à inibição por glicina do que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (MARRANZANI et al., 1989).

Em culturas mistas do iogurte, altas concentrações de treonina, combinadas com baixas concentrações de glicina no meio de crescimento, aumentaram a biossíntese da enzima (MARRANZANI et al., 1989; SCHIMIDT et al., 1989). Quando essa proporção foi invertida, observou-se um decréscimo.

A treonina aldolase de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foi parcialmente purificada e estudada por MANCA DE NADRA et al. (1987) e por RAYA et al. (1986a). A atividade máxima foi observada a 40°C e pH 6,5, bem como forte inibição alostérica por glicina dependente do pH.

OTT et al. (2000a) encontraram atividade treonina aldolase em ambas as culturas de iogurte. Ressaltaram ainda que, na presença de altas concentrações artificiais de L-treonina, há maiores quantidades de acetaldeído do que na de glicose, com repressão da via metabólica da glicose. Assim, se o acetaldeído fosse formado principalmente pela via glicolítica, a treonina teria pequena participação em sua formação.

A atividade treonina aldolase foi detectada em *L. acidophilus*, mas em quantidades menores que nas bactérias do iogurte (GONZALEZ et al., 1994).

MARSHALL e COLLE (1983), ao estudarem a adição de treonina ao leite fermentado com essa bactéria, observaram acréscimo na concentração de acetaldeído, além de um produto com sabor e aroma semelhantes aos do iogurte.

O acetaldeído é formado pela degradação de aminoácidos. A glicina, resultante da ação de treonina aldolase sobre a treonina, é, subseqüentemente, convertida a serina pela ação da serina hidroximetiltransferase (SHMT), e ambos os compostos são principais fontes de unidades de um carbono e necessárias a vias que envolvem o ácido fólico (OGAWA et al., 2000; WOUTERS et al., 2002).

CHAVES et al. (2002), ao investigarem o papel e a importância da bactéria *S. thermophilus* para produção de acetaldeído, observaram que a principal via de formação para o acetaldeído, a partir da treonina, ocorre por meio da atividade de SHMT, que atua também como treonina aldolase. Esse resultado indica a ausência de uma via alternativa para produção de acetaldeído e estabelece a importância dessa enzima para sua biossíntese.

2.3. Formação de acetaldeído a partir de compostos de DNA

Na degradação de produtos de DNA, 2-deoxiribose-5-fosfato mostrou ser um precursor de acetaldeído, na presença de deoxiriboaldolase (EC 4.1.2.4), nas estirpes de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* (LEES e JAGO, 1977; RAYA et al., 1986b). A contribuição dessa rota metabólica pode ser pequena, e a própria degradação de DNA, durante o crescimento exponencial, deve ser baixa (OTT et al., 2000a).

A enzima deoxiriboaldolase, detectada em *L. acidophilus*, não requer citrato. A presença dessa enzima sugere que, nessa bactéria, essa via alternativa seja utilizada quando açúcares fosforilados, como ribose-5-fosfato, estiverem presentes (GONZALEZ et al., 1994).

Durante a estocagem do iogurte, mudanças microbianas, enzimáticas e abióticas ou químicas podem ocorrer. A atividade enzimática é devida, principalmente, às enzimas produzidas pelas bactérias do iogurte, uma vez que as enzimas na mistura, para manufatura do iogurte, são inativadas pelo tratamento térmico. A ação das enzimas pode causar defeitos, tais como formação de gás, separação de soro, rancidez, sabor de queijo e superacidificação, dependendo das propriedades da cultura (BRANDÃO, 1980).

O *flavor* do iogurte não é totalmente formado no final da incubação. Durante o resfriamento e estocagem refrigerada, perdas de *flavor* podem ocorrer durante a estocagem prolongada como resultado de reações enzimáticas

(KEENAN e BILLS, 1968; KANG et al., 1988; GEORGALA et al., 1995), que podem ser decorrentes também da cultura, das formulações e das condições de incubação e estocagem (TAMINE e DEETH, 1981; TAMINE e ROBINSON, 1985).

O iogurte estocado até quatorze dias mostrou pequena diminuição do conteúdo de acetaldeído e pequeno aumento no conteúdo de etanol. Porém, após esse período, observou-se aumento no conteúdo de etanol, com concomitante decréscimo no conteúdo de acetaldeído. Essas transformações sugerem que a atividade da etanol desidrogenase, ADH, seja muito importante durante a estocagem do iogurte, principalmente depois de aproximadamente 14 dias de estocagem (BRANDÃO, 1980).

A atividade desidrogenase ocorre a baixas temperaturas de estocagem por alguns estreptococos lácticos, que são capazes de reduzir o acetaldeído e o propionaldeído, mas não a acetona ou a butanona, o que sugere que o sistema desidrogenase seja específico a aldeídos (BILLS e DAY, 1966).

KEENAN e LINDSAY (1967), ao estudarem a atividade desidrogenase em diferentes lactobacilos, reportaram que todos os organismos estudados foram capazes de reduzir acetaldeído e propionaldeído ao álcool correspondente. BRANDÃO (1980) comparou a produção de etanol, entre culturas, com diferentes proporções de estreptococos:lactobacilos, balanceada (proporção 1:1) e desbalanceada (proporção 2:1), durante a estocagem do iogurte. Durante a estocagem, o iogurte feito a partir da cultura balanceada apresentou equilíbrio molecular entre acetaldeído e etanol, o qual pode ser atribuído à atividade da etanol desidrogenase, enquanto o iogurte, feito com cultura desbalanceada, apresentou a mesma proporção indireta entre acetaldeído e etanol, embora não tenha sido observado equilíbrio molecular, o que indica possível presença de outras enzimas ativas que podem desempenhar importante papel para a estabilidade do *flavor* do iogurte, pois a cultura desbalanceada não mostrou relação molecular entre acetaldeído e etanol.

RAYA et al. (1986b), ao estudarem a atividade de ADH, reportaram ausência de atividade dessa enzima em estirpes de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, após 12 horas de incubação a 37°C.

MARSHALL e COLE (1983) afirmaram que o leite fermentado com *L. acidophilus* teria propriedades diferentes do fermentado com *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, devido à atividade de etanol desidrogenase. Como esta enzima está

presente no primeiro microrganismo, o leite apresentaria falta de *flavor* característico, uma vez que o acetaldeído seria metabolizado a etanol. Ao contrário de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que não apresenta atividade dessa enzima, o iogurte teria altas concentrações de acetaldeído, com *flavor* típico. Portanto, segundo esses autores, a presença de ADH em culturas *starter* usadas na manufatura de iogurte é indesejável. O mesmo resultado foi obtido por GONZALEZ et. al. (1994) para *L. acidophilus*, após baixo tempo de incubação sob temperatura ótima de crescimento, para esses microrganismos estudados.

Tendo em vista que existe muito interesse em adicionar *L. acidophilus* ao iogurte, com o objetivo de melhorar a atividade probiótica, uma seleção apropriada das estirpes a serem utilizadas é essencial para alcançar esses requerimentos. Outra vantagem do uso dessa estirpe como cultura *starter* é a redução da possível superacidificação do iogurte, como ocorre pelo uso de culturas tradicionais, como consequência do crescimento desbalanceado de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (GARDINI et al., 1999).

O conhecimento das vias metabólicas que levam à produção do *flavor* desejável é importante para a escolha adequada da cultura *starter* usada na fabricação de leites fermentados. As duas bactérias geneticamente distintas, usadas na produção de iogurte, não contêm a enzima ADH. Portanto, o acetaldeído desses organismos não poderia ser reduzido a etanol, mas poderia ser excretado como um produto final. Então, leite fermentado com essas duas bactérias, com a cultura mista ou pura, poderia ter acetaldeído em altas concentrações, com *flavor* típico do iogurte (MARSHAL, 1987).

A concentração de acetaldeído no produto depende da presença de enzimas que o convertem em outros metabólitos, principalmente etanol. No iogurte, altas concentrações de acetaldeído ocorrem devido à baixa atividade da enzima etanol desidrogenase, que está ausente nas principais estirpes de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* (LEES e JAGO, 1976a; LEES e JAGO, 1978b).

A ocorrência de repressão catabólica da síntese de ADH em estreptococos depende da concentração de lactose do meio de crescimento e das altas temperaturas usadas na fabricação do iogurte, que podem diminuir a atividade dessa enzima. Há a possibilidade de que a função principal de algumas ADHs em bactérias possa ser a oxidação ou a redução de outros compostos, além de etanol e acetaldeído. Outra questão a ser esclarecida é se o etanol poderia ser usado

como fonte de energia pelas bactérias do ácido láctico, após a fermentação de todos os carboidratos (LEES e JAGO, 1976a; LEES e JAGO, 1978a; LEES e JAGO, 1978b). Além disso, a possibilidade de que o etanol possa ser utilizado por outras vias, além das catalisadas por ADHs, não foi investigada em bactérias do ácido láctico.

Entretanto, BRANDÃO (1980) observou que, durante o processamento do iogurte, o etanol é produzido, supostamente, a partir de acetaldeído pela enzima etanol desidrogenase, ação enzimática que continua durante a estocagem, principalmente depois de quatorze dias, a 2°C. KEENAN e BILLS (1968) enfatizaram que a redução de acetaldeído acontece, provavelmente, pelo decréscimo na concentração de acetaldeído com incubação prolongada e sob condições de refrigeração. A deterioração do *flavor* na estocagem pode ser causada pelos organismos da cultura *starter*.

O meio indicador com sais de tetrazólio permite o discernimento entre as diferenças metabólicas dos organismos, por meio da cor das colônias por eles produzidos, como resultado da atividade desidrogenase (HOPWOOD, 1970).

A utilização desse meio é versátil, pois se trabalha com vários tipos de substratos e microrganismos, além de serem fáceis de preparar e de baixo custo. Seus componentes essenciais são ágar, nutrientes para crescimento em abundância, o substrato a ser testado e o composto indicador cloreto de trifeniltetrazólio, TTC (BOCHENER e SAVAGEAU, 1977).

As colônias, capazes de catabolizar o substrato reduzem o TTC e produzem o formazam, mudando a cor para vermelha, enquanto as colônias que não o catabolizam permanecem brancas. A intensidade da cor das colônias é proporcional à redução de TTC. As colônias com taxas intermediárias de catabolismo diferem, na intensidade, da coloração formada. Em todos os casos, a cor é estável, uma vez que a redução de TTC é irreversível. Na presença da enzima ADH, as células utilizam o etanol e as colônias mudaram a coloração de branca para vermelha, pois o TTC é reduzido a formazam. A redução de TTC é resultado do transporte de elétrons, que passa do substrato, por meio de reações enzimáticas do metabolismo central, até alcançar o TTC, para produzir o formazam (BOCHENER e SAVAGEAU, 1977).

As placas de meio indicador que contêm TTC são amplamente aplicadas em técnicas de genética molecular, para caracterização e isolamento de mutantes.

Em pesquisas já realizadas, utilizou-se meio indicador de álcool para caracterização e isolamento de mutantes de *Escherichia coli* e estirpes de *Salmonella* (DAILLY et al., 2001) que sofreram mutações no gene *adh*, que codifica a enzima etanol desidrogenase. As mudanças de coloração das colônias foram utilizadas na identificação desses mutantes (CLARK e CRONAN, 1980a; 1980b; GUPTA et al., 2000; HOLLAND-STALEY et al., 2000).

As bactérias do ácido láctico são amplamente usadas em técnicas de microbiologia molecular e de engenharia genética que envolvem a inativação de genes, para se estudar e obter vias de biossíntese e regulações metabólicas de compostos do *flavor*, de forma controlada, para produzir produtos com aroma desejável (MOMBELLI, 1999; KLEEREBEZEM, et al., 2000; WOUTERS et al., 2002; CHAVES et al., 2002; KRANENBURG et al., 2002).

A superprodução de acetaldeído em leite fermentado foi obtida em estirpes de *S. thermophilus* modificado, que foi construída por meio de clonagem do gene *glyA*, que codifica a enzima treonina aldolase (TA). Quando essa bactéria foi usada na fermentação, observou-se aumento na atividade TA, com considerável aumento da formação de acetaldeído. Isso mostra que essas estirpes poderiam ser utilizadas, como *starter*, na produção de leite fermentado com concentrações desejáveis de acetaldeído, por meio de engenharia metabólica dessa via, controlando assim, o *flavor* em produtos lácteos (CHAVES et al., 2002).

OTT et al (1999) estudaram as características de leites fermentados com cultura mista de *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* mutantes *lac-*, cujo gene codificador de β - galactosidase é inativo, e *S. thermophilus* selvagem, *lac+*. Esses autores verificaram que o produto apresentou acidez mais suave e não ocorreu pós-acidificação durante a estocagem, sendo a produção de acetaldeído foi relacionada com o crescimento potencial das bactérias usadas na fermentação. Os resultados dessa pesquisa mostraram que o mutante *lac-* da fermentação mista não contribuiu para a produção de acetaldeído, pois produziu duas a três vezes menor quantidade, se comparado ao produto tradicional, que foi fabricado com estirpes selvagens.

Em estirpes de *E. coli*, ADH é uma proteína multifuncional que catalisa a conversão de Acetil-COA em acetaldeído e então a etanol em uma redução em dois passos que é acoplada à oxidação de duas moléculas de NADH (CLARK e

CRONAN, 1980a; 1980b). O gene *adhE* de *Lactococcus lactis*, que codifica ADH, foi clonado em uma estirpe de *E. coli* mutante, e genes homólogos foram encontrados em outras bactérias lácticas que têm importância relevante para a indústria láctea. Essas culturas *starter*, com alta produção de acetaldeído poderiam ser obtidas por engenharia genética e metabólica, para melhoramento de *flavor* em produtos lácteos fermentados (ARNAU et al., 1998).

A análise química dos componentes de aroma dos produtos lácteos é complexa devido à natureza heterogênea do leite. Os níveis significantes de lipídeos, proteínas e carboidratos no leite dificultam a separação dos componentes do *flavor*, dadas as propriedades como polaridade ou volatilidade. Dentre os métodos cromatográficos, destaca-se a análise de *headspace*, na qual há equilíbrio da amostra e injeção em um cromatógrafo a gás com espectro de massa (FRIEDERICK e ACREE, 1998).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizado por meio da distribuição destes compostos entre duas fases que estão em contato. A amostra, através de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperatura no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização dessas substâncias, que, de acordo com suas propriedades, são seletivamente retidas pela fase estacionária e chegam à saída da coluna em tempos diferentes, resultando em migrações diferentes desses compostos. O uso de detector na saída da coluna possibilita a detecção e a quantificação dessas substâncias (COLLINS et al., 1997).

Os métodos de cromatografia gasosa são muito utilizados no controle de qualidade na indústria láctea, com o objetivo de determinar o potencial de deterioração do produto por meio da detecção de mudanças bioquímicas e no *flavor* durante a estocagem. A análise de cromatografia gasosa pode ser facilmente adaptada a estudos de controle de qualidade e vida-de-prateleira do iogurte, método este que oferece resultados rápidos e reprodutíveis (GAAFAR, 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia, no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Microrganismos e condições de cultivo

Os microrganismos utilizados neste estudo foram:

- *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* ATCC 11842;
- *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 (SANTOS, 1984), pertencente à coleção do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa;
- *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; e
- *Streptococcus thermophilus* NCDO 1968.

Os *Lactobacillus* foram previamente ativados em caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) e incubados a 37°C por 12 horas. Em seguida, as culturas foram transferidas, com a alça de repicagem, para placa de Petri contendo MRS acrescido de 1,5 % de ágar, empregando-se a técnica de estria composta. As placas foram incubadas, em baixa tensão de O₂, a 37°C por 72 horas.

O *Streptococcus* foi cultivado em meio TSB (Tryptone Soya Broth), a 37°C por 12 horas. Em seguida, as culturas foram transferidas, com a alça de repicagem, para placas de Petri contendo TSA (Tryptone Soya Agar), empregando-se a técnica de estria composta. As placas foram incubadas, sob aerobiose, a 37°C por 48 horas.

Após o período de incubação, as culturas lácticas foram submetidas à coloração de Gram e à análise microscópica. Essas culturas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas, a -80°C, em meios respectivos de cultivo acrescidos de 20% de glicerol, para serem utilizadas posteriormente.

3.2. Atividade de etanol desidrogenase em meio sólido

A determinação da atividade de etanol desidrogenase em meio sólido foi realizada em ágar indicador de álcool, com base na metodologia desenvolvida por DAILLY et al. (2001), com modificações feitas neste trabalho. Trabalhou-se com meio de enriquecimento para as culturas; estrias compostas foram realizadas em meio indicador sem etanol; e as placas foram estocadas, na geladeira, por 21 dias.

As culturas, previamente congeladas em nitrogênio líquido, foram ativadas em 5 mL de LDR 10% (Leite Desnatado Reconstituído) e incubadas a 37°C por 12 horas, ou até que houvesse a coagulação do leite, por meio da produção de ácido láctico. Inóculos de 100µL foram assepticamente transferidos para 5 mL de MRS e TSB, conforme a cultura cultivada, e incubados a 37°C por 12 horas.

Posteriormente, estrias compostas foram realizadas, com a alça de repicagem em placas contendo ágar MRS ou TSA, como controles. Simultaneamente, foram feitas estrias em ágar MRS ou TSA, contendo 0,025 g/L de TTC (cloreto de trifeniltetrazólio) e etanol, na concentração de 5g/L. Além disso, estrias foram feitas em ágar MRS e TSA, contendo apenas 0,025g/L de TTC (cloreto de trifeniltetrazólio) sem etanol. As placas foram embrulhadas em papel alumínio e incubadas, nas condições descritas anteriormente.

Após o período de incubação, as placas foram estocadas, na geladeira, a 4°C por 21 dias.

A atividade da enzima etanol desidrogenase foi indicada pela coloração das colônias, no meio indicador de álcool.

3.3. Atividade de etanol desidrogenase em meio líquido

A atividade da enzima etanol desidrogenase, em meio líquido, foi medida conforme a metodologia descrita por RAYA et al. (1986b), com modificações realizadas neste trabalho. A determinação da atividade foi realizada após incubação a 37°C por 12 horas e durante o período de estocagem, por 21 dias, a 4°C, sem que houvesse a diálise da solução sobrenadante.

As culturas lácticas, mantidas sob congelamento a -80°C, foram ativadas em 5 mL de LDR 10% e incubadas a 37°C por 12 horas. Em seguida, inóculos de 2% foram transferidos para os referidos caldos de cultivo, para cada cultura, e incubados a 37°C por 12 horas. Após este período, 1000µL foram transferidos para 50mL do mesmo caldo e incubados nas mesmas condições. Em seguida, foram estocados a 4°C por 21 dias, para posterior obtenção do extrato livre de células e medida da atividade enzimática.

3.3.1. Extrato livre de células

Após 0, 5, 14 e 21 dias de estocagem, amostras das culturas foram centrifugadas a 8000g (Sorvall, Rotor GSA), por 15 minutos, a 4°C.

Os sobrenadantes foram descartados; e os sedimentos, recolhidos e lavados com Tris-HCl 0,2M, pH 7,0; e as células ressuspendidas em 15mL do mesmo tampão. Em seguida, foram novamente centrifugados a 8000g por 15 minutos, a 4°C e, então, ressuspendidos em 5 mL de tampão. Após serem homogeneizadas em vortex, as células em suspensão foram rompidas no FRENCH PRESS CELL, a 1000 psig, marca SLM Instruments, por duas vezes. Os debris de células foram eliminados com a centrifugação a 20000g (Sorvall, Rotor SS34), por 20 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi usado para o ensaio enzimático.

3.3.2. Ensaio da atividade enzimática

A atividade da enzima etanol desidrogenase foi medida pela taxa de oxidação de nucleotídeos de piridina, NAD(P)H, a 340nm, na presença de acetaldeído, no espectrofotômetro, marca Beckman, modelo DU[®] 640. A mistura de reação (volume final de 500 µL), para redução de acetaldeído, continha 425 µL de tampão fosfato 80 mM pH 6,5; 10 µL de NAD(P)H 8mM; 25 µL de acetaldeído 0,28 M; e 40 µL do extrato enzimático.

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (BREADFORD, 1976).

A atividade enzimática foi expressa em µmoles de NAD(P)H oxidado/min/mg de proteína.

Este experimento foi realizado em duplicata.

3.4. Análise da produção de compostos de aroma

3.4.1. Preparo das amostras

As culturas estoques, previamente congeladas a -80°C, foram ativadas em 5mL de LDR 10% e incubadas a 37°C por 12 horas. Em seguida, 2 mL foram assepticamente inoculados em 20 mL de LDR 10% e incubados por 10 a 12 horas a 37°C, até que houvesse formação do coágulo característico. Após o período de incubação, as amostras de leite fermentado foram estocadas a 4°C, por 21 dias.

3.4.2. Análise cromatográfica

A análise cromatográfica dos compostos voláteis foi realizada no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Nesta análise foram identificados dois compostos de aroma, etanol e acetaldeído. Os padrões sintéticos foram fornecidos pela Merck.

Após 0, 7, 14 e 21 dias de estocagem, 10 mL das amostras foram transferidos para frascos de *headspace* e mantidas sob agitação, em equilíbrio, a

60°C por 30 minutos, a 750rpm. Após esse período, 250µL de amostras gasosas, retiradas de *headspace*, foram injetados no cromatógrafo, pelo auto-injetor.

Este experimento foi realizado em três repetições.

3.4.3. Identificação dos compostos voláteis

A identificação dos compostos voláteis foi conduzida em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS), marca Shimadzu, modelo GCMS-QP5050-A.

Os compostos foram identificados por meio de consulta à biblioteca de compostos do GCMS-QP5050-A, confirmados pelos tempos de retenção (tr) dos padrões sintéticos.

Para identificação dos compostos voláteis, utilizou-se a coluna capilar SPB 1 (50m x 0,25 i.d. 0,25 µm espessura do filme) da Supelco, e as condições cromatográficas do GC/MS estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Condições cromatográficas do GC/MS

Gás de arraste	Hélio com fluxo de 1,2mL/ min
Faixa de scan	PM 29 a 300
Técnica de injeção	“splitless”
Temperatura do injetor	180°C
Temperatura do detector	200°C
Pressão da coluna	60 KPA
Temperatura da coluna	35°C/5min programação 4°C/ min
Tempo total da corrida	10,38 minutos

3.5. Verificação do pH das amostras

O pH do LDR 10% foi medido no pHmetro marca Accumet[®], modelo 15, antes da inoculação das culturas lácticas e após o período de incubação a 37°C, durante estocagem a 4°C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade etanol desidrogenase em meio sólido

Após o período de incubação das placas a 37°C, por 48 horas, as colônias de *S. thermophilus* apresentaram coloração vermelha muito intensa, principalmente no centro das colônias, com aspecto metálico ao seu redor. Este comportamento das colônias permaneceu durante a estocagem das placas a 4°C, por 21 dias. Entretanto, as colônias no meio que continham TTC sem etanol, também apresentaram coloração avermelhada, o que não era esperado, pois, na ausência do substrato, as colônias teriam de apresentar coloração branca (Quadro 2). Segundo NEAL e CALBERT (1955), esse microrganismo possui a capacidade de reduzir TTC, independente do substrato e da enzima ADH, pois observaram a mudança de coloração característica em meio à base de leite dessas células para rosa-avermelhado, ao desenvolverem uma metodologia para testar a presença de antibióticos em leite cru.

Portanto, na presente investigação não se pode afirmar que houve presença da enzima etanol desidrogenase, pela mudança de coloração das colônias, no meio indicador.

Quadro 2 - Atividade de etanol desidrogenase em colônias das culturas lácticas em meio indicador, após crescimento a 37°C e estocagem a 4°C por 21 dias

MICROORGANISMO	DIAS	MEIO INDICADOR	
		TTC + ETANOL	TTC SEM ETANOL
<i>L. acidophilus</i>	0	+	-
	7	+	-
	14	+	-
	21	+	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0	+	-
	7	+	-
	14	+	-
	21	+	-
<i>S. thermophilus</i>	0	+	+
	7	+	+
	14	+	+
	21	+	+
<i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20	0	-	-
	7	-	-
	14	-	-
	21	-	-

(+) colônias vermelhas

(-) colônias brancas

As colônias de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *L. acidophilus* apresentaram coloração rósea-avermelhada nas placas contendo TTC e etanol, após o período de incubação de 37°C, por 72 horas, e também após a estocagem a 4°C, por 21 dias. Ao contrário de *S. thermophilus*, no meio contendo TTC sem etanol, elas permaneceram brancas, o que indica possível presença da enzima etanol desidrogenase, produzida por esses microrganismos, mesmo durante a estocagem a 4°C, por 21 dias.

As células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, após incubação a 37°C por 48 horas, formaram colônias brancas tanto no meio com TTC e etanol quanto no meio com TTC sem etanol, o que indica ausência da enzima etanol desidrogenase mesmo após o período de estocagem de 21 dias, a 4°C. Tendo em vista que essa bactéria apresenta características probióticas (NEVES, 1998), a sua utilização para fabricação de iogurte, provavelmente, não diminuiria as concentrações de acetaldeído, o que permitiria obter um produto de *flavor* desejável, sem possíveis perdas sensoriais, decorrentes da produção de etanol durante sua vida-de-prateleira, a baixas temperaturas.

4.2. Atividade de etanol desidrogenase em meio líquido

Os resultados desta investigação indicam que as bactérias *starter* estudadas possuem baixa atividade da enzima etanol desidrogenase (Quadro 3).

Os resultados obtidos após 12h de fermentação, a 37°C, foram contraditórios aos reportados por RAYA et al. (1986b), que não detectaram atividade ADH em estirpes de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, cultivadas em meio MRS, nas mesmas condições. MARSHALL e COLE (1983) também observaram ausência de atividade em *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, cultivado em LDR, após a incubação de 12 horas a 37°C.

Os resultados da atividade enzimática de *L. acidophilus*, verificados pela presente observação, após a incubação de 12 horas a 37°C, foram menores do que os obtidos por MARSHALL e COLE (1983), que observaram valores de 2,1 e 2,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ em duas estirpes analisadas. GONZALEZ et. al. (1994) ao cultivarem essa bactéria em MRS, e incubando-na a 37°C por 12 horas, encontraram valores de $1,5 \times 10^{-3} \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Apesar de ter apresentado baixa atividade após 12h de fermentação, a 37°C, os resultados constatados para *S. thermophilus* estão de acordo com os de LEES e JAGO (1976a), que afirmaram que esta bactéria contém ADH dependente de NADP(H), o que explica a produção de etanol durante o crescimento desse microrganismo em leite, sendo a glicose o principal precursor da produção de acetaldeído e etanol nesse microrganismo.

Quadro 3 - Atividade de etanol desidrogenase em extrato livre de células das culturas lácticas, cultivadas a 7°C por 12 horas e estocadas a 4°C por 21 dias

MICROORGANISMO	DIAS	ATIVIDADE DE ETANOL DESIDROOGENASE *
<i>L. acidophilus</i>	0	1,06x10 ⁻⁷
	5	9,17x10 ⁻⁷
	14	4,24x10 ⁻⁷
	21	5,21x10 ⁻⁷
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0	1,18x10 ⁻⁶
	5	5,00x10 ⁻⁷
	14	1,78x10 ⁻⁷
	21	2,60x10 ⁻⁶
<i>S. thermophilus</i>	0	1,31x10 ⁻⁷
	5	5,90x10 ⁻⁸
	14	2,40x10 ⁻⁷
	21	4,10x10 ⁻⁷

* (µmols de NAD(P)H oxidado/min/mg de proteína)

Tendo em vista que na maioria dos trabalhos havia tempo e temperatura ótimos de crescimento, relatos não têm sido feitos sobre a atividade enzimática durante o período equivalente à estocagem do iogurte, a baixa temperatura, como foram as condições realizadas neste trabalho.

Apesar de BRANDÃO (1980) ter observado que, durante o processamento do iogurte, o etanol é produzido, durante a estocagem, a 2°C, supostamente pela enzima ADH, o seu trabalho foi realizado com culturas mistas, razão pela qual não identifica qual microrganismo possui maior atividade enzimática para produção de etanol no iogurte.

Pela análise do Quadro 3, pode-se constatar que as duas bactérias tradicionalmente usadas como *starter* na fabricação de iogurte apresentaram atividade ADH durante o período de crescimento e estocagem a 4°C, por 21

dias, embora MARSHAL (1987) e LEES e JAGO (1878b) tenham reportado ausência dessa enzima nessas estirpes, o que explica o *flavor* típico do iogurte, com altas concentrações de acetaldeído. Os resultados aqui apresentados mostram que essas estirpes poderiam formar etanol, pela ação enzimática de ADH mesmo em pequenas quantidades, durante a estocagem do iogurte.

L. acidophilus, uma estirpe probiótica, também apresentou atividade ADH durante a estocagem. O iogurte fabricado com essa estirpe teria pouco *flavor* típico, dada a baixa concentração de acetaldeído, que seria metabolizado a etanol. Esta constatação está de acordo com MARSHALL e COLE (1983), que detectaram presença dessa enzima em duas estirpes investigadas.

O *L. delbrueckii* UFV H2b20 é, comprovadamente, uma estirpe probiótica que apresenta características apropriadas para o uso como adjunto dietético e não possui atividade ADH (Quadro 2). Essa linhagem pode ser eficaz como probiótico e componente de leite fermentado, incluindo iogurte. Os valores encontrados para atividade de ADH (Quadro 3) confirmam a presença dessa enzima nas estirpes de *L. acidophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, identificada pelo meio indicador de álcool (Quadro 2). Apesar de essa técnica não ter sido discriminatória para *S. thermophilus*, a atividade enzimática foi detectada em extratos livres de células pela oxidação de nucleotídeos de piridina (Quadro 3).

A atividade de etanol desidrogenase pode ser dependente das estirpes utilizadas na fabricação de iogurte, bem como em outras condições que não foram realizadas nesta pesquisa, como diferentes culturas lácticas cultivadas isoladamente e mistas, além de outras condições de crescimento, como pH, temperatura. Portanto, sugerem-se pesquisas posteriores que visem elucidar condições que possam influenciar sua atividade, uma vez que há poucas pesquisas sobre essa enzima, apesar de tão importante, do ponto de vista tecnológico da fabricação e estocagem do iogurte.

4.3. Produção de compostos de aroma

Na Figura 3 é apresentado o cromatograma total da mistura dos padrões dos compostos voláteis propostos para identificação, obtido do CG/MS.

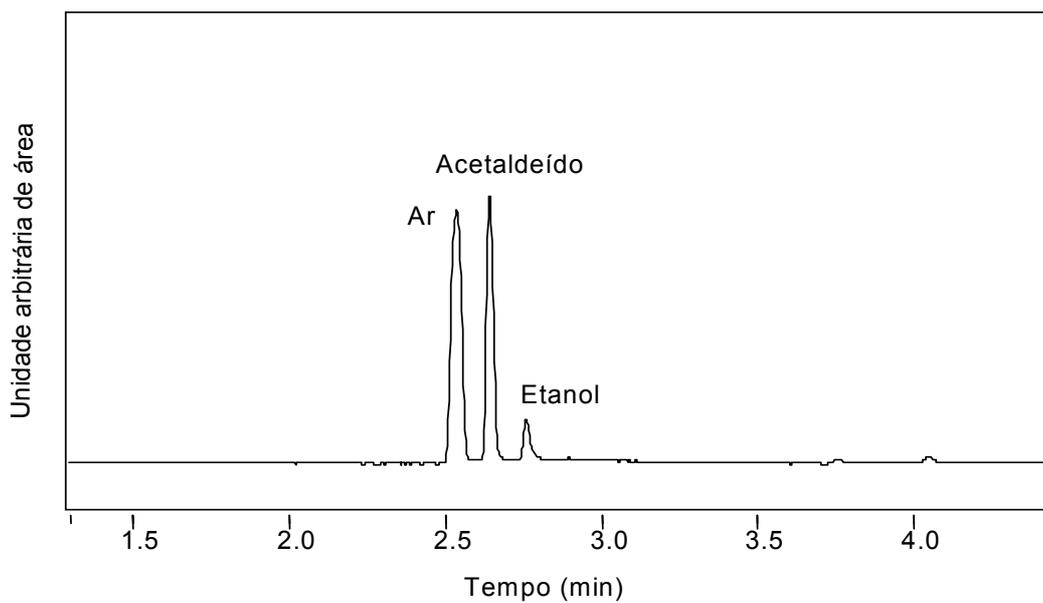


Figura 3 - Cromatograma total da mistura de padrões.

A Figura 4 mostra o cromatograma com espectro de massa de acetaldeído, obtido do CG, enquanto a Figura 5 mostra o cromatograma com espectro de massa de etanol, obtido do CG.

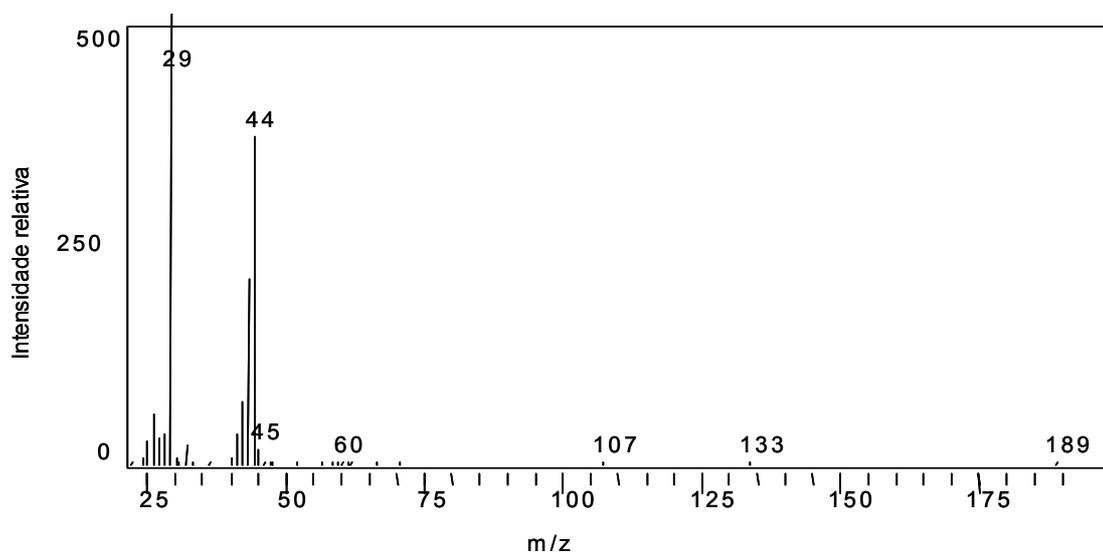


Figura 4 - Cromatograma com espectro de massa de acetaldeído, obtido do GC.

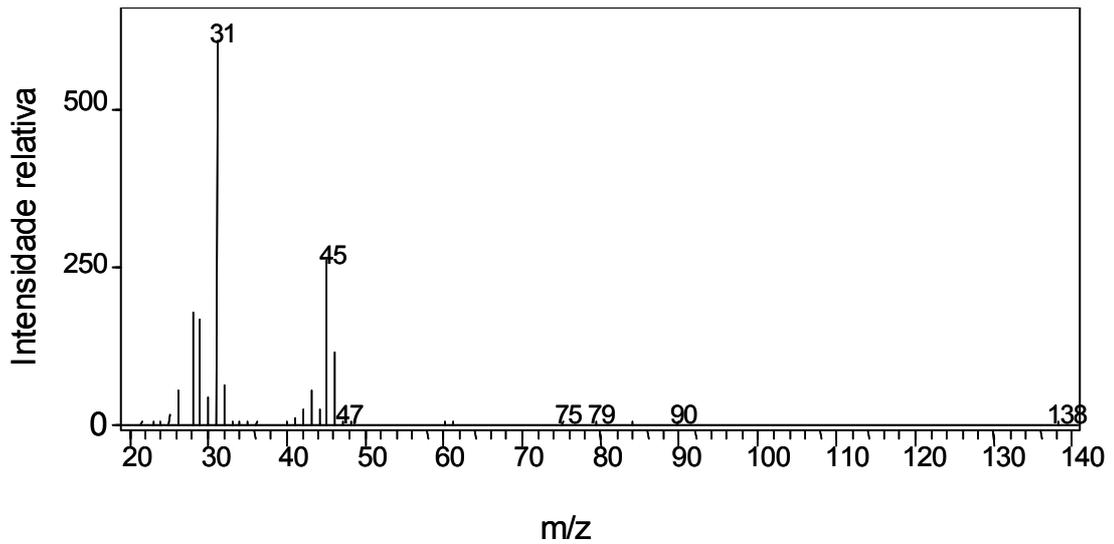


Figura 5 - Cromatograma com espectro de massa de etanol, obtido do GC.

A Figura 6 mostra o cromatograma de uma amostra de leite fermentado por *L. acidophilus*, obtido do CG.

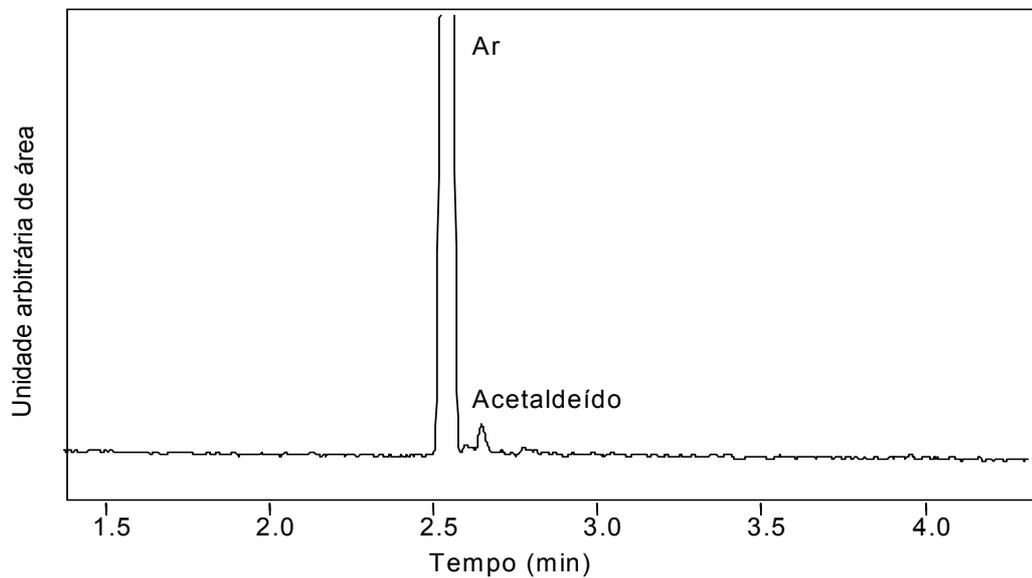


Figura 6 - Cromatograma de uma amostra de leite fermentado por *L. acidophilus*, obtido do GC.

A produção de acetaldeído pelas culturas lácticas é indicada conforme a área do pico formado (Quadro 4).

Quadro 4 - Medida da área do pico de acetaldeído formado pelas culturas lácticas em diferentes dias de estocagem cultivadas a 37°C por 12 h e estocadas a 4°C.

MICROORGANISMO	DIAS	ÁREA DO PICO DE ACETALDEÍDO (x10 ²)*
<i>L. acidophilus</i>	0	6,8x10 ⁶
	7	2,0x10 ⁶
	14	3,5x10 ⁶
	21	7,6x10 ⁶
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0	1,2x10 ⁶
	7	3,5x10 ⁶
	14	2,7x10 ⁶
	21	3,7x10 ⁶
<i>S. thermophilus</i>	0	–
	7	1,0x10 ⁶
	14	6,7x10 ⁶
	21	4,1x10 ⁶

* unidade arbitrária.

A partir desses resultados, observa-se que, exceto para o leite fermentado por *S. thermophilus*, o acetaldeído começou a ser produzido durante o crescimento, a 37°C por 12h (tempo 0), e que, após três semanas de estocagem, a formação de acetaldeído foi alta nas três culturas, o que indica que essas culturas apresentaram metabolismo durante o período de estocagem, a 4°C.

Esses resultados estão condizentes com os reportados por GEORGALA et al. (1995), que observaram aumento nas concentrações de acetaldeído após cinco dias de estocagem, a 4°C. Além disso, após 24 horas e com cinco dias de estocagem, baixas concentrações de etanol foram detectadas, o que poderia ser

atribuída à ausência ou baixa atividade ADH nas estirpes estudadas. GARDINI et al. (1999), observaram que acetaldeído foi, quantitativamente, o principal constituinte do aroma do iogurte, após cinco semanas de estocagem, a 4°C.

Entretanto, outros autores reportaram decréscimo do conteúdo de acetaldeído no iogurte, durante a estocagem, o que contradiz a presente investigação. GAAFAR (1992), ao estudar os compostos voláteis do iogurte, detectou decréscimo de todos os compostos voláteis durante a estocagem a 8°C, por quatorze dias, enquanto HAMDAM et al. (1971) observaram que, dentre três iogurtes fabricados com diferentes culturas, dois apresentaram decréscimo no conteúdo de acetaldeído durante a estocagem a 4°C, por quatorze dias. MCGREGOR e WHITE (1987) também observaram decréscimo do conteúdo de acetaldeído sob estocagem refrigerada, decorrente da atividade ADH das culturas lácticas. O mesmo resultado foi observado por BILLS et al. (1972).

A partir dos dados da literatura, notam-se diferenças nas quantidades produzidas de acetaldeído no iogurte, as quais, segundo verificações de GEORGALA et al. (1995) e KANG et al. (1988), podem ser atribuídas a fatores como variações de estirpes usadas, atividade da enzima etanol desidrogenase, tipo de leite ou diferenças nos métodos analíticos empregados para sua detecção.

KANG et al. (1988) compararam um método de extração com éter com *headspace* “*gas-purging*”, para determinação de compostos voláteis no iogurte, com posterior análise por cromatografia gasosa. O conteúdo de acetaldeído aumentou durante a estocagem de 10 dias, por ambos métodos adotados. De acordo com o método de extração com éter, houve pequeno aumento no conteúdo de etanol durante a estocagem, a 4°C, enquanto nenhuma quantidade de etanol foi detectada pelo método de *headspace*, apesar de este ser mais eficiente na detecção de compostos voláteis no iogurte.

Apesar do importante progresso em métodos cromatográficos, tais como técnicas de *headspace* que aumentam a sensibilidade dos compostos voláteis, poucos estudos recentes estão disponíveis e nenhum deles envolve número maior de estirpes examinadas usando-se as técnicas recentemente desenvolvidas.

A produção de acetaldeído foi detectada pela técnica de cromatografia gasosa, mas nenhuma produção de etanol foi identificada, embora atividades da enzima ADH tenham sido constatadas pela técnica de redução de nucleotídeos de piridina, em extratos livres de células das culturas estudadas (Quadro 3), ou seja, em condições em que havia possibilidade de produção de ADH. Esse resultado pode ser decorrente da sensibilidade técnica empregada para detecção desse composto, de acordo com as condições adotadas. Além disso, segundo LEES e JAGO (1978a), há a possibilidade de a função principal de algumas ADHs em bactérias poder ser a oxidação ou a redução de outros compostos, além de etanol e acetaldeído.

A produção relativamente baixa de acetaldeído (Quadro 4), verificada neste trabalho, pode estar relacionada também com o uso das culturas isoladamente, pois, durante a fermentação do iogurte, o sinergismo entre elas e a sua proporção são importantes para alcançar o *flavor* desejável, com altas concentrações de acetaldeído.

Após a incubação e durante sete dias de estocagem, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* produziu maior quantidade de acetaldeído do que *S. thermophilus*, embora o segundo microrganismo tenha apresentado maior produção durante 14 e 21 dias de estocagem. Esses resultados estão condizentes com os reportados por TAMINE e ROBSON, (1985), por GERGALA et al. (1995) e por OTT et al. (2000b), que observaram que, em culturas puras, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* produz maior quantidade de acetaldeído do que *S. thermophilus*. Portanto, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* é a espécie que contribui para a maior parte do *flavor* do iogurte. Já RYSSTAD e ABRAHAMSEN (1987) concluíram que a principal produção de acetaldeído foi resultado da atividade de *S. thermophilus*.

Entretanto, esses resultados são conflitantes com os reportados por MARSHALL et al. (1982), que verificaram que ambas as culturas possuem o mesmo potencial de produção do acetaldeído, quando fatores necessários ao seu crescimento são adicionados ao leite para fabricação de leites fermentados.

4.4. pH em culturas em LDR

No Quadro 5 são apresentados os valores de pH das culturas lácticas em LDR a 10%, após crescimento a 37°C por 12h, e estocagem a 4°C, por 21 dias.

OTT et al. (2000b) verificaram que o pH contribui, diretamente, para o *flavor* do iogurte, devido à acidez desenvolvida pelas culturas lácticas.

Quadro 5 - Medida de pH das culturas lácticas em LDR, cultivadas a 37°C por 12h e em diferentes dias de estocagem, a 4°C

MICROORGANISMO	DIAS	pH
<i>L. acidophilus</i>	0	4,73
	7	4,73
	14	4,71
	21	4,74
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0	4,43
	7	4,40
	14	4,44
	21	4,44
<i>S. thermophilus</i>	0	4,68
	7	4,62
	14	4,64
	21	4,68

O pH inicial do LDR a 10%, antes da inoculação das culturas bacterianas, era de 6,54 e, após o período de incubação, atingiu valores de 4,40 a 4,74, devido à acidez desenvolvida pela produção de ácido láctico. Esses valores não apresentaram mudanças durante o período de estocagem, a 4°C. Esses resultados são semelhantes aos reportados por GEORGALA et al. (1995), que encontraram valores de pH, com pequenas variações, de 4,0 a 4,4, após 24h, e

de 4,0 a 4,2, após 5 dias de estocagem, a 4°C. Segundo GARDINI et al. (1999), o decréscimo do pH após a fermentação pode ser influenciado por muitos fatores, como tamanho do inóculo, percentual de gordura e sólidos não gordurosos do leite. O coágulo mais característico foi resultado da fermentação do leite por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, sendo *L. acidophilus* o microrganismo que demorou mais tempo para coagular o leite, devido à menor capacidade de hidrolisar a lactose e formar ácido láctico.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A enzima etanol desidrogenase, ADH, catalisa a reação de redução de acetaldeído em etanol e a sua reação reversa, isto é, oxidação de etanol em acetaldeído. Com o objetivo de estudar a importância dessa enzima para produção de etanol, em meio de cultivo e em leite fermentado, durante a estocagem a 4°C, por 21 dias, investigou-se a sua atividade em bactérias usadas na fabricação do iogurte, *Streptococcus thermophilus* NCDO 1968, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 e em *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, e da linhagem probiótica *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.

A detecção da atividade de ADH em colônias, em meio indicador de álcool contendo cloreto de trifeniltetrazólio, TTC, mostrou-se eficaz para as estirpes de *Lactobacillus*, mas não foi discriminatória para *S. thermophilus*. Essa bactéria reduz o TTC mesmo na ausência de etanol. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentou resultado positivo para atividade dessa enzima, nesse meio, evidenciada pela coloração rósea das colônias. *L. delbrueckii* UFV H2b20 não reduziu o TTC e, portanto, apresentou-se negativo quanto à enzima, o que indica ausência desta nas condições estudadas.

A atividade de ADH, em meio líquido, foi determinada pela medida da oxidação de NAD(P)H, coenzima necessária à atividade da ADH. A atividade

medida no extrato livre de células foi expressa como μmoles de NAD(P)H oxidado por minuto por mg de proteína. A atividade em extrato livre de células de *L. acidophilus* foi, em média, $1,06 \times 10^{-7} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Esta atividade aumentou para $9,17 \times 10^{-7} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, após a estocagem das células em meio MRS, por 5 dias, a 4°C , indicando atividade das células. Também houve aumento de atividade para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que foi em média $1,18 \times 10^{-8} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Essa atividade aumentou para $5,00 \times 10^{-7} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ após cinco dias de estocagem. Para extratos livres células de *S. thermophilus*, a atividade foi em média, $1,31 \times 10^{-7} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ e diminuiu para $5,90 \times 10^{-8} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, após 5 dias de estocagem, mas aumentou para $4,10 \times 10^{-7} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ após 14 dias de estocagem.

Os resultados em meio líquido mostraram que as três culturas apresentaram baixa atividade ADH durante a estocagem por 21 dias, a 4°C , o que indica que o iogurte fabricado com essas estirpes apresentaria pequena quantidade de etanol, com *flavor* típico e em concentrações desejáveis de acetaldeído.

Foi demonstrada a produção de acetaldeído, em leite desnatado reconstituído, pelas culturas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* e *S. thermophilus*. *S. thermophilus* produziu acetaldeído somente após a estocagem a 4°C , sendo este detectado após 7 dias, com maior concentração observada após 14 dias.

Não se observou atividade de ADH por GC/MS, por *headspace*, nas culturas puras em leite, após a incubação para crescimento, nem após a estocagem a 4°C , por 21 dias.

Tendo em vista que poucas informações, sobre as mudanças na concentração de etanol durante a estocagem estão disponíveis na literatura, além de poucos dados sobre o efeito da estocagem refrigerada na concentração dos compostos de *flavor* produzidos pelas culturas lácticas isoladas, propõem-se futuros estudos sobre os compostos voláteis produzidos por diversas culturas lácticas, em outras condições de incubação e estocagem, e outras metodologias de cromatografia, bem como a quantificação desses compostos para que se obtenham maiores informações desses componentes que desempenham papel crucial para desenvolvimento de *flavor* característico, bem como aceitação do iogurte pelo mercado consumidor após estocagem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNAU, J., J. FLEMMING, MADSEN, S.M., VRANG, A., ISRAELSEN, H. Cloning of the *Lactococcus lactis adhE* gene, encoding a multifuncional alcohol dehydrogenase, by complementation of a fermentative mutant of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.12, p. 3049-3055, 1998.
- BAUTISTA, E. S., DAHIYA, R. S., SPECK, M. L. Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. **Journal of Dairy Research**, v. 33, p.299-307, 1966.
- BILLS, D.D., DAY E. A. Dehydrogenase activity of lactic streptococci. **Journal of Dairy Science**, v.49, p.1473-1477, 1966.
- BILLS, D.D., YANG, S., MORGAN, M. E., BODYFELT, F. W. Effect of sucrose on the production of acetaldehyde and acids by yogurt culture bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.55, n.11, p.1570-1573, 1972.
- BOCHENER, B. R., SAVAGEAU. Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, n.2, p.434-444, 1977.
- BRANDÃO, S. C. C. **Determination of volatile flavor constituents and residual carbohydrates during the fermentation of yogurt**. Dissertation (Doctor of Philosophy) in Michigan State University- EUA, 1980, 125 p.
- BREADFORD, M. M. A rapid e sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye biding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

- CAPLICE, E., FITZGERALD. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p.131-149, 1999.
- CHAVES, A. C. S. D., FERNANDEZ, M., LERAYER, A. L. S., MIERAU, I., Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.11, p.5656-5662, 2002.
- CLARK, D., CRONAN JR, J.E.C. *Escherichia coli* mutants with altered control of alcohol dehydrogenase and nitrate reductase. **Journal of Bacteriology**, v. 141, n.1, p. 177-183, 1980a.
- CLARK, D., CRONAN JR, J.E.C. Acetaldehyde coenzyme A dehydrogenase of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.144, n.1, p. 179-184, 1980b.
- COLLINS, G., BRAGA, L., BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**, 7.ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1997, 181p.
- DAILLY, Y., MAT-JAN, F., CLARK, D. Novel alcohol dehydrogenase activity in mutant of *Salmonella* able to use as sole carbon source. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, p.41-45, 2001.
- FRIEDERICH, J. E., ACREE, T. E. Gas chromatography olfactometry (GC/O) of dairy products. **International Dairy Journal**, v.8, n.3, p.235-241, 1998.
- GAAFAR, A. M. Volatile flavour compounds of yoghurt. **International Journal of Science and Technology**, v. 27, p.87-91, 1992.
- GALESLOOT, T. E., HASSING, F., VERINGA, H. A. Symbiosis in yoghurt (I). stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, v.22, p.50-61, 1968.
- GARDINI, F., LANCIOTTI, R., GUERZONI, M.E., TORRIANI, S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. **International Dairy Journal**, v.9, p.125-134, 1999.
- GEORGALA, A., TSAKALIDOU, E., KANDARAKIS, I., KALANTZOPOULOS, G. Flavour production in ewe's milk and ewe's milk yoghurt, by single strains and combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, isolated from traditional Greek yoghurt. **Lait**, v.75, p.271-283, 1995.
- GONZALEZ, S. N., AMBROSINI, V.M., NADRA, M.N., HOLGADO, A.P.R., OLIVER, G. Acetaldehyde production by strains used as probiotics in fermented milk. **Journal of Food Protection**, v. 57, n.5, p.436-440, 1994.
- GUPTA, S., MAT-JAN, F., LATIFI, M., CLARK, D. P. Acetaldehyde dehydrogenase activity of the AdhE protein of *Escherichia coli* is inhibited by

- intermediates in ubiquinone synthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.182, p.51-55, 2000.
- HAMDAM, I. Y., KUSMAN, J. E. J., DEANE, D. D. Acetaldehyde production by combined yogurt cultures. **Journal of Dairy Science**, v.54, n.7, p.1080-1082, 1971.
- HATTING, L. A., VILJOEN, B.C., Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v.11, p.1-17, 2001.
- HOLLAND-STALEY, C. A., LEE, K., CLARK, D., CUNNINGHAM, P.R. Aerobic activity of *Escherichia coli* is determined by a single amino acid. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.21, p.6049-6054, 2000.
- HOLZAPFEL, W. H., STILES, M. E. Lactic Acid Bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.1-29, 1997.
- HOPWOOD, D. A. **The Isolation of Mutants**, p-363-433. In J. R. Norris and D. W. Robbins (ed.), **Methods in Microbiology**, vol. 3A. Academic Press Inc., New York, 1970.
- KANG, Y., FRANK, J. F., LILLARD, D. A. Gas chromatographic detection of yogurt flavor compounds and changes during refrigerated storage. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 4, n. 6, p.6-9, 1988.
- KEENAN, T.W., BILLS, D.D. Metabolism of volatile compounds by starter culture microorganism. A Review. **Journal of Dairy Science**, v.51, p.1561-1567, 1968.
- KEENAN, T.W., LINDSAY, R.C. Dehydrogenase activity of *Lactobacillus* species. **Journal of Dairy Science**, v.50, p.1585-1588, 1967.
- KILARA, A., SHAHANI, K.M. Lactic fermentations of dairy foods and their biological significance. **Journal of Dairy Science**, v.61, p.1793-1800, 1978.
- KLEEREBEZEM, M., HOLS, P., HGENHOLTZ, J. Lactic acid bacteria as cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p.840-848, 2000.
- KRANENBURG, R. V., KLEEREBEZEM, M., Vlieg, J. V. H., URSING, B. M., BOEKHORST, J., SMIT, B. A., SIEZEN, R. J. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. **International Dairy Journal**, v.12, p.111-121,2002.
- LEES, G. J., JAGO, G.R. Acetaldehyde: an intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Research**, v.43, p.63-73, 1976a.
- LEES, G. J., JAGO, G.R. Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Research**, v.43, p.75-83, 1976b.

- LEES, G. J., JAGO, G.R. Formation of acetaldehyde from 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate in lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.44, p.139-144, 1977.
- LEES, G. J., JAGO, G.R. Role of Acetaldehyde in metabolism. A review. 1. Enzymes catalyzing reactions involving acetaldehyde. **Journal of Dairy Science**, v.61, p.1205-1215, 1978a.
- LEES, G. J., JAGO, G.R. Role of Acetaldehyde in metabolism. A review. 2. The metabolism of acetaldehyde in cultured dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.61, p.1216-1224, 1978b.
- LINDSAY, R.C., DAY, E.A, SANDINE, W. E. Green flavor defect in lactic starter cultures. **Journal of Dairy Science**, v.48, p.863-869, 1965.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J.M., PARKER, J.B. **Brock Biology of Microorganisms**. 9. ed. New Jersey: Prentice Hall. Inc, 2000, 909 p.
- MANCA DE NADRA, M. C., RAYA, R. R., HOLGADO, P.R., G. OLIVER. Isolation and properties of threonine aldolase of *Lactobacillus bulgaricus* YOP. **Michwissenschaft**, v.42, n.2, p.92-94, 1987.
- MARANZANI, R. M., SCHMIDT, SHIREMAN, R. B., MARSHALL, M.R., CORNELL, J. A, Effect of threonine and glycine concentrations on threonine aldolase activity of yogurt microorganisms during growth in a modified milk prepared by ultrafiltration. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1142-1148, 1989.
- MARSHALL, V.M. Lactic acid bacteria: starter for flavor. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p.327-336, 1987.
- MARSHALL, V. M., COLE, W.M., Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. **Journal of Dairy Research**, v. 50, p.375-379, 1983.
- MARSHALL, V. M., COLE, W.M., MABBIT, L. A. Yogurt made from single organisms using heat- or enzyme- treated milk or milk to which casein hydrolysate or sodium formate is added. **Journal of Dairy Research**, v.49, p.147-152, 1982.
- MCGREGOR, J. U., WHITE, C. H. Effect of sweeteners on major volatile compounds and flavor of yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.70, p. 1828-1834, 1987.
- MITCHELL-RADKLE, L. C., SANDINE, W. E. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.2558-2568, 1986.
- MOMBELLI, B. Genetically improved starter strains: opportunities for the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 9, p.11-15, 1999.

- NEAL, C. E., CALBERT, H. E., The use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. **Journal of Dairy Science**, v.38, p.629-633, 1955.
- NEVES, J.T. M., **Caracterização de região codificadora de RNA ribossomal 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. Viçosa, MG: UFV 1998. 43 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- OGAWA, H., GOMI, T., FUJIOKA, M. Serine hydroxymethyltransferase and threonine aldolase: are they identical? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, p.289-301, 2000.
- OTT, A., GERMOND, J. E, CHAINTREAU, A. Origin of acetaldehyde during milk fermentation using ¹³C-labeled precursors. **Journal of Food Chemistry**, v. 48, p.1512-1517, 2000a.
- OTT, A., HUGI, A., BAUMGARTNER, M., CHAINTREAU, A. Sensory investigation of yogurt flavor perception: mutual influence of volatiles and acidity. **Journal of Food Chemistry**, v. 48, p. 441-450, 2000b.
- OTT, A., Fay, L. B., CHAINTREAU, A. Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. **Journal of Food Chemistry**, v. 45, p. 850-858, 1997.
- OTT, A., GERMOND, J. E., BAUMGARTNER, M., CHAINTREAU, A. Aroma comparisons of traditional and mild yogurts: Headspace gas chromatography quantification of volatiles and origin of σ - diketones. **Journal of Food Chemistry**, v. 47, p. 2379-2385, 1999.
- RAJAGOPAL, S. N., SANDINE, W. E. Associative grow and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.894-899, 1990.
- RASH, K. Compositional elements affecting flavor of cultured dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.3651-3656, 1990.
- RAYA, R.R., MANCA DE NADRA, M.C., HOLGADO, A, P. R DE RUIZ HOLGADO, OLIVER, G., Threonine aldolase in *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 and YOP 12. **Michwissenschaft**, v.41, n.10, p.630-633,1986a.
- RAYA, R.R., MANCA DE NADRA, M.C., HOLGADO, A, P. R DE RUIZ HOLGADO, OLIVER, G., Acetaldehyde metabolism in lactic acid bacteria. **Michwissenschaft**, v.41, n.7, p.397-399, 1986b.
- RYSSTAD, G., ABRAHAMSEN, R. K. Formation of volatile aroma compounds and carbon dioxide in yogurt starter grown in cows' and goats' milk. **Journal of Dairy Research**, v. 54, p. 257-266, 1987.

- SANDINE, W.E., DALY, C. ELLIKER, VEDAMUTHU, E. R. Causes and control of culture-related flavor defects in cultured dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.55, n.7, p.1031-1039, 1972.
- SANDINE, W.E., ELLIKER, P. R. Microbially induced flavors and fermented foods flavor in fermented dairy products. **Journal of Food Chemistry**, v.18, n.4, p.557-562, 1970.
- SANTOS, N.S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* UFV H₂b₂₀ de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjunto dietético.** Viçosa, MG: UFV 1984. 69 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- SCHMIDT, R. H., KENNEDY, L. B., MCMULLAN, E.B., MASON, E. R. Survey of the inhibitory effects of glycine on threonine aldolase activity of yogurt microorganisms. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v. 37, p.1215-1216, 1989.
- SHAHANI, K.M., CHANDAN R.C. Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.1685-1694, 1979.
- TAMINE, A. Y., DEETH, H. C. yogurt: technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**, v. 43, p.939-977, 1980.
- TAMINE, A. Y., ROBINSON, R.K. **Yogurt. Science and Technology.** Pergamon Press, Oxford, 431p, 1985.
- VERINGA, H. A., GALESLOOT, T. H., DAVELAAR, H. Symbiosis in yoghurt (II). Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, v.22, p.114-120, 1968.
- WILKINS, D.W., SCHIMIDT, R. H.,KENNEDY, L. B. Threonine aldolase activity in yogurt bacteria as determined by headspace gas chromatography. **Journal of Food Chemistry**, v.34, p.150-152, 1986a.
- WILKINS, D.W., SCHIMIDT, R. H., SHIREMAN, R. B. SMITH, K. L. JEZESKI, J.J. Evaluating acetaldehyde synthesis from L [¹⁴C (U)] threonine by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.1219-1224, 1986b.
- WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHLTS, J., SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 91-109, 2002.