

**Paula Soares de Moura Rezende**

**USO DE CULTURAS LÁTICAS PROBIÓTICAS  
ISOLADAS DO KEFIR NA PRODUÇÃO DE QUEIJO  
MINAS FRESCAL**



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como pré-requisito para a obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
JUNHO / 2018**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Marco Antônio Lemos Miguel.

Rezende, Paula Soares de Moura

Uso de culturas Lácticas probióticas isoladas do Kefir na produção de queijo Minas frescal / Paula Soares de Moura Rezende - Rio de Janeiro, 2018.

66f.

Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel. Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO REQUISITO CURRICULAR COMPLEMENTAR (RCS) TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**ALUNA: Paula Soares de Moura Rezende**

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Sergio Eduardo Longo Fracallanza (Presidente da Banca)  
Prof. Maria Cláudia Novo Leal Rodrigues (Membro da Banca)  
MSc. Felipe Miceli de Farias (Membro da Banca)  
Prof. Leandro Lobo (Suplente)

**Título da Monografia: “Uso de culturas lácticas probióticas isoladas do Kefir na produção de queijo Minas Frescal”**

Local: Sala D-27 / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes – CCS – UFRJ

Data e Hora de Início: 20 de junho de 2018 às 9:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, a aluna foi arguida pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste quesito do RCS **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata, que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluna, orientador e pela coordenadora do RCS.

Rio de Janeiro, 20 de junho de 2018.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Aluna:

Orientador:

Coordenadora de TCC:

Banca Examinadora:

Prof. Sergio Eduardo Longo Fracallanza

Prof. Maria Cláudia Novo Leal Rodrigues

MSc. Felipe Miceli de Farias

Prof. Leandro Lobo

Paula Soares de Moura Rezende

Prof. Marco Antonio Miguel

Prof. Bernadete Ferreira Teixeira Carvalho

## Agradecimentos

Agradecer para mim poderia ser sinônimo de pai e mãe. Agradeço com todo meu coração minha mãe Anna Tereza, e meu pai Roberto, por todo o apoio e incentivo durante meus anos de graduação. Agradeço por todo abraço, todo “você consegue” e por tudo que vocês me ensinaram. Agradeço pelo exemplo de sucesso que cada um é para mim e por me darem todo o suporte que eu preciso.

Agradeço meu avô, Roberto, meu gigante da ciência, por ter me mostrado desde pequena a importância da pesquisa e a não desistir nunca, por mais difícil que seja. Agradeço a minha vó Beatriz, minha maior saudade, por todo suporte e colo nos momentos difíceis e todos o bolos e sorrisos nos momentos felizes, e quantos momentos felizes foram.

Agradeço meus irmãos, Juliana e Rodrigo, que mesmo sem entender o que eu faço, me ouviram, dividindo comigo todas as etapas da minha graduação, desde da indecisão do vestibular até a formatura, sempre perguntando como estava indo o meu “queijinho” e reclamando que eu nunca levava para casa para eles comerem.

Agradeço meu namorado Bruno, por todas as idas até o fundão no final de semana, nos feriados, todas as tabelas no excel formatadas e principalmente todo o apoio e amor incondicional durante todos esses anos. Obrigada por me aturar quando o estresse das provas e seminários era grande, as noites eram mal dormidas e o meu mau humor era terrível, com você do meu lado foi tudo mais fácil.

Agradeço meus queridos Júlia e Vinícius, meus maiores presentes da que a UFRJ me deu. Sem vocês a graduação não teria metade da graça que teve. Obrigada por tudo, sou mais feliz tendo vocês na minha vida.

Agradeço ao meu orientador Marco Antonio Miguel, por toda a paciência e por todo o aprendizado. Agradeço todas as correções, conversas e puxões de orelha, vou carregar tudo que você me ensinou sempre junto comigo. Admiro não apenas seu conhecimento como também sua ética de trabalho e todo o ambiente proporcionado por você dentro do laboratório.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e toda a querida equipe. Antônio, pela paciência e simpatia ao me ajudar em tudo que precisei. Agnes, Amanda, Elizeu e Gisele pelas risadas e cafés. Agradeço em especial ao Felipe por ter me ajudado tanto neste final da monografia, quando o desespero era grande e os experimentos não davam certo.

Agradeço meus grandes mestres que me abriram os olhos para as maravilhas da ciência e sua importância imensurável. Agradeço de coração aos professores Bernadete Teixeira,

Fernanda Abreu, Raquel Bonelli, Sergio Fracallanza, Tatiana Pinto e tantos outros.

Agradeço a Professora Beatriz Mueller do Laboratório de Investigação de Microbiologia Médica e ao Dr. José Roberto de Assis Robeiro por terem gentilmente cedido as estirpes utilizadas nos experimentos.

Agradeço ao CNPq e à FAPERJ, pela bolsa de Iniciação Científica e pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que participaram e me acompanharam durante esses quatro anos.

## RESUMO

**Paula Soares de Moura Rezende**USO DE CULTURAS LÁTICAS PROBIÓTICAS ISOLADAS DO KEFIR NA  
PRODUÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL**Orientador: Marco Antonio Lemos Miguel****Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso.**

O queijo Minas frescal é um queijo tradicionalmente brasileiro e amplamente consumido ao redor do país. Por ser produzido com leite pasteurizado, possuir elevado teor de umidade e ser muito manipulado durante o processo de fabricação, o queijo Minas frescal apresenta condições propícias para contaminação, sobrevivência e multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas, muitas vezes apresentando qualidade abaixo do determinado pela resolução RDC N° 12 da ANVISA (2001). Diante desse cenário a introdução de bactérias ácido lácticas como bioproteção se torna desejável. Este trabalho teve como objetivo a produção de queijo Minas frescal probiótico utilizando como fermento láctico as estirpes *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* M1711B e *Lactobacillus paracasei* MRS59. Ambas as estirpes foram isoladas do Kefir e apresentaram, em estudos anteriores do grupo, características probióticas como resistência a bile e aderência a células intestinais. Foram produzidos cinco queijos com diferentes fermentos: fermento comercial Christian Hansen®, sem inóculo de cultura láctica, com *Lactobacillus paracasei* MRS59, com *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* M1711B e com ambas MRS59 e M171B. Os queijos foram analisados microbiologicamente e quanto ao pH a cada três dias durante 21 dias. Foram produzidos também queijos intencionalmente contaminados com *Escherichia coli*. Todos os queijos produzidos se encontraram dentro do padrão estipulado pela legislação. Os queijos produzidos com fermento láctico isolado do Kefir apresentaram característica probióticas com contagem acima de  $10^9$ . A estirpe *Lactobacillus paracasei* MRS59 se destacou na proteção contra fungos e leveduras assim como contra bactérias mesófilas e *Escherichia coli*.

Palavras chaves: kefir, bioproteção, queijo probiótico, bactéria ácido láctica, *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

**Paula Soares de Moura Rezende**

**USE OF LACTIC STRAINS ISOLATED FROM KEFIR IN THE  
PRODUCTION OF FRESH CHESSE “MINAS”**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The Minas fresh cheese is a traditional Brazilian cheese and is widely consumed around the country. Because it is produced with pasteurized milk, has a high water content and is very manipulated during fabrication, the Minas fresh cheese is susceptible to contamination, survival and growth of pathogenic and deteriorating bacteria. This cheese is regularly found with quality below the current law stipulated by RDC Number 12 (2001) (ano de publicação), ANVISA. As a solution to this problem, the introduction of acid lactic bacteria as bioprotection becomes an interest alternative. The aim of this work is to use the strains *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* M1711B and *Lactobacillus paracasei* MRS59 as ferment to produce probiotic fresh Minas cheese. Both this strains were isolated from Kefir beverage and showed probiotic characteristics in previous studies of our group, such as bile resistant and adherence to intestinal cells. Five cheeses were produced with different ferments: commercial ferment Christian Hansen®, without lactic culture, *Lactobacillus paracasei* MRS59, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* M1711B and with both MRS59 and M1711B. The cheeses were analyzed every three days during 21 days in microbiological aspects and pH. There were also produced cheeses purposely contaminated with *Escherichia coli*. All produced cheeses were within the regulation stipulated by the current legislation. The cheeses produced with lactic ferment isolated from Kefir were characterized as probiotics with lactic acid bacteria count above  $10^9$ . The strain *Lactobacillus paracasei* MRS59 showed great protection against fungus and yeast as well as against mesophilic bacteria and *E.coli*.

Key words: Kefir, bioprotection, probiotic chesse, latic acid bacteria, *Escherichia coli*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Queijo: Definição e Consumo .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Classificação dos queijos .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Aspectos tecnológicos do leite .....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Soro de leite: produção e aplicações tecnológicas .....	6
<b>1.4 Queijo Minas Frescal.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Queijo Minas frescal e sua segurança .....</b>	<b>8</b>
<b>1.6 Probióticos .....</b>	<b>12</b>
1.6.1 Microrganismos probióticos .....	13
1.6.2 Probióticos em alimentos.....	13
1.6.3 Probióticos no panorama mundial .....	15
1.6.4 Probióticos como bioproteção.....	15
<b>1.7 Kefir como uma fonte de microrganismos probióticos .....</b>	<b>17</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Origens das estirpes .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Produção dos queijos .....</b>	<b>23</b>
4.2.1 Preparo do leite e análise microbiológica .....	25
4.2.1.1 Contagem de bactérias heterotróficas mesófilas totais .....	25
4.2.1.2 Bactérias lácticas totais.....	26
4.2.1.3 Fungos e leveduras.....	26
4.2.1.4 Determinação do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes .....	26
4.2.1.5 <i>Salmonella spp</i> .....	27
4.2.2 Preparo e adição dos inóculos.....	27
4.2.3 Adição do cloreto de cálcio, sal e coagulante .....	27
4.2.4 Corte, repouso, agitação, dessoragem e enformagem.....	28

4.2.5. Contagem de bactérias lácticas no soro produzido.....	28
4.2.6 Armazenamento .....	28
<b>4.3. Análise microbiológica dos queijos.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Determinação do rendimento do queijo.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Determinação do pH.....</b>	<b>29</b>
<b>4.6 Avaliação do efeito protetor dos fermentos lácteos em queijo intencionalmente contaminado com <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>4.7 Pesquisa de atividade antagônica produzida pelas bactérias lácticas utilizadas como fermento.....</b>	<b>30</b>
4.7.1 Pesquisa de atividade antibacteriana.....	30
4.7.2 Pesquisa de atividade antifúngica .....	31
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1 Qualidade bacteriológica dos leites utilizados.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2 Análise do soro e rendimento.....</b>	<b>33</b>
<b>5.3 Capacidade de acidificação dos fermentos utilizados.....</b>	<b>34</b>
<b>5.4 Análise microbiológica dos queijos produzidos .....</b>	<b>35</b>
<b>5.5 Testes de atividade antimicrobiana.....</b>	<b>39</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Queijo: Definição e Consumo

O queijo em suas diferentes variedades é um alimento amplamente consumido ao redor do mundo. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), o consumo de queijo por habitante no Brasil é de aproximadamente 5 kg/ano. No ano de 2010 foram produzidas 801.440 toneladas de queijo, sendo destas 40.070 toneladas de queijo Minas Frescal. O Brasil ainda se encontra atrás de países da Europa, como a França e Espanha, onde o consumo anual de queijo chega a 20 kg por habitante, mas esse número vem crescendo ao longo do tempo, mostrando um aumento de interesse pelo produto (ABIQ, 2010).

O queijo pode ser definido como produto fresco ou maturado, que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos. A coagulação é feita pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácido orgânicos isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (Brasil, 1996). Só deve ser considerado queijo o produto em que sua base láctea possua gordura e/ou proteínas de origem láctea. O queijo é um concentrado de lipídeos, proteínas, vitaminas, cálcio, fósforo, carboidratos e sais minerais (Choi *et al.*, 2016).

O queijo é um produto popular ao redor do mundo todo e é consumido pelo seu sabor agradável e seus conhecidos benefícios à saúde. Entre esses benefícios podem ser citados a característica de naturalmente conter microrganismos com características benéficas que em alguns casos podem ser considerados probióticos, propriedades antitumorais, e por reduzir os índices de diabetes tipo II (Mozaffarian *et al.*, 2010). Por outro lado, seu alto teor de sódio requer moderação no consumo, de modo que os limites máximos diários não sejam ultrapassados (Moshfegh *et al.*, 2012).

## 1.2 Classificação dos queijos

Os queijos em geral possuem uma base de produção parecida podendo haver alterações na origem do leite (leite de vaca, de cabra, de ovelha entre outros), processamento, tempo de maturação e fermento utilizado (Perry, 2004).

Os queijos podem ser classificados como maturados ou frescos. Os queijos frescos são aqueles que já estão prontos para consumo logo após sua fabricação, enquanto os maturados

passam pelo processo de maturação antes do consumo. O processo de maturação pode ser rápido, como o da mussarela, que demora aproximadamente três semanas, ou longo, como o do queijo parmesão, que pode durar até dois anos. O tempo de maturação é inversamente proporcional à umidade presente no queijo (Fox & McSweeney, 1997). A proteólise é o fator mais importante na maturação de queijos e é mediada pelo resíduo de coagulante presente no queijo, fermentos e peptidases. Essa proteólise resulta na conversão da caseína em peptídeos e aminoácidos livres. Os aminoácidos livres são catabolizados pelos fermentos lácteos em compostos aromáticos. Essa cascata proteolítica é sensível a condições ambientais como pH, umidade e quantidade de sal, podendo gerar sabor amargo ou queijo sem aroma e sem sabor (Kindstedt, 2011). São exemplos de queijos maturados o Minas padrão, parmesão, provolone e gorgonzola. Como exemplos de queijos frescos podem ser citados o Minas frescal, cottage e ricota (Perry, 2004).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) também classifica os queijos quanto aos seguintes parâmetros: conteúdo de matéria gorda no extrato seco, umidade e submissão ou não a tratamento térmico para queijos de muita alta umidade (BRASIL, 1996).

- Quanto ao conteúdo de gordura no extrato seco (em porcentagem)
  - Extra Gordo ou Duplo Creme: contém o mínimo de 60%
  - Gordo: contém entre 45,0 e 59,9%
  - Semigordo: contém entre 25,0 e 44,9%
  - Magro: contém entre 10 e 24,9%
  - Desnatado: contém menos de 10%
- Quanto à umidade (em porcentagem)
  - Baixa umidade - queijos de massa dura: umidade de até 35,9%
  - Média umidade - queijo de massa semidura: umidade entre 36,0 e 45,9%
  - Alta umidade - queijos “macios”: umidade entre 46,0 e 54,9%
  - Muita alta umidade - queijos “moles”: umidade maior que 55,0%
- Quanto à submissão ou não à tratamento térmico para queijos de muita alta umidade
  - Queijo de muita alta umidade tratados termicamente
  - Queijos de muita alta umidade não tratados termicamente

### 1.3 Aspectos tecnológicos do leite

Todo queijo tem como base da sua matéria prima o leite, seja ele de origem bovina, caprina ou outra. A composição básica do leite está descrita na tabela 1. Essa composição é variável de acordo com a raça do bovino, sua alimentação, idade e até mesmo estação do ano e geografia (Cerbulis & Farrell, 1975).

**Tabela 1:** Composição do leite bovino

Composição Leite	Principais Componentes	Quantidade		
		%	mg/1L	Concentração em g/kg
Água		86 - 88		
Sólidos totais		12,0 - 14,0		
Cinzas		0,7		
Carboidratos		3,5 - 4,5		
	Lactose			
	Glucose			
	Galactose			
Gorduras		4,6 - 5,2		
	Triglicerídeos			
	Diacylglicerídios			
	Monoacylglicerídeos			
Proteínas		3,2 - 3,5		
	Caseína total			26
	α1-caseína			10
	α2-caseína			2,6
	β-caseína			3,3
	κ-caseína			3,3
	β-lactoglobulina			3,2
	α-lactoalbumina			1,2
	Soroalbumina			0,4
	Imunoglobulinas			0,7
Vitaminas:				
	Vitamina A		0,2 - 2	
	Vitamina D		0,002	
	Vitamina B1		0,4	
	Vitamina B2		1,7	
	Vitamina C		5 - 20	
Minerais:				
	Cálcio		118	

Fósforo	74
Magnésio	12
Potássio	140
Sódio	58

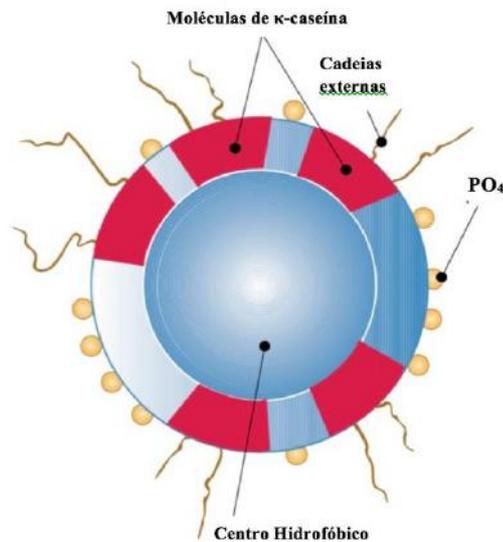
---

Adaptado de Noble & Jenness, 1999

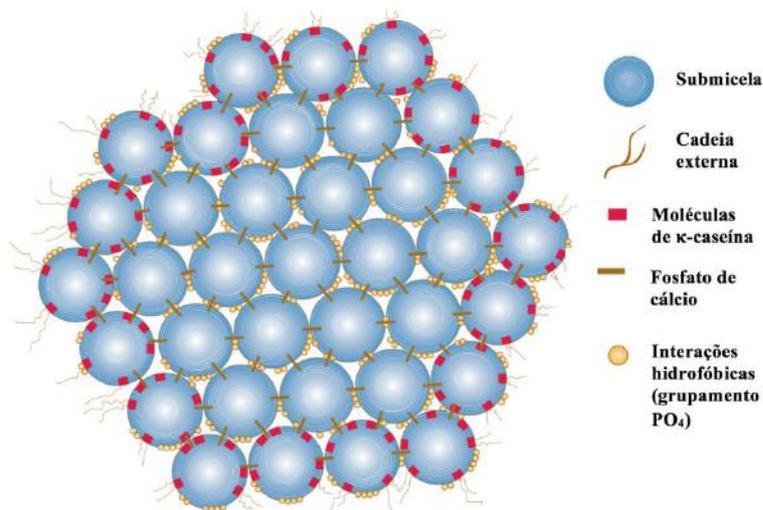
Entre os carboidratos do leite, a lactose é de extrema importância pois será o principal substrato para os fermentos lácteos. As bactérias lácticas são os microrganismos que fermentam mais rapidamente a lactose e, com isto, produzem rapidamente ácidos e outros compostos antimicrobianos, que auxiliam na proteção contra deterioradores durante o processo. Sua quantidade presente no queijo ao final da produção dará suporte à multiplicação de microrganismos que participam da maturação do queijo (MacGibbon & Taylor, 2006).

Os triglicerídeos são o tipo de lipídeos de maior abundância no leite podendo chegar a 98%. Os lipídeos do leite são encontrados como grandes gotas de triglicerídeos, ou como globulinas em uma membrana fosfolipídica polar que impede que essas globulinas fiquem dispersas (Kennan & Mather, 2006). A quantidade de gordura presente no leite influencia tanto na textura quanto no sabor do queijo produzido, sendo a textura influenciada também pela temperatura do leite (Collins *et al.*, 2004).

As proteínas do leite podem ser divididas em duas famílias, caseínas e proteínas do soro, sendo encontradas aproximadamente na proporção de 80% e 20% respectivamente. A caseína possui quatro principais componentes classificados como fosfoproteínas:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -caseína (Swaisgood, 2003). A maioria dessas caseínas são encontradas na forma de micelas (Figura 1), grandes estruturas macromoleculares esféricas que possuem em média 10 a 15 nanômetros. A micela de caseína pode ser definida como um emaranhado esférico de milhões de caseínas individuais ligadas pelos nanocristais de cálcio fosfato por ligação iônica, chamados de submicelas (Figura 2). Dentro da micela de caseína estão presentes dois terços do cálcio total e metade de todo fósforo presente no leite (De Kruif & Holt, 2003).



**Figura 1:** Estrutura de uma submicela de caseína (Gösta, 1995)



**Figura 2:** Estrutura e estabilização de uma micela de caseína (Gösta, 1995)

A micela de caseína possui três características essenciais para que a produção de queijo seja possível. A primeira é sua superfície altamente polar devido a concentração de  $\kappa$ -caseína, que possui cadeias de carboidratos altamente polares. Em contrapartida, o interior da micela de caseína é apolar (Waltra & Wouters, 2006). A segunda característica é sua capacidade de absorver íons de hidrogênio devido a sua alta concentração de fosfato de cálcio. A medida que a micela de caseína absorve íons de hidrogênio, o fosfato de cálcio vai sendo convertido à forma solúvel e liberado da micela para a fase aquosa (De Kruif & Holt, 2003). Por último, a micela de caseína possui uma alta capacidade de ligação e retenção de água. A água existe no queijo em duas categorias: ligada quimicamente ou indisponível, não acessível para

crescimento de microrganismos ou processos enzimáticos, ou água livre, fracamente imobilizada. A quantidade de água indisponível é influenciada diretamente pela composição da caseína, ou seja, dois queijos com a mesma quantidade de água, mas diferentes composições da caseína vão ter níveis diferentes de água livre e água imobilizada (Geurts *et al.*, 1974).

A coagulação pode ser ácida, por temperatura ou pelo uso de coalho, sendo esta última a mais utilizada e explicada a seguir. Essa coagulação ocorre em duas etapas: a etapa enzimática e não enzimática. A etapa enzimática tem início com a hidrólise da  $\kappa$ -caseína, resultando na liberação da parte da molécula C-terminal rica em carboidrato. As enzimas vão então expor a parte interna da micela de caseína que se torna apolar no ambiente do leite rico em cálcio (Harboe & Budtz, 1999). Este processo é dependente de fatores como: pH, teor de cálcio presente no leite e temperatura (Perry, 2004). Na etapa não enzimática a micela perde sua capacidade de interagir com moléculas de água, sendo assim, obrigadas a interagir umas com as outras, formando agregados e cadeias de micelas. No decorrer da coagulação as cadeias de micela aumentam e se fecham uma com as outras em formato tridimensional que encapsula principalmente lactose, lipídeos e minerais (Johnson & Law, 1999).

Além do tipo de coagulação, a escolha do coagulante em si é uma etapa importante na produção do queijo, visto que pode interferir diretamente tanto no rendimento quanto no sabor do queijo final. A pepsina bovina é a mais proteolítica e a menos específica em comparação à quimosina. Por isso a pepsina pode acarretar uma quebra exacerbada da caseína, gerando um amargor no queijo. Como alternativa para minimizar esses problemas, foi desenvolvido um agente coagulante microbiano totalmente composto por quimosina, que é o mais utilizado (Neves-Souza & Silva, 2005).

Antes da coagulação, aditivos como corantes e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) podem ser adicionados. A adição de cloreto de cálcio é importante para aumentar a quantidade de íons  $\text{Ca}^{+2}$  no leite, fazendo com que o processo de formação do coalho seja catalisado com melhor eficiência. Também podem ser utilizados o nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) ou de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), que servem principalmente para inibir a ação de microrganismos contaminantes (Perry, 2004).

### **1.3.1 Soro de leite: produção e aplicações tecnológicas**

O soro é um subproduto restante da fabricação de queijos, obtido pela precipitação e remoção da caseína do leite durante o processo. O volume do soro pode representar de 85-95% do leite utilizado e pode reter até 55% dos seus nutrientes (Siso, 1996). O soro possui uma cor amarelada devido a presença de riboflavina (vitamina B2) e é rico em lactose (De Wit, 2001).

O soro pode ser classificado como soro doce (pH 6-7) e soro ácido (pH <5) sendo mais reutilizado o soro doce por ser mais rico em sua composição como mostrado na tabela 2.

**Tabela 2** - Composição nutricional e vitaminas (mg/1.000g de extrato seco) presents do soro doce

Componentes	%	Vitaminas	mg/1.000g
Água	93	Vitamina B1	4,00
Proteína	0,9	Vitamina B2	43,00
Gordura	0,2	Vitamina B6	5,30
Lactose	5,0	Vitamina B12	12,50
Cinzas	0,6	Vitamina B6	0,16
Sólidos Totais	6,7	Ácido pantotênico	45,00
		Ácido fólico	0,03
		Biotina	116,00

Adaptado de: Oliveira (1986)

O reaproveitamento do soro é de grande interesse nas indústrias alimentícias pois além do valor nutricional, o soro do leite possui também a proteína  $\alpha$ -lactoglobulina na sua composição. A  $\alpha$ -lactoglobulina possui como particularidade uma estrutura do tipo lipocalina que forma um “cálice” de caráter hidrofóbico conferindo propriedades funcionais de importante aplicação na indústria de alimentos, como capacidade de emulsificação, formação de espuma, geleificação e ligação de aroma e sabor (Morr & Foegeding, 1990).

Outro fato de relevância ao se tratar do aproveitamento do soro oriundo da produção do queijo é sua alta capacidade de poluição. Por possuir alta carga orgânica, sólidos suspensos, óleos, gordura, alta concentração de sal e caráter ácido, sua presença em lagos e rios é indesejável, sendo considerado um risco ambiental (Casal *et al.*, 2006).

Dentre os usos mais comuns para o aproveitamento do soro pode-se citar seu uso *in natura* para alimentação animal no setor da agropecuária, na fabricação de produtos lácteos como ricota e iogurte e a concentração para produção de soro em pó, muito utilizado como suplemento alimentar (Giroto & Pawlowsky, 2001). O aproveitamento alternativo do soro vem sendo estudado em diversos âmbitos, entre eles: como fonte de nutrientes em meio de cultura para produção de Goma Xantana (Nitschke *et al.*, 2001), na agricultura para irrigar plantações de tomate (Prazeres *et al.*, 2014), na fabricação de pão de queijo vendidos na forma congelada (Tesse *et al.*, 2010) e na produção de doces vendidos prontos, como doce de leite (Lima & Rocha, 2017).

## 1.4 Queijo Minas Frescal

O queijo Minas é um queijo tipicamente brasileiro e pode ser encontrado em todo o país. A produção brasileira de queijo Minas Frescal representa em média 68% dos queijos frescos e 5% dos queijos totais produzidos (Zacarchenco *et al.*, 2011). Este queijo é produzido a partir de leite de origem bovina e possui sabor pouco ácido e agradável. A produção do queijo Minas Frescal é simples, não necessita de maturação e pode ser tanto artesanal, quanto em escala industrial. É também um queijo de bom rendimento de fabricação (Sangaletti., 2007).

O queijo Minas Frescal tem como padrão de identidade definido pelo MAPA muito alta umidade, possui massa branca e é semigordo, quanto ao teor de gordura em seu extrato seco (Brasil, 2004). O queijo ao qual é adicionado fermento antes da sua coagulação possui pH na faixa de 5,1, enquanto o queijo que não leva fermento é menos ácido com pH de aproximadamente 6,7. A adição de fermento láctico ao queijo Minas frescal é opcional e está relacionado com o aroma, sabor e segurança que os microorganismos presentes no fermento podem proporcionar (Isepon & Oliveira, 1995). Por ser um queijo fresco, não passa pelo processo de maturação, possuindo massa crua com alto teor de umidade. Essas características de baixo processamento tornam esse tipo de queijo mais susceptível à contaminação, possuindo assim uma baixa vida de prateleira, de até 21 dias. (Zacarchenco *et al.*, 2011).

## 1.5 Queijo Minas frescal e sua segurança

As doenças transmitidas por alimentos são um problema mundial de saúde pública, com 1,5 bilhões de casos de gastroenterites por ano. Essas doenças afetam principalmente crianças na primeira infância, com casos predominantes nos países em desenvolvimento, levando a 125000 óbitos por ano. É estimado pela Organização Mundial de Saúde que 600 milhões, quase 1 a cada 10 pessoas no mundo, ficam doentes após ingerir alimentos contaminados (FAO/WHO, 2015).

Atualmente, os surtos de doença transmitidas por alimentos ocorrem em qualquer veículo, seja o produto de origem animal, como carnes, embutidos ou laticínios, ou produtos de origem vegetal como frutas e legumes *in natura* (Brasil, 2016). Os produtos lácteos são produtos relevantes, quando se trata de doenças transmitidas por alimentos. O queijo Minas frescal, por ser produzido com o leite não ultrapasteurizado, está susceptível a diversos tipos de contaminação, predominantemente por *Staphylococcus aureus*. Isso se deve, principalmente, à alta incidência de mastite nas vacas de ordenha no Brasil. A mastite é uma

infecção no úbere da vaca que contamina o leite, principal ingrediente da fabricação de queijos (Oliveira *et al.*, 2001). Por possuir elevado teor de umidade, ter baixa vida de prateleira e ser muito manipulado durante o processo de fabricação, o queijo Minas frescal apresenta condições propícias para contaminação, sobrevivência e multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas, podendo causar doenças veiculadas por alimentos (Câmara *et al.*, 2002).

**Tabela 3:** Levantamentos da ocorrência de estafilococos coagulase positiva em queijos Minas frescal comercializados no Brasil.

Município/Estado	Amostras Positivas (%)	Referência
São José do Rio Preto/SP	100	Hoffmann <i>et al.</i> , 2002
Cuiabá/MT	97	Loguercio; Aleixo 2001
Cuiabá/MT	86,7	Leite <i>et al.</i> , 2005
Ouro Preto/MG	70	Sabioni; Maia 1998
Campo Grande/MS	70	Camara <i>et al.</i> , 2002
Ouro Preto/MG	62,75	Nascimento <i>et al.</i> , 1985
São José do Rio Preto/SP	43	Peresi <i>et al.</i> , 2001
Rio de Janeiro/RJ	38,4	Silva, 1998
Jaboticabal/SP	30	Salotti <i>et al.</i> , 2006
Rio de Janeiro/RJ	27	Barros <i>et al.</i> , 2004
Lavras/MG	20,3	Carvalho <i>et al.</i> , 1981
Rio de Janeiro/RJ	17,7	Araújo <i>et al.</i> , 2002

Adaptado de: KOMATSU *et al.*, 2010

Como mostrado na tabela 3, queijos oriundos do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais apresentaram contaminação de *Staphylococcus aureus*. Estudos realizados em produtos vendidos em feira livre da cidade de Uruaçu, em Goiás, apontaram uma alta contaminação de *S. aureus* em queijos Minas frescal artesanal com contagem atingindo  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) (Oliveira *et al.*, 2015). O Ministério da Agricultura estabelece na Resolução RDC No. 12 de 02 de janeiro de 2001, como padrão

microbiológico legal para estafilococos coagulase positivo, o máximo de 500 amostras indicativas para cada 5 amostras analisadas por lote (Brasil, 2001). Em Uberlândia, Minas Gerais, foi atestado, após investigação, que 88% das amostras de queijo Minas frescal analisadas estavam fora do padrão estabelecido pelo Ministério da Agricultura (Komatsu *et al.*, 2009). Na cidade do Rio de Janeiro, 45 amostras de queijos Minas frescal de três marcas distintas foram analisadas microbiologicamente e 95% apresentaram contagem de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira (Araújo *et al.*, 2002).

A listeriose é considerada de crescente importância na saúde pública devido a sua alta taxa de hospitalização, 94% nos Estados Unidos e 91,6% na Europa (Allerberger and Wagner, 2010) e sua alta mortalidade, entre 15 e 30% (CDC, 2013). Diversos estudos reportaram a presença de *Listeria monocytogenes* nas etapas de produção de laticínios assim como nos queijos já prontos. Kabuki *et al.*, pesquisaram *L. monocytogenes* em 246 amostras de queijos frescos nos Estados Unidos e reportaram 6,3% de contaminação (Kabuki *et al.*, 2004). Em 2002, dois surtos de listeriose ocorreram na Colômbia, Canadá, sendo o carreador do patógeno um queijo cremoso feito com leite pasteurizado (McIntyre *et al.*, 2014).

Apesar da legislação brasileira vigente proibir a presença de *L. monocytogenes* em 25g de amostra (Tabela 5), esse patógeno vem sendo repetidamente encontrado em queijo Minas frescal e outros queijos. Lima *et al.*, reportaram 11,75% de contaminação de *L. monocytogenes* e 2,9% de contaminação de *Listeria innocua* dentre as 34 amostras de queijos mussarela adquiridas em comércio varejista de Goiânia (Lima *et al.*, 2015). Vallim *et al.*, mostraram a incidência de espécies de *Listeria* por 20 anos no Brasil, sendo o queijo Minas frescal um dos produtos citados como contaminados durante esse período (Vallim *et al.*, 2015).

Outro patógeno comumente associado à contaminação de alimentos é *Escherichia coli*. Sendo comumente encontrado nos queijos frescos, *E. coli* é considerado um microrganismo indicador de contaminação fecal, permitindo a identificação da condição de produção e sugerindo uma possível presença de patógenos no produto (Fernandes *et al.*, 2006). A maioria da contaminação do queijo Minas frescal por *E. coli* é oriunda da má manipulação e produção do mesmo.

Visto isso, pode-se afirmar que a realidade da comercialização do queijo Minas se encontra abaixo da desejada. Uma das alternativas para a implementação de melhorias seria com o uso de probióticos como forma de bioproteção.

**Tabela 4:** Levantamentos da ocorrência de *Escherichia coli* em queijos Minas frescal comercializados no Brasil.

Município/Estado	Amostras Positivas (%)	Referência
Belo Horizonte/MG	74,3%	Pereira <i>et al.</i> , 1999
Cuiabá/MT	93,33%	Loguercio & Aleixo, 2001
Londrina/PA	32,1%	Silva <i>et al.</i> , 2006
Campo Grande/MS	98%	Camara <i>et al.</i> , 2002
São Paulo/SP	61%	Rocha <i>et al.</i> , 2006

**Tabela 5:** Legislação Brasileira para queijo com muita alta umidade segundo ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) Portaria RDC Nº 12 e Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento 1996

ANVISA Portaria RDC Nº 12					
Microrganismo	Tolerância para Amostra Indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
		N	c	m UFC/g	M UFC/g
Coliforme a 45 °C	500	5	2	50	500
Estaf. coag positiva/g	500	5	1	100	500
<i>Salmonella</i> sp/25g	ausência	5	0	Aus	-
<i>L. monocytogenes</i> /25g	ausência	5	0	Aus	-
Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento 1996					
Microrganismo	Categoria I.C.M.S.F.*	Tolerância para Amostra Representativa			
		n	c	m UFC/g	M UFC/g
Coliforme total	5	5	2	5000	10,000
Coliforme a 45 °C	5	5	2	1,000	5
Estaf. coag positiva/g	5	5	2	100	1,000
<i>Salmonella</i> sp/25g	10	5	0	0	-
<i>L. monocytogenes</i> /25g	10	5	0	0	-

\* Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos n: número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. c: número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes). m: limite que, em um plano de três

classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável. M: limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável.

## 1.6 Probióticos

Atualmente vem crescendo a busca por uma alimentação que não seja apenas fonte de nutrientes, mas que também seja funcional. Alimentos funcionais são alimentos comuns adicionados de componentes ou ingredientes que levem algum benefício à saúde, além da nutrição, promovendo a saúde e o bem-estar do consumidor (Siro *et al.*, 2008). O termo biofuncional é usado quando o efeito benéfico do alimento é realizado através de microrganismos (Gobbetti *et al.*, 2010). Dentro dos alimentos biofuncionais, o grupo de alimentos probióticos vem ganhando destaque por suas diversas vantagens (Hojsak *et al.*, 2016). Probióticos são definidos pela Organização Mundial de Saúde como microrganismos que, quando administrados na quantidade adequada promovem benefícios à saúde humana (WHO, 2015).

A microbiota gastrointestinal é composta por mais de 500 espécies e chega a um número aproximado de  $10^{14}$  células bacterianas e fúngicas. Esta colonização tem início após o nascimento e é constituída por um complexo ecossistema, incluindo bactérias anaeróbias e aeróbicas. A prevalência desses microrganismos pode ser alterada por diversos fatores como: pH, sinergismo e antagonismo entre as espécies, idade, processos infecciosos, estresse, hospitalização e tratamentos com antibióticos (Linskens *et al.*, 2001).

O uso de probióticos leva a regulação e equilíbrio da microbiota gastrointestinal. O alcance desse equilíbrio tem como benefícios a redução de diarreia associada ao uso de antibióticos, a eliminação de patógenos indesejáveis, como *Helicobacter*, e a melhora de doenças inflamatórias do intestino, como doença de Crohn's (Markowiak *et al.*, 2017). Podem ser citadas também a imunomodulação, redução de colesterol sérico e diminuição de doenças alérgicas (dermatite atópica na infância, por exemplo), como outros benefícios derivados do uso de probióticos (Jones *et al.*, 2012). O uso de probióticos também pode reduzir a intolerância à lactose e alergias alimentares (Szajewska *et al.*, 2006).

Estudos recentes demonstraram que existe uma conexão entre a composição da microbiota gastrointestinal e doenças metabólicas como obesidade e diabetes. Dessa forma, foi demonstrado também que probióticos podem ser utilizados como tratamento promissor de diabetes tipo 2, cirrose não alcoólica e como prevenção à obesidade (Hampe *et al.*, 2017).

*Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* possuem a capacidade de diminuição da glicose no sangue, através da redução da resistência à insulina (Yadav *et al.*, 2006).

### **1.6.1 Microrganismos probióticos**

Para ser classificado como probiótico, o alimento deve conter microrganismos capazes de se multiplicar no ambiente do trato gastrointestinal. Para isso, esses microrganismos devem ser capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, devendo ser assim, resistentes à bile e ao ácido clorídrico presentes no intestino e estômago, respectivamente. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são gêneros ideais para implementação em alimentos, visto que são ácido e bile resistentes, podem fazer parte da microbiota gastrointestinal e são capazes de aderir às células intestinais (Saxelin *et al.*, 2010).

A dose mínima diária de microrganismos probióticos recomendada, para que o trato gastrointestinal seja afetado e promova os efeitos benéficos à saúde humana, está entre  $10^6$  e  $10^9$  células viáveis. Essa dose é variável e depende de fatores como o microrganismo probiótico em questão, a forma consumida (inserida no alimento, na forma de cápsula ou pílula) e a aplicação para qual está sendo usada. Apesar das possíveis variações com relação a dose, é consenso universal que probióticos devem ser consumidos diariamente (Edward & Champagne, 2015).

A ANVISA determina que podem ser considerados probióticos os seguintes microrganismos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (Brasil, 2008). Essa determinação pode ser feita desde que, após pesquisa, os microrganismos apresentem características citadas na Tabela 6.

### **1.6.2 Probióticos em alimentos**

Microrganismos probióticos são sensíveis a diversas condições de estresse, como pH, acidez e temperatura. Desta forma, a escolha do probiótico utilizado para cada situação específica é importante (Shafire *et al.*, 2017). É desejável que microrganismos probióticos possuam as características apresentadas na Tabela 6 para que possam ser incorporados em produtos alimentícios.

A incorporação de probióticos em alimentos é complexa e diversos fatores devem ser levados em consideração para o sucesso da mesma. Primeiramente, a condição de processamento e os ingredientes utilizados devem ser compatíveis com a sobrevivência do microrganismo em questão. O metabolismo do probiótico deve ser levado em consideração, não apenas para o crescimento do mesmo, mas também para manter a qualidade do alimento. Lactobacilos heterofermentativos produtores de CO<sub>2</sub> como metabólito final, por exemplo, não são recomendados para incorporação em alimentos visto que a formação de gás prejudica o produto final (Ammor & Mayo, 2007).

Outro fator importante é a compatibilidade da matriz do alimento com a multiplicação do probiótico. Caso seja necessária a fermentação, essa matriz do alimento deve suportar a multiplicação do probiótico. A embalagem e seu ambiente também devem ser adequados para a sobrevivência do probiótico durante o transporte e armazenamento. É determinante também que a adição do probiótico não interfira no sabor, textura ou aroma do produto (Crittenden, 2009).

Apesar da viabilidade dos microrganismos probióticos não ser necessária para todos os seus benefícios, como por exemplo imunomodulação, este ainda é um aspecto essencial para a maioria dos outros efeitos que podem ser promovidos à saúde do consumidor (Kirjavainen & Salminen, 2003). Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, como o estado fisiológico do probiótico, pH, temperatura e atividade de água, influenciam na sobrevivência dos microrganismos probióticos. Esses fatores devem ser levados em consideração em todas as etapas, desde a adição do probiótico no alimento até seu consumo (Crittenden, 2009).

**Tabela 6:** Características desejáveis de probióticos para uso em produtos alimentícios

Critérios	Propriedades Desejáveis
Segurança	Origem animal ou humana
	Histórico de uso seguro
	Diagnóstico de identificação preciso (traços fenótipos e genótipos)
	Ausência de características patogênicas
	Ausência de efeitos adversos
Funcionalidade	Ausência de genes de resistência a antibióticos
	Competitividade com a microbiota colonizadora do trato gastrointestinal
	Resistência a sais biliares e enzimas
	Resistência ao baixo pH do estômago
	Atividade antagonista a patógenos (ex: <i>H.pylori</i> , <i>Salmnoella spp</i> , <i>Listeria spp</i> )
Aplicações Tecnológicas	Resistência a bacteriocinas e ácidos produzidos pela microbiota intestinal endógena
	Capacidade de aderir, colonizar e sobreviver no trato gastrointestinal
	Estabilidade genética
	Resistência a bacteriófagos
	Sobrevivência durante o armazenamento do produto
	Culturas de alta produção

Adaptado de: Markowia *et al.*, 2017

### **1.6.3 Probióticos no panorama mundial**

O Japão é o líder mundial no desenvolvimento de produtos funcionais e, principalmente, no consumo de probióticos, tanto na forma de alimentos como em cápsulas e na forma em pó. O país foi o primeiro a implementar um sistema regulatório para alimentos funcionais e probióticos em 1991. Segundo a legislação japonesa, os produtos probióticos são caracterizados como Alimentos para Uso Específico na Saúde (Foods for Specific Health Uses – FOSHU). Para ser considerado como FOSHU o alimento deve seguir à risca o processo da legislação vigente, comprovando eficácia, segurança, processo e formulação (Amagase, 2008).

Na Europa, o mercado de probióticos e alimentos funcionais vem crescendo rapidamente, com maior foco em produtos lácteos probióticos, como iogurtes e leites fermentados (Stanton *et al.*, 2001). Todos os microrganismos utilizados em alimentos devem ser rigidamente regulados pelo órgão QPS – Qualified Presumption of Safety, que comprova a segurança e eficácia dos produtos (Herody *et al.*, 2015).

O Brasil foi o primeiro país latino americano a incluir uma regulação voltada para probióticos na legislação de segurança alimentar. Os probióticos são considerados alimentos funcionais e são controlados pela ANVISA (Arora & Baldi, 2015).

### **1.6.4 Probióticos como bioproteção**

Devido à elevada perecibilidade do queijo Minas frescal, ao aumento de cepas resistentes a conservantes e à crescente demanda dos consumidores por alimentos não processados e não alterados quimicamente, o desenvolvimento de alternativas naturais para preservação de alimentos vem despertando interesse (Mieszkin *et al.*, 2016). Dentre as medidas preventivas para a redução da contaminação de alimentos, destaca-se a implementação de medidas estratégicas de qualidade na indústria e o uso de conservantes. Boas práticas de fabricação e análise de perigos e pontos críticos de controle são exemplos de medidas estratégicas de qualidade na indústria. Os conservantes utilizados podem ser naturais ou artificiais como sorbato de potássio, benzoato de sódio e sulfitos (Erickson & Dyle, 2016). Uma das alternativas ao uso de conservantes artificiais é o uso de bactérias lácticas como bioproteção. A biopreservação ou bioproteção é o uso de culturas microbiológicas selecionadas pela sua capacidade de competir e controlar o crescimento de microrganismos patogênicos ou

deteriorantes em produtos alimentícios, visando aumentar sua vida de prateleira e segurança (Mills *et al.*, 2011).

Bactérias ácido lácticas são utilizadas a milhares de anos na produção de alimentos fermentados, devido a sua capacidade de acidificação, prevenindo contra possíveis patógenos e também fornecendo sabor e textura ao alimento (Delavenne *et al.*, 2012, Schnürer & Mangusson, 2005). Além da preservação por acidificação, cepas específicas de bactérias ácido lácticas podem produzir substâncias antimicrobianas, entre elas; peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, metabólitos secundários, como reuterina e reuter ciclina, e compostos antifúngicos, como propionato e fenil-lactato (Yang *et al.*, 2012).

Dentre o gênero *Lactobacillus*, diversas espécies já foram descritas com propriedades antifúngicas, como *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* entre outros (Zoeghi, *et al.*, 2014). Levando em consideração o aumento da resistência fúngica a antibióticos e conservantes amplamente utilizados, como os ácidos sórbico e benzoico, o uso de probióticos como bioproteção é uma alternativa importante (Viljoen, 2001).

O queijo é um produto lácteo com bom potencial para incorporação de culturas probióticas quando comparado com leites fermentados. Isso devido a características físico-químicas como pH mais alto, maior vida de prateleira, maior quantidade de gordura, menos oxigênio livre, textura mais densa e maior disponibilidade de nutrientes. Essas características aumentam a capacidade de sobrevivência de cepas probióticas (Karimi *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, alimentos probióticos vêm alcançando um espaço cada vez maior, indo além do tradicional iogurte e leite fermentado. O número de alimentos no qual probióticos vêm sendo incorporados aumenta (Tabela 7) e dessa forma o foco nessa linha de pesquisa também. Apesar disso, manter a viabilidade do probiótico nos alimentos e simular a simbiose presente em muitas fontes probióticas ainda apresenta desafios.

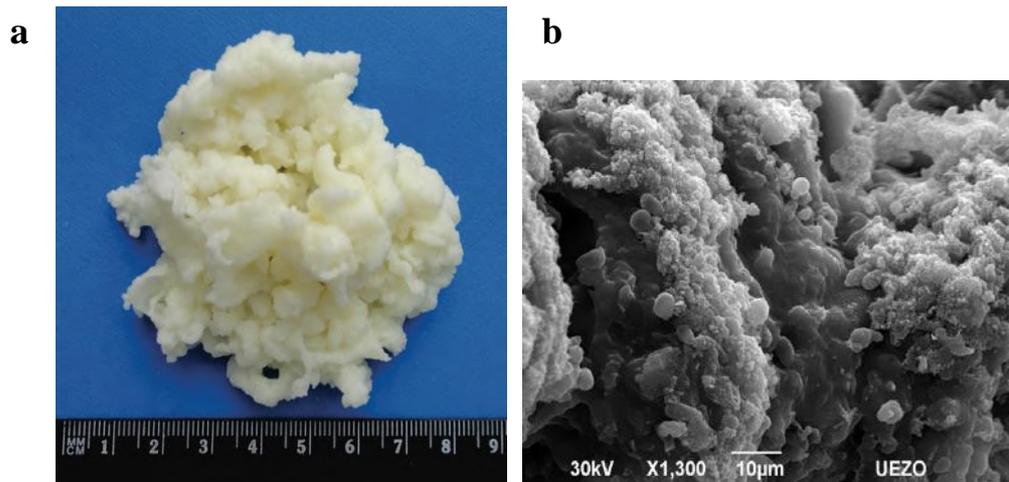
**Tabela 7:** Exemplos de alimentos fermentados contendo probióticos

Produto	Microrganismos probióticos	Referência
Iogurte	Diversos do gênero lactobacilli e bifidobacteria	Boylston <i>et al.</i> , 2004
Leite fermentado	<i>B.animalis</i> subsp <i>lactis</i>	Doleyres & Lacroix, 2005
Queijos Maturados	Especies de <i>L.casei</i> , <i>L.paracasei</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>B.animalis</i> subsp <i>lactis</i> , <i>L.acidophilus</i>	Bergami <i>et al</i> , 2006
Queijos Frescos	<i>L.rhamnosus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.paracasei</i>	Boylston <i>et al.</i> , 2004
Sorvetes	<i>L.johnsonii</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i>	Alamprese <i>et al.</i> , 2005
Leite em pó	<i>L.rhamnosus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>B.animalis</i> subsp <i>lactis</i>	Mattila-Sandholm <i>et al</i> 2002
Leite de soja fermentado	<i>L.rhamnosus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>B.animalis</i> subsp <i>lactis</i> , <i>L.johnsonii</i> , <i>L.casei</i> ,	Donkor & Shah, 2008
Suco	<i>L.rhamnosus</i> , <i>B.animalis</i> subsp <i>lactis</i>	Lucklow <i>et al.</i> , 2005

### 1.7 Kefir como uma fonte de microrganismos probióticos

Dentre os alimentos probióticos, destaca-se o Kefir como alimento funcional. Kefir é uma bebida de leite fermentado que teve origem na região do Cáucaso-Balcãs e sua tradução adaptada significa “bem-estar” (Lo- pitz-Otsoa *et al.*, 2006). Apesar de não tão conhecido como outros produtos lácteos fermentados, o consumo do Kefir vem ganhando cada vez mais adeptos no mundo, sendo associado a benefícios à saúde há mais de 100 anos (Bourrie *et al.*, 2016).

Os grãos de Kefir se assemelham a pequenos floretes de couve-flor e possuem bactérias ácido lácticas, ácido acéticas e leveduras vivendo em simbiose em uma matriz de polissacarídeos conhecida como Kefiran e proteínas (Garrote *et al.*, 2010). Os grãos possuem de 0,3 a 3,0 cm em diâmetro, podendo variar de tamanho. Apresentam superfície irregular e um único ramo central. A cor dos grãos varia de amarelado para esbranquiçado e sua textura é viscosa e firme (Magalhães *et al.*, 2011).



**Figura 3:** a; Estrutura Macroscópica do Grão de Kefir (Leite *et al.*, 2013) b; Microscopia eletrônica de varredura da microbiota do grão de Kefir brasileiro (Leite, 2012)

O Kefir apresenta como principais componentes ácido láctico, etanol e gás carbônico. Essa bebida confere diversos benefícios à saúde como: efeitos antialérgicos e anti-inflamatórios, atua como imunomodulador e diminui a colonização de microrganismos patogênicos no trato gastrointestinal. O Kefir é rico em vitaminas do complexo A, B e K, cálcio, biotina, ácido fólico, sais minerais e possui parte das proteínas e da lactose digeridas (Leite *et al.*, 2013).

O estudo da microbiota do Kefir vem ganhando espaço, porém, ainda é de difícil realização. Isso se deve ao fato de que quando isolados, muitos dos microrganismos não crescem no leite ou têm sua atividade metabólica prejudicada (Koroleva, 1991). Por conta disso, o Kefir é considerado um exemplo de simbiose, sendo o crescimento e a sobrevivência das cepas individuais dependentes da presença de outras (Margulis, 1995). Como exemplo, pode-se citar o aumento da taxa de crescimento de *Lactobacillus kefir* na presença de *Candida kefir*. Quando os dois microrganismos são cultivados juntos há também um aumento na quantidade de ácido láctico, glicerol e etanol produzido (Linossier & Dousset, 1994). O

crescimento de diversas bactérias isoladas do kefir em meios enriquecidos com extrato de levedura é um indicador de que as leveduras encontradas nos grãos do Kefir são essenciais para a integridade e viabilidade da população bacteriana. Vitaminas, aminoácidos e outros fatores de crescimento essenciais para as bactérias são produzidos por leveduras, enquanto os produtos metabólicos das bactérias são utilizados como fonte de energia pelas leveduras (Viljoen 2001).

Nos estudos já realizados, as bactérias ácido-láticas destacam-se como o mais abundante grupo de microrganismo presente no Kefir. Essas bactérias se encontram em maior quantidade e convertem a lactose presente no leite em ácido láctico, gerando uma queda do pH e dessa forma preservando o leite através da acidificação. Outros microrganismos relevantes são as leveduras fermentadoras de lactose, que vão produzir etanol e CO<sub>2</sub> (Ratray & O'Connell, 2011). Estudos de caracterização microbiológica de diferentes amostras de Kefir brasileiros apontaram o *Lactobacillus paracasei* como a bactéria mais abundante e *Saccharomyces cerevisiae* como a levedura predominante. (Magalhães *et al.*, 2011).

A reprodução de toda essa complexa simbiose presente no grão dificulta sua fabricação em larga escala. Como alternativa, vem sendo utilizadas bactérias isoladas do Kefir, caracterizadas como probióticas, facilitando assim seu uso no desenvolvimento de novos produtos (Ratray & O'Connell, 2011).

## 2. JUSTIFICATIVA

O queijo Minas frescal, apesar do seu grande consumo, é susceptível à rápida multiplicação de microrganismos patogênicos e deterioradores. Existe uma crescente busca dos consumidores por alimentos livres de conservantes artificiais e que exerçam outras atividades benéficas a saúde, além do efeito nutricional. Neste cenário, a produção de queijo Minas frescal probiótico com características de segurança representa um potencial comercial. Em estudos anteriores (Leite, 2012) do nosso grupo, algumas estirpes isoladas do Kefir apresentaram potencial probiótico, entre elas: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (M1711B) e *Lactobacillus paracasei* (MRS59). A estirpe identificada como *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* M1711B apresentou como características probióticas a resistência a 0,5% de bile e inibição de microrganismos como *E. coli* e *Salmonella enterica*. Por outro lado, a estirpe identificada como *Lactobacillus paracasei* MRS59 apresentou como características probióticas a resistência a 1,0% de bile e inibição de *Escherichia coli*, *S. entérica* e *Listeria monocytogenes*, assim como produção de bacteriocinas contra *L. monocytogenes*. Levando-se em consideração a oportunidade de desenvolvimento de novos alimentos funcionais em função da demanda dos consumidores, o histórico destas espécies na produção de alimentos, bem como o potencial tecnológico comprovado por estas estirpes isoladas, apontam para um significativo potencial tecnológico neste estudo.

### **3 OBJETIVOS**

Este estudo tem como objetivo produzir queijo Minas frescal com propriedades probióticas, utilizando microrganismos com potencial probiótico isolados a partir do Kefir.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

- Avaliar a capacidade de bactérias lácticas atuarem como fermento na produção de queijo Minas frescal.
- Quantificar as bactérias lácticas ao longo da vida de prateleira dos queijos produzidos.
- Avaliar a qualidade microbiológica e pH dos queijos ao longo da estocagem sob refrigeração.
- Avaliar o efeito protetor das culturas lácticas no queijo intencionalmente contaminado com *Escherichia coli*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Origens das estirpes

As estirpes utilizadas foram previamente isoladas dos grãos de Kefir e caracterizadas com potencial probiótico por Leite *et al.*, 2015 (Tabela 8). A estirpe *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* M1711B foi isolada de uma amostra de Kefir obtida na cidade de Niterói, RJ e a estirpe *Lactobacillus paracasei* MRS59 foi isolada de uma amostra de Kefir obtida na cidade de Alfenas, MG. A estirpe *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* M1711B foi escolhida para ser utilizada devido a sua importância na textura, sabor e aroma final do produto.

Foi utilizada também a cultura láctica comercial 30 tipo “O” R-704, Christian Hansen® como fermento padrão, e será aqui referida como estirpe CH.

**Tabela 8:** Características das estirpes isoladas do Kefir utilizadas como fermento

Microrganismo	Código	Características probióticas					
		Resistência à Bile (% em MRS agar)		Aderência a células intestinais	Inibição de Patógenos		
		0,5	1			<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	MRS59	+	+	+	++	++	-
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	M1711B	-	-	-	±	±	-

Adaptado de: Leite *et al.*, 2015

**Tabela 9:** Origem dos microrganismos utilizados no trabalho

Microorganismos	Identificação	Laboratório de Origem
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 1229	LMA <sup>1</sup>
<i>Escherichia coli</i>	51215655	LIMM <sup>2</sup>
<i>Escherichia coli</i>	12114	LIMM
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076	LMA
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	LMA
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC MB32	LMA
<i>Listeria innocua</i>	2	LMA
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 10100	LMA
<i>Candida guilliermondii</i>	5009	LBAL <sup>3</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51600	LBAL
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	50800	LBAL
<i>Pichia kluyveri</i>	50945	LBAL
<i>Penicillium citrinum</i>	1334	LBAL
<i>Aspergillus sp</i>	1428	LBAL

1- Laboratório Microbiologia de Alimentos 2- Laboratório de Investigação de Microbiologia Médica 3 - Laboratório de Biotecnologia Ambiental e de Leveduras

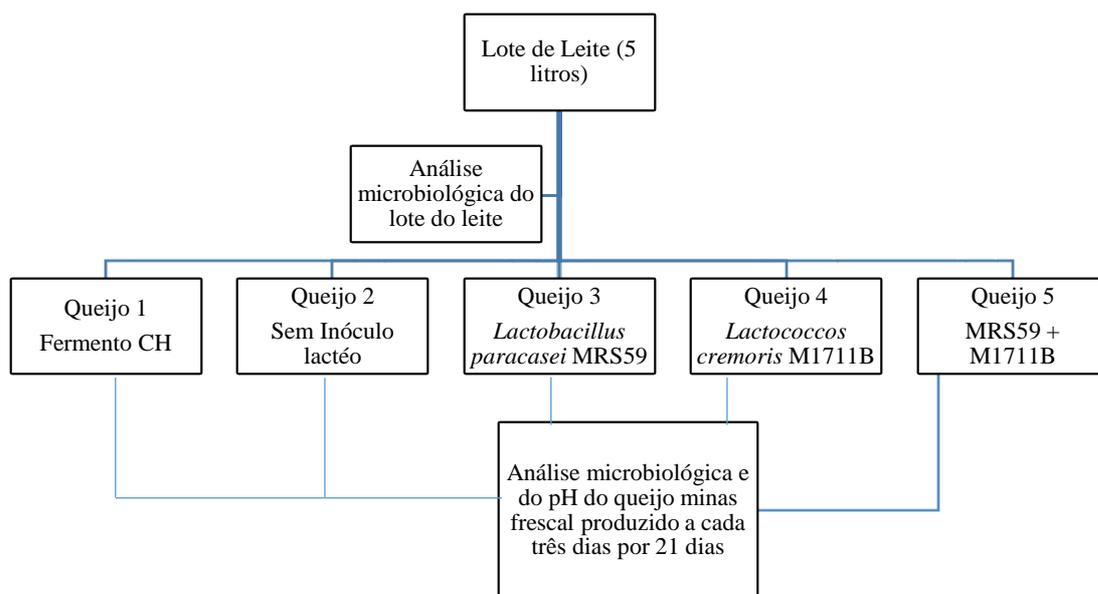
## 4.2 Produção dos queijos

Os queijos Minas frescal foram produzidos conforme a Figura 6, segundo a metodologia de Oliveira (1986). Para o estudo, foram produzidos cinco queijos com fermentos diferentes: queijo 1 com fermento comercial Christian Hansen®, queijo 2 sem inóculo de cultura láctica, queijo 3 com *Lactococcus cremoris* M1711B, queijo 4 com *Lactobacillus*

*paracasei* MRS59 e queijo 5 com ambas MRS59 e M1711B (Figura 5). Para cada queijo foram utilizados 1 litro de leite de mesmo lote.

Todos os queijos foram produzidos com leite pasteurizado integral, conhecido popularmente como “barriga mole”, de mesmo lote, obtido no mercado varejista da cidade do Rio de Janeiro no dia da produção. Os leites foram mantidos sob refrigeração até a produção dos queijos. Para a produção, todo material utilizado foi autoclavado.

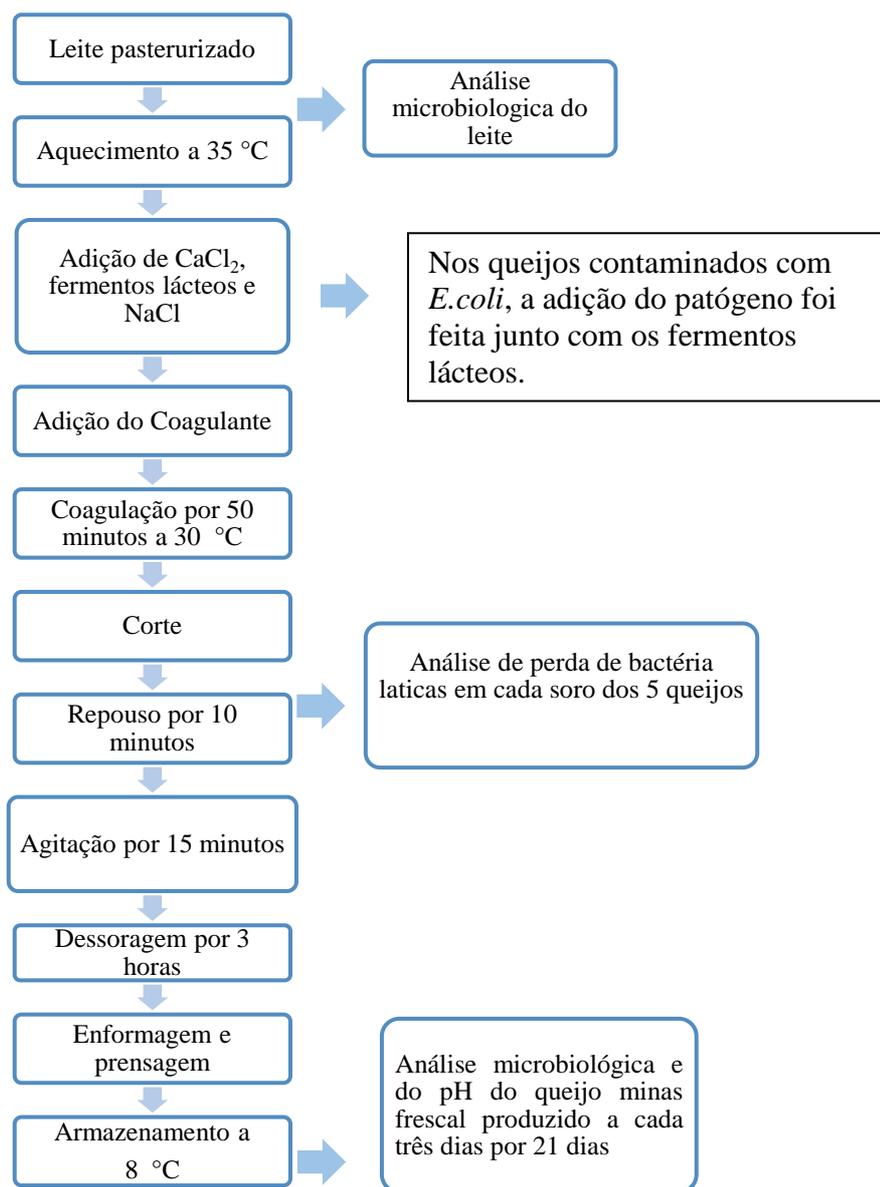
Para melhor entendimento, o conjunto da produção dos cinco queijos com fermentos diferentes será chamado de lote queijeiro (Figura 4). Cada lote queijeiro foi produzido com o mesmo lote de leite. Este consiste de cinco queijos com as diferentes combinações de fermentos. A produção dos lotes queijeiros foi realizada em triplicata. Logo, foram realizados 6 lotes queijeiros: 3 deles com as cinco combinações de fermentos lácteos e 3 intencionalmente contaminados com *E. coli*.



**Figura 4:** Fluxograma da produção representando um Lote Queijeiro

Queijo 1	Queijo 2	Queijo 3	Queijo 4	Queijo 5
• Fermento comercial Christian Hansen®	• Sem inóculo de cultura láctica	• <i>Lactobacillus paracasei</i> MRS59	• <i>Lactococcus cremoris</i> M1711B	• <i>Lactococcus cremoris</i> M1711B e <i>Lactobacillus paracasei</i> MRS59

**Figura 5:** Tipos de queijos produzidos e seus respectivos fermentos.



**Figura 6:** Fluxograma do processo de produção do queijo Minas Frescal e fermentos utilizados

## 4.2.1 Preparo do leite e análise microbiológica

Após assepsia da embalagem com álcool 70%, para cada variação de queijo foram aquecidos um litro de leite a aproximadamente 35 °C. Para cada análise foram homogeneizados 1mL de leite em 9mL de água peptonada 1% (HiMedia, Mumbai, Índia) por 30 segundos e diluições decimais foram realizadas. O leite foi analisado quanto aos seguintes parâmetros:

### 4.2.1.1 Contagem de bactérias heterotróficas mesófilas totais

Para a contagem de bactérias heterotróficas mesófilas totais a partir das diluições, o inóculo de 0,1mL foi semeado em Ágar Padrão para Contagem (APC) (Merck, Darmstadt, Germany). As placas foram incubadas a 37 °C por 24-48h. Após esse tempo, as colônias foram contadas para determinação de unidade formadora de colônia por mililitro (UFC/mL).

#### **4.2.1.2 Bactérias lácticas totais**

Para contagem de bactérias lácticas totais, a partir das diluições, o inóculo de 0,1mL foi semeado em Ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Acumedia, Lansing, USA). As placas foram incubadas a 37 °C por 48h em atmosfera de microaerofilia e então contadas para determinação de UFC/mL.

#### **4.2.1.3 Fungos e leveduras**

Para contagem de fungos e leveduras, a partir das diluições, o inóculo de 0,1mL foi semeado em Ágar Sabouraud 4% dextrose e incubado a 25 °C por até cinco dias. Após esse tempo, as colônias foram contadas para determinação de UFC/mL.

#### **4.2.1.4 Determinação do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes**

Para a determinação de coliformes totais, a partir das diluições, 0,1mL foi inoculado em três séries de tubos com Caldo Lactose Bile Verde Brilhante 2% (HiMedia, Mumbai, Índia) com tubos de Durham invertidos no seu interior e incubados a 37 °C por 48h. Para a determinação do Número Mais Provável de coliformes totais, foi realizada a leitura dos tubos de Caldo Lactose Bile Verde Brilhante 2% sendo positivos os que apresentaram crescimento e gás no interior dos tubos de Durham. Para o controle positivo foi utilizada a cultura *Escherichia coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922.

Para a determinação de coliformes termotolerantes, foram retirados uma alçada dos tubos de Caldo Lactose Bile Verde Brilhante 2% que apresentaram resultado positivo para um tubo com 5mL de Caldo EC (HiMedia, Mumbai, India) contendo tubo de Durham. Esses tubos foram incubados por 24hr a 45 °C em banho-maria. Para a realização da cultura, foram considerados positivos aqueles que apresentaram crescimento e gás no interior dos tubos de Durham.

#### **4.2.1.5 *Salmonella spp***

Para determinação da presença de *Salmonella spp*, a partir das diluições, 1mL foi inoculado em tubos contendo 10mL de caldo tetracionato, e após incubação por 24h a 37 °C, uma alçada destes cultivos foi semeada na superfície dos meios: ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (KASVI, Brasil), ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) (KASVI) e ágar EMB (KASVI) usando a técnica de esgotamento visando a obtenção de culturas isoladas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o crescimento, foram consideradas positivas quando observadas as características morfológicas típicas de *Salmonella*. Como controle positivo foi utilizada a estirpe *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e como controle negativo a estirpe *S. aureus* ATCC 25923.

#### **4.2.2 Preparo e adição dos inóculos**

A partir de culturas estoques, os fermentos lácteos foram ativados em 3mL de caldo MRS e incubados à 37 °C por 48h. De uma alçada da cultura de 24h em caldo MRS foi realizado o esgotamento em ágar MRS, que foi incubado em microaerofilia à 37 °C por 48h. Colônias isoladas foram utilizadas para o preparo de 10mL de uma suspensão equivalente a escala 4 de Mac Farland  $1,2 \times 10^9$  unidade formadora de colônia por mL (UFC/mL).

Para a cultura 30 tipo “O” R-704, Christian Hansen®, foi adicionado 0,11g em 10 mL de salina equivalente a  $1,6 \times 10^9$  UFC/mL. Um mililitro de cada inóculo das culturas MRS59, M171B e CH foram adicionados ao leite. Para o queijo contendo simultaneamente as estirpes MRS59 e M1711B foram utilizados 0,5mL de cada.

Ao queijo sem fermento láctico foi adicionado de 1,0mL de solução salina 0,85%. A determinação de UFC/mL dos inóculos foi realizada por cultura em ágar MRS incubada à 37 °C por 48h em microaerofilia.

#### **4.2.3 Adição do cloreto de cálcio, sal e coagulante**

A cada litro de leite previamente inoculado foram adicionados 0,5mL de uma solução de cloreto de cálcio 50% (Dolcine Nutrição LTDA Juiz de Fora, MG, Brasil). Foi adicionado em seguida 15g de NaCl (Refinaria Nacional de Sal S.A., Sal Cisne, RJ, Brasil) por litro de leite.

Para adição do coagulante, 250 µL de coagulante (Quimase, Docina Nutrição Ltda, Juiz de Fora, MG, Brasil) foi homogeneizado em 1,5mL de água destilada estéril. O leite contendo cloreto de cálcio, sal e coagulante foi incubado à 30 °C por 50 minutos.

#### **4.2.4 Corte, repouso, agitação, dessoragem e enformagem**

Após a completa coagulação foram feitos cortes verticais e horizontais na massa com faca. Esta massa foi mantida em repouso por dez minutos para otimização da liberação do soro. Subsequentemente a massa foi homogeneizada com uma colher por 15 minutos até a obtenção de pequenos coágulos. Esse material foi transferido para formas de alumínio de 8 por 8 cm e prensadas por três horas.

#### **4.2.5. Contagem de bactérias lácticas no soro produzido**

Alíquotas de 0,1mL foram retiradas do soro de cada queijo no momento do repouso. Esse soro foi incubado direto em agar MRS à 37 °C por 48h. A contagem foi realizada para determinação de UFC/mL visando uma avaliação da perda de bactérias lácticas.

#### **4.2.6 Armazenamento**

Os queijos produzidos foram armazenados em sacos estéreis à 8 °C durante 21 dias.

### **4.3. Análise microbiológica dos queijos**

Imediatamente após o preparo e ao longo da estocagem, fragmentos de 1g de cada queijo foram homogeneizados em 9 mL de citrato de sódio 2% (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil). A homogeneização foi realizada em aparelho homogeneizador mecânico tipo Stomacher® (Marconi, MA 440). A partir dessa primeira diluição, as seguintes foram realizadas em água peptonada 0,1% e utilizados para pesquisa dos seguintes microrganismos: contagem de bactérias heterotróficas mesófilas totais, contagem de bactérias lácticas totais e contagem de fungos, conforme descrito no item 4.2.1.

**Tabela 10:** Meios de cultura utilizados para análise microbiológica do leite e queijos.

Meio de cultivo	Seletividade	Temperatura (°C)	Incubação	Tempo em horas
Ágar Padrão para Contagem (APC)	Báctérias mesófilas totais	37	Aerobiose	24-48
Caldo Lactose Bile Verde Brilhante 2%	Coliformes totais	37	Aerobiose	48
Caldo EC	Coliformes termotolerantes	45	Aerobiose	24
Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD)	<i>Salmonella spp</i>	37	Aerobiose	24
Ágar chromID™ Coli	<i>Escherichia coli</i>	37	Aerobiose	24-48
Ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS)	Báctérias lácticas	37	Microaerofilia	120
Ágar Saboraud Dextrose 4%	Fungos e leveduras	25	Aerobiose	168
Brain Heart Infusion	<i>Escherichia coli</i>	37	Aerobiose	24-48
Extrato de malte semi solido	Leveduras	30	Aerobiose	24-48

#### 4.4 Determinação do rendimento do queijo

O rendimento dos queijos foi calculado pela proporção entre o volume de leite usado e a massa de queijo obtida na produção, onde "m" (em grama) é a massa de queijo obtida e "v" o volume (em mililitro) de leite (FREIRE, 2009).

$$\text{Rendimento (\%)} = \left( \frac{m}{v} \right) \times 100$$

#### 4.5 Determinação do pH

O pH foi determinado com uso do potenciômetro (Medidor de pH MB10, marca Marte), após calibração do equipamento com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, seguida de leitura do valor do pH, conforme metodologia descrita na Instrução Normativa no 68 do MAPA (BRASIL, 2006).

## **4.6 Avaliação do efeito protetor dos fermentos lácteos em queijo intencionalmente contaminado com *Escherichia coli***

O queijo foi preparado conforme o item 4.2 e na etapa de adição do inóculo das culturas lácteas foi adicionado ao leite  $10^6$  UFC/mL de uma cultura de *Escherichia coli* ATCC 11229 previamente ativada em meio Brain Heart Infusion (BHI) por 18h à 37 °C.

Após a produção do queijo e ao longo da estocagem, foi realizada a determinação de *Escherichia coli* em ágar chromID™ Coli (COLI ID-F bioMérieux SA, Marcy l'Étoile, França) incubadas à 37 °C por 24hr. A determinação de bactérias lácticas, bactérias mesófilas heterotróficas totais e fungos também foram realizadas nos queijos comtaminados como previamente descrito (item 4.2.1).

## **4.7 Pesquisa de atividade antagônica produzida pelas bacterias lácticas utilizadas como fermento**

### **4.7.1 Pesquisa de atividade antibacteriana**

Visando determinar a ação antagonista das estirpes *Lactobacillus paracasei* MRS59 e *Lactococcus cremosis* M1711B isoladas do Kefir, foi empregado o teste de produção de substância antimicrobiana por difusão em ágar conforme descrito por Giambiagi-de Marval e colaboradores (1990). As estirpes produtoras (*Lactobacillus paracasei* MRS59 e *Lactococcus cremosis* M1711B) foram crescidas em 3 mL de caldo MRS e incubadas a 37 °C por 24h em microaerofilia. Após este período, 5 µL das suspensões foram dispensadas, na forma de pontos, sobre uma placa contendo 20 mL de agar MRS e, a seguir, esta placa foi incubada a 37 °C por 24h a 48h em microaerofilia. Após a incubação, as culturas foram inativadas por exposição a vapores de clorofórmio (Merck) por 30 minutos. As placas foram mantidas abertas por 30 minutos para a evaporação do clorofórmio. A atividade antagônica foi testada contra os seguintes microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* 5121565, *Escherichia coli* 1311, *Listeria spp innocua* 2, *Enterococcus faecalis* ATCC 10100, *Staphylococcus aureus* ATCC MB32, *Salmonella enteritidis* 13076 e *Salmonella typhimurium* 1408. Todas as estirpes foram previamente cultivadas em 3 mL de caldo BHI, por 18h a 37 °C. Uma alíquota de 50 µl desta suspensão foi inoculada em 5 mL de meio BHI semi-sólido (com 0,75% de agar bacteriológico) que, então, foi vertido sobre a placa contendo os pontos de crescimento das estirpes bacterianas inativadas.

Após a adição das estirpes indicadoras, as placas foram incubadas por 18h a 37 °C. Em seguida, a leitura dos resultados foi realizada, observando-se a formação ou não de halos de inibição do crescimento das estirpes indicadoras. Os testes foram realizados em duplicata.

#### 4.7.2 Pesquisa de atividade antifúngica

Para a determinação da atividade antagonista com fungos e leveduras foi realizado o teste de difusão em ágar como descrito por Magnusson & Schnürer, 2001. As estirpes produtoras (*Lactobacillus paracasei* MRS59 e *Lactococcus cremosis* M1711B isoladas de Kefir) foram crescidas em 3 mL de caldo MRS e incubadas a 37 °C por 24h em microaerofilia. Após este período, 5 µL das suspensões foram dispensadas, na forma de pontos, sobre uma placa contendo 20 mL de meio MRS sólido e, a seguir, esta placa foi incubada a 37 °C por 24h em microaerofilia. Após a incubação, as culturas foram inativadas por exposição a vapores de clorofórmio (Merck) por 30 minutos. As placas foram mantidas abertas por 30 minutos para a evaporação do clorofórmio. As placas então foram cobertas com 5 mL ágar malte semisólido de extrato de malte semi sólido (0,05% extrato de malte; Difco Laboratories e 0,75% ágar) contendo 10<sup>4</sup> células e/ou esporos, no caso dos fungos filamentosos, por mililitro. A atividade antagônica foi testada contra as leveduras: *Candida guilliermondii* 5009, *Saccharomyces cerevisiae* 51600, *Kluyveromyces thermotolerans* 50800, *Pichia kluyveri* 50945 e contra os fungos filamentosos: *Aspergillus spp* e *Penicillium citrinum* 1334. Após 48h de incubação aeróbica a 30 °C foi observado a presença ou não de halo. Os testes foram realizados em duplicata.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Qualidade bacteriológica dos leites utilizados

Todas as amostras de leite utilizadas para a produção dos queijos estavam dentro dos padrões microbiológicos estipulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001). Não foi detectada a presença de coliformes totais ou termotolerantes, bem como do patógeno *Salmonella spp.* Coliformes são bactérias indicadoras de contaminação fecal, entre eles *Escherichia coli*, gênero *Enterobacter* e gênero *Klebsiella*. Ainda como itens de controle não estipulados pela RDC No. 12 (2012) da ANVISA, em todas as amostras de leite foram analisados os parâmetros bactérias mesófilas heterotróficas totais e fungos. Nos seis lotes de leite analisados a contagem obtida de bactérias mesófilas heterotróficas totais esteve entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/mL. Fungos e leveduras só foram detectados em 4 dos 6 lotes de leites utilizados. Nos lotes em que foi detectada a presença de fungos e leveduras, a contagem destes microrganismos estava abaixo de  $10^4$  UFC/mL. As contagens de bactérias lácticas encontradas nos leites obtidos variaram entre  $10^2$  e  $10^3$  UFC/mL.

**Tabela 11:** Qualidade microbiológica dos diferentes lotes de leite utilizados na produção de queijos.

Lotes	BAL <sup>1</sup> (UFC/mL) <sup>2</sup>	Fungos (UFC/mL)	BMHT <sup>3</sup> (UFC/mL)	<i>Salmonella spp</i> (em 25mL)	Coliformes (NMP/mL) <sup>4</sup>
1	$3 \times 10^2$	$4,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$	não detectados	não detectados
2	$1,2 \times 10^2$	$6,5 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$	não detectados	não detectados
3	$5 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3$	não detectados	não detectados
4	$8 \times 10^2$	$2,7 \times 10^3$	$2 \times 10^4$	não detectados	não detectados
5	$2,2 \times 10^3$	não detectados	$1,5 \times 10^3$	não detectados	não detectados
6	$4,9 \times 10^2$	não detectados	$5,6 \times 10^4$	não detectados	não detectados

1- bactérias ácido lácticas; 2- Unidade formadora de colônia por mL; 3- bactérias mesófilas heterotróficas totais; 4- Número mais provável por mL

**Tabela 12:** Parâmetros de qualidade para leite pasteurizado Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada N° 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Leite Pasteurizado	Tolerância para Amostra Indicativa
Coliformes a 45 °C/mL	4
<i>Salmonella sp</i> /25mL	ausência

## 5.2 Análise do soro e rendimento

Durante a produção dos queijos tipo Minas frescal foram produzidos entre 800-850 mililitros de soro por litro de leite. A quantidade de bactérias lácticas liberadas neste soro durante a produção dos queijos permaneceu entre  $10^1$  e  $10^3$  UFC/mL, que correspondeu à 0,1 a 0,001% da quantidade inoculada ( $10^6$  UFC/mL). A média do rendimento obtido na produção dos queijos variou entre 16,6 e 15,5%, não havendo diferença entre os diferentes fermentos inóculos lácticos nas médias de rendimento (Tabela 13).

A média da contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) nos queijos 1, 3, 4 e 5 foi semelhante, alcançando contagem final entre  $10^9$  e  $10^{10}$  UFC/g. Isto representou um aumento de 2 a 3 log em relação a contagem inicial. A contaminação com *E. coli* não alterou a contagem final de BAL. No queijo 2, onde não houve inóculo láctico, o aumento da contagem das BAL nativas do leite também foi de 2 a 3 Log. Entretanto, a contagem final de BAL ficou entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/g, inferior em 2 e 3 log em relação aos demais queijos. Considerando os queijos que foram produzidos com e sem contaminação de *E. coli*, o queijo 4, contendo a estirpe *Lactococcus cremosis* M1711B e o queijo 5, com as estirpes MRS59 e M1711B, apresentaram maior de contagem de BAL no 9º dia de estocagem (Figura 8).

**Tabela 13:** Média de rendimento, quantidade de bactéria ácido láctica inoculada (BAL) e contagem final de BAL por lote queijeiro.

Lote Queijeiro	BAL <sup>1</sup> inoculada por litro de leite (UFC/mL) <sup>2</sup>	Média do Rendimento <sup>3</sup> (%)	Média da contagem de BAL <sup>4</sup> (UFC/g)	Contagem de BAL no queijo sem fermento láctico <sup>5</sup> (UFC/g)
1	$1,0 \times 10^6$	15,80	$2,5 \times 10^9$	$2,2 \times 10^7$
2	$1,0 \times 10^6$	15,75	$5 \times 10^8$	$2,9 \times 10^5$
3	$1,0 \times 10^6$	16,60	$2,3 \times 10^9$	$3,4 \times 10^7$
4	$1,0 \times 10^6$	15,52	$1,6 \times 10^9$	$3 \times 10^7$
5	$1,0 \times 10^6$	16,00	$3,3 \times 10^9$	$2,8 \times 10^6$
6	$1,0 \times 10^6$	15,58	$2,8 \times 10^9$	$2,4 \times 10^6$

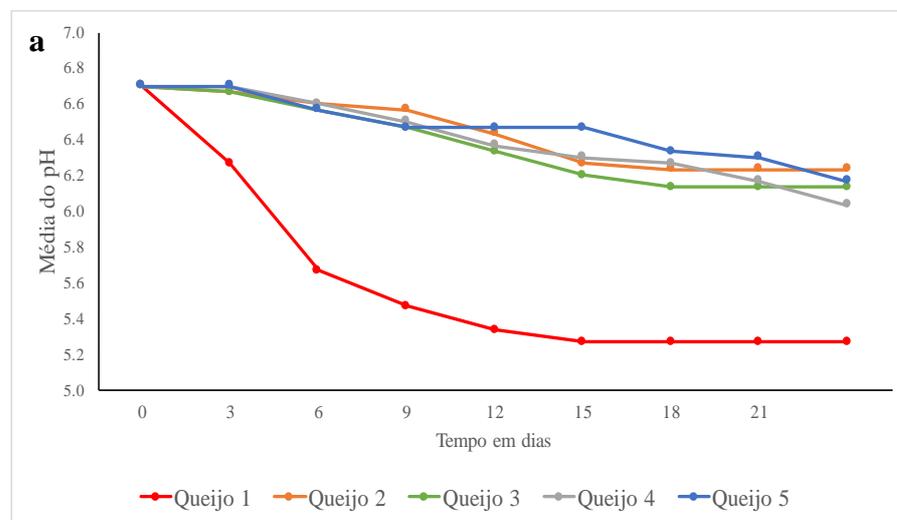
1: bactéria ácido láctica 2; Unidade formadora de colônia por mL 3; média do rendimento dos cinco queijos do lote queijeiro 4; média da contagem final de BAL de cada lote queijeiro 5; contagem final de BAL nos queijos sem fermento láctico (queijo 2) de cada lote queijeiro

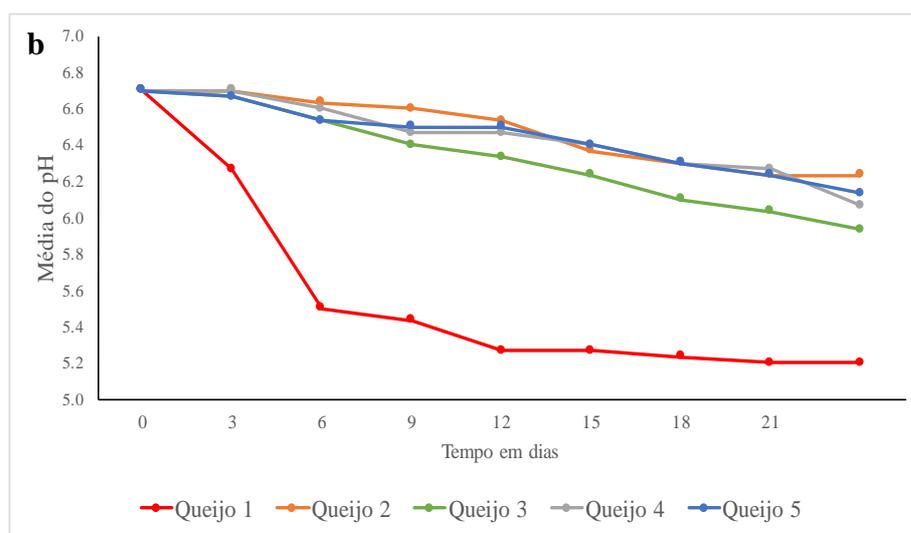
As características sensoriais do queijo foram analisadas ao longo dos 21 dias de estocagem. Apesar da leve alteração no odor e na formação de limosidade, não foi detectado nenhum sinal de deterioração como emboloramento aparente ou mudança de cor, com exceção

do queijo produzido sem inóculo de cultura láctica, que ao final da estocagem apresentou uma coloração amarelada.

### 5.3 Capacidade de acidificação dos fermentos utilizados

A acidificação do queijo Minas frescal produzida pela cultura comercial Christian Hansen® (queijo 1) foi superior às alcançadas pelas demais estirpes obtidas do Kefir como mostrado na figura 7. O queijo 1 apresentou acidificação rápida chegando a pH 5,1 no dia 15 de estocagem. A média do pH do queijo 5 foi semelhante no queijo não contaminado e no queijo contaminado com *E. coli*, 5,3 e 5,2, respectivamente. Os demais queijos apresentaram acidificação semelhante entre si, sendo esta mais lenta e com valor máximo de 5,9. Nos queijos intencionalmente contaminados com *E. coli* a estirpe MRS59, fermento láctico do queijo 3, apresentou maior acidificação (5,9) em relação ao queijo não contaminado (6,1). Nos queijos contaminados com *E. coli*, o queijo 2, não inoculado com cultura láctica, permaneceu com média de pH 6,5 até o 9º dia de estocagem, apresentando uma acidificação mais lenta em relação aos queijos com inóculo láctico.



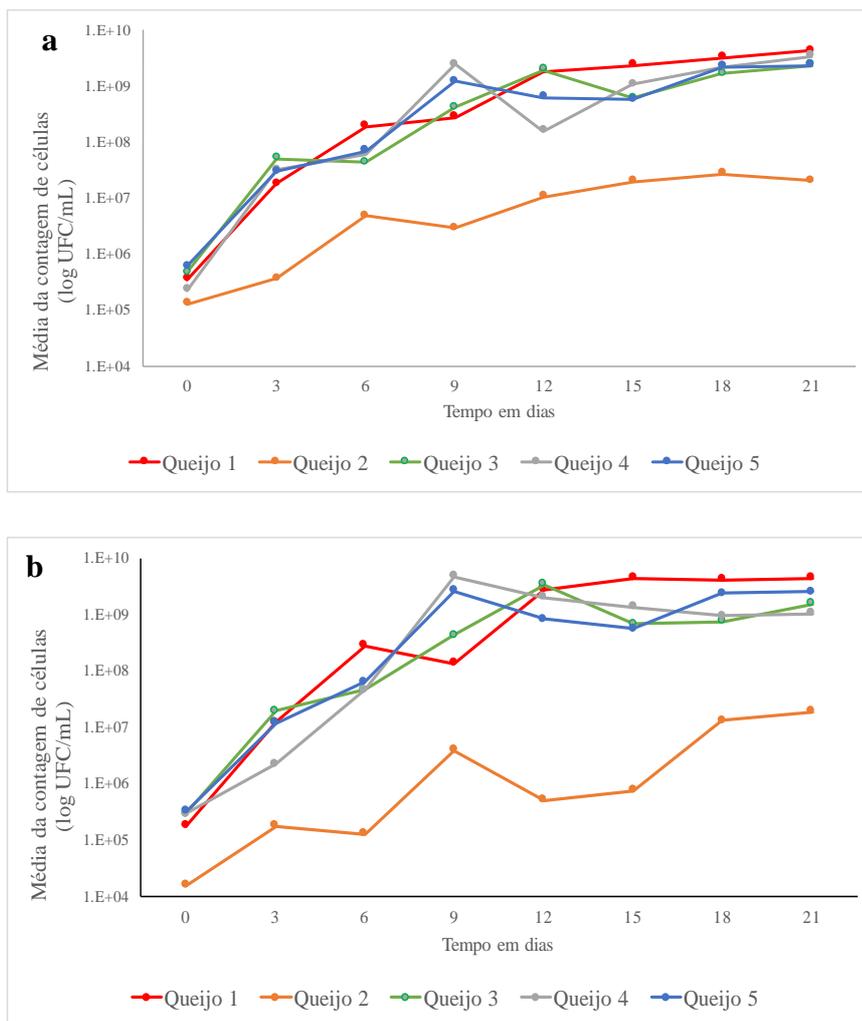


**Figura 7:** a; Média do pH em queijo Minas frescal com culturas probióticas durante a estocagem à 8 °C  
**b;** Média do pH em queijo Minas frescal contaminado com *E.coli* com culturas probióticas durante a estocagem à 8 °C **Queijo 1:** com fermento comercial Christian Hansen®; **Queijo 2:** sem inóculo; **Queijo 3:** com *Lactobacillus paracasei* MRS59 **Queijo 4:** com *Lactococcus cremosis* M1711B; **Queijo 5:** com ambas MRS59 e M1711B

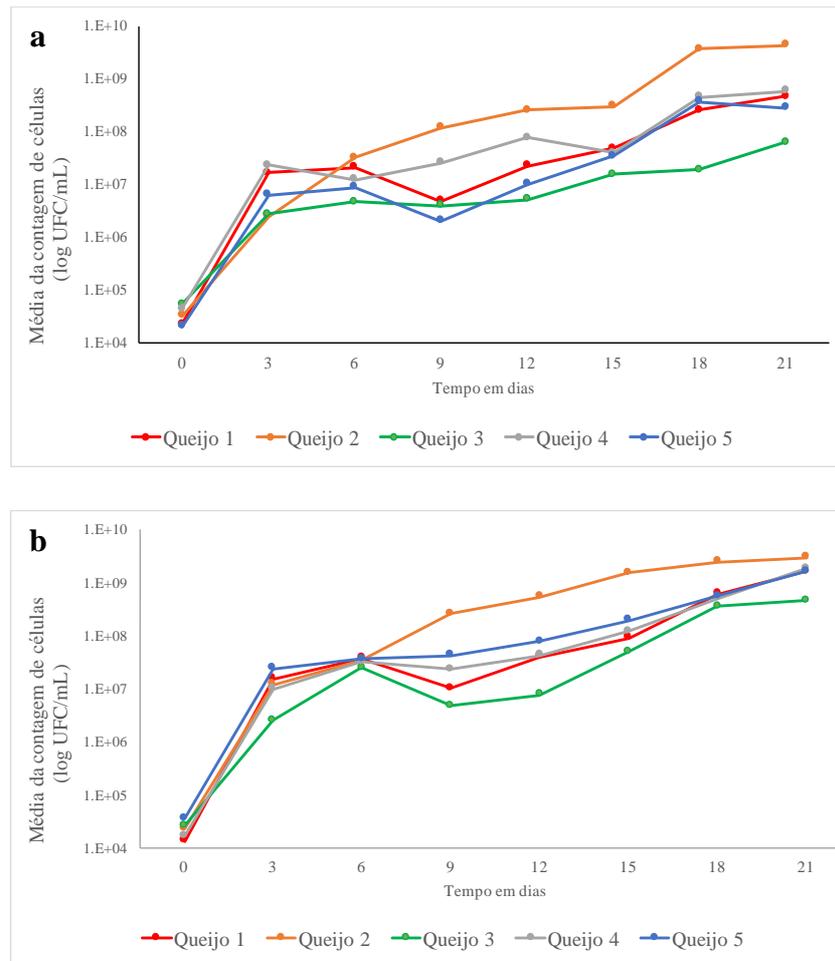
#### 5.4 Análise microbiológica dos queijos produzidos

Em todos os queijos produzidos as contagens dos demais grupos microbianos não lácticos foi equivalente, exceto no queijo não inoculado com fermento láctico (Figuras 9 e 10).

A estirpe identificada como *Lactobacillus paracasei* MRS59 teve um desempenho superior, reduzindo a contagem de fungos em 1 log em relação ao fermento comercial CH nos últimos dias de estocagem, tanto no queijo contaminado quanto no não contaminado com *E. coli*. No queijo contaminado com *E. coli* o desempenho da estirpe MRS59 na inibição de fungos foi menor em 1 log em relação ao queijo não contaminado. O queijo com a co-cultura das bactérias lácticas (queijo 5), apresentou atividade antifúngica na metade do período de estocagem (entre o 6º e o 12º dia), no lote não contaminado, chegando a menor média de contagem ( $10^6$  UFC/g) no 9º dia. O queijo 2, sem inóculo de cultura láctica, apresentou média de contagem final de fungos e leveduras 1 log superior em relação aos outros queijos, com média final, entre  $10^9$  e  $10^{10}$  UFC/g.

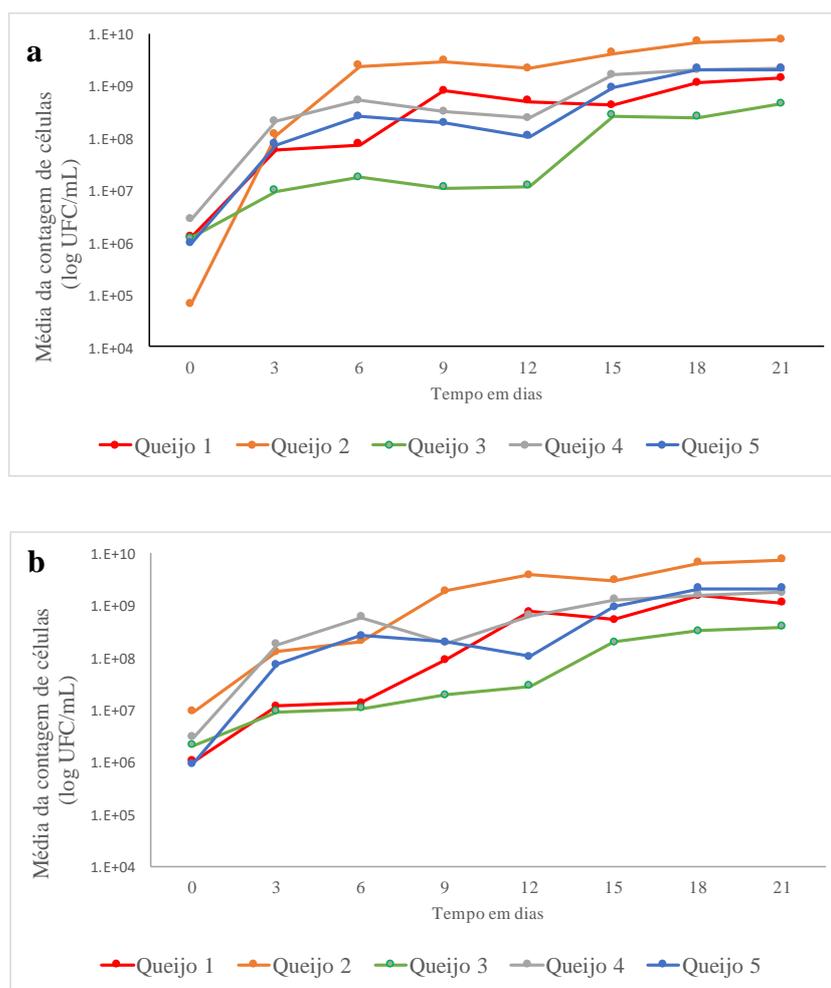


**Figura 8: a;** Média de contagem em log UFC/g da multiplicação de bactérias ácido lácticas em queijo Minas frescal com culturas probióticas durante a estocagem à 8 °C **b;** Média de contagem em log UFC/g da multiplicação de bactérias ácido lácticas em queijo Minas frescal contaminado com *E.coli* com culturas probióticas durante a estocagem à 8 °C **Queijo 1:** com fermento comercial Christian Hansen®; **Queijo 2:** sem inóculo; **Queijo 3:** com *Lactobacillus paracasei* MRS59 **Queijo 4:** com *Lactococcus cremosis* M1711B; **Queijo 5:** com ambas MRS59 e M1711B



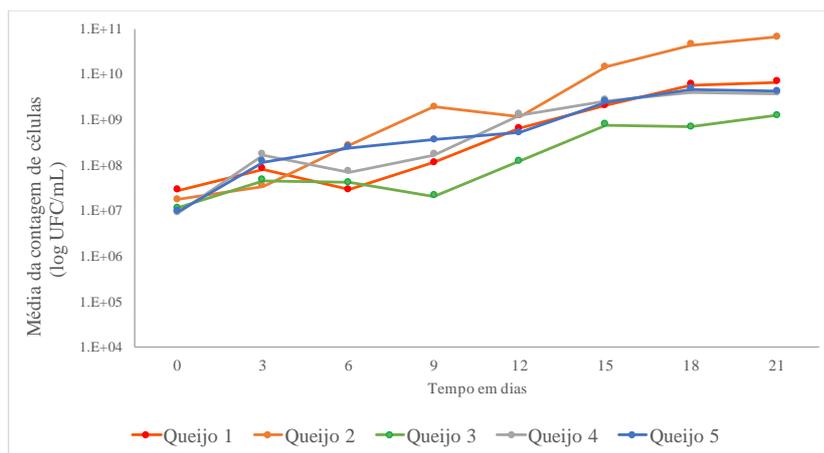
**Figura 9:** a: Média de contagem em log UFC/g da multiplicação de fungos e leveduras em queijo Minas frescal com culturas probióticas durante a estocagem à 8 °C. b: Média de contagem em log UFC/g da multiplicação de fungos e leveduras em queijo Minas frescal contaminado com *E.coli* com culturas probióticas durante a estocagem à 8 °C. **Queijo 1:** com fermento comercial Christian Hansen®; **Queijo 2:** sem inóculo; **Queijo 3:** com *Lactobacillus paracasei* MRS59 **Queijo 4:** com *Lactococcus cremosis* M1711B; **Queijo 5:** com ambas MRS59 e M1711B.

A estirpe *Lactobacillus paracasei* MRS59 também teve um desempenho superior aos demais fermentos na atividade inibitória de bactérias mesófilas heterotróficas totais (BMHT). Até o 12º dia de estocagem nos queijos não contaminados com *E. coli*, a contagem de BMHT permaneceu entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/g, enquanto nos queijos contaminados a contagem no 12º dia de estocagem ficou entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/g. Essa atividade inibitória teve uma queda no 15º dia, quando a contagem de BMTH do queijo 3 aumentou para  $10^8$  UFC/g. O queijo 2 apresentou contagem superior em 1 log em relação tanto aos queijos não contaminados quanto aos queijos contaminados com *E. coli*. As contagens máximas de BHMT atingiram  $10^{10}$  UFC/g.



**Figura 10: a;** Média de contagem em log UFC/g da multiplicação de bactérias heterotróficas mesófilas totais em queijo Minas fresco com culturas probióticas durante a estocagem à 8 °C. **b;** Média de contagem em log UFC/g da multiplicação de bactérias heterotróficas mesófilas totais em queijo Minas fresco contaminado com *E.coli* com culturas probióticas durante a estocagem à 8 °C. **Queijo 1:** com fermento comercial Christian Hansen®; **Queijo 2:** sem inóculo; **Queijo 3:** com *Lactobacillus paracasei* MRS59 **Queijo 4:** com *Lactococcus cremosis* M1711B; **Queijo 5:** com ambas MRS59 e M1711B.

A contagem final de *E. coli* no queijo intencionalmente contaminado com a mesma, permaneceu entre  $10^9$  e  $10^{10}$  UFC/g nos queijos 1, 4 e 5. O queijo 3, com a estirpe *Lactobacillus paracasei* MRS59 apresentou contagem final de *E. coli* de  $10^8$  UFC/g, 1 a 2 log menor do que nos outros queijos com fermentos lácticos. Já no queijo 2 a média da contagem de *E. coli* ultrapassou  $10^{10}$  UFC/g, com crescimento rápido do patógeno a partir do 12º dia de estocagem.



**Figura 11:** Média de contagem em log UFC/g da multiplicação de *Escherichia coli* em queijo Minas frescal com culturas probióticas durante a estocagem à 8 °C. **Queijo 1:** com fermento comercial Christian Hansen®; **Queijo 2:** sem inóculo; **Queijo 3:** com *Lactobacillus paracasei* MRS59 **Queijo 4:** com *Lactococcus cremosis* M1711B; **Queijo 5:** com ambas MRS59 e M1711B.

## 5.5 Testes de atividade antimicrobiana

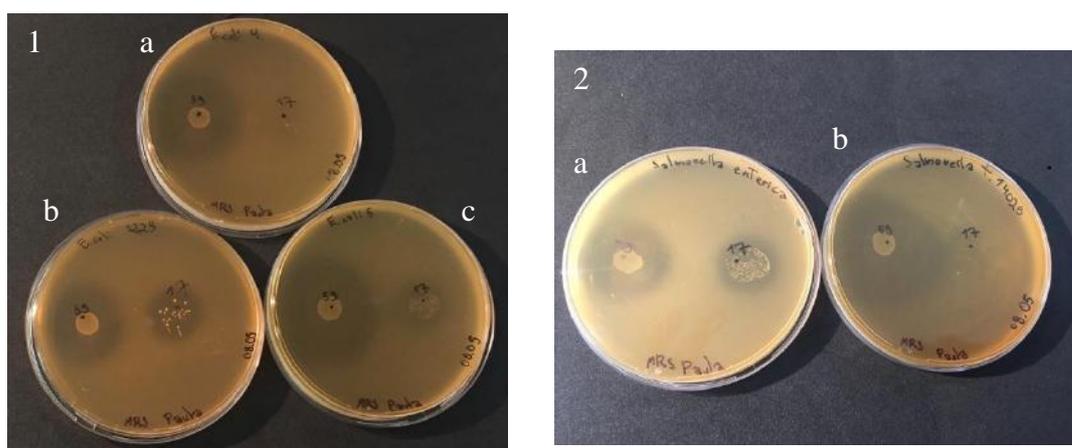
A estirpe isolada do Kefir *Lactobacillus paracasei* MRS59 apresentou atividade de inibição contra: *Escherichia coli* 1229, *Escherichia coli* 5121565 colistina resistente, *Escherichia coli* 1311 produtora de carbapenase, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pichia kluyveri* e *Saccharomyces cerevisiae*. A resistência a colistina pelo patógeno *Escherichia coli* se dá através da presença do gene *mcr-1* plasmidial, sendo de alta importância médica. Já a produção de carbapenase pelo patógeno *Escherichia coli* o torna resistente ao antibiótico carbapenema, sendo também de alta importância médica. Não foi detectada a inibição de fungos filamentosos no teste de *spot on agar*.

A estirpe isolada do Kefir *Lactococcus cremosis* M1711B apresentou atividade de inibição contra: *Escherichia coli* 1229, *Escherichia coli* 5121565 colistina resistente, *Escherichia coli* 1311 produtora de carbapenase, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Os testes com esta estirpe não foram realizados em duplicata.

**Tabela 14:** Atividade antimicrobiana de fermentos lácticos contra microrganismos indicadores, patogênicos e deterioradores de alimentos.

Microrganismos indicadores	<i>Lactobacillus paracasei</i> MRS59		<i>Lactococcus cremosis</i> M1711B
	Halo real (cm)	Desvio Padrão	Halo real (cm)
<i>Escherichia coli</i> 1229	2,45	0,65	1,8*
<i>Escherichia coli</i> 5121565	2,15	0,45	2,8*
<i>Escherichia coli</i> 1311	2,6	0,2	1,7*
<i>Salmonella enteretidis</i>	4,05	1,05	4,2*
<i>Salmonella typhimurium</i>	4,25	0,55	3,9*
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,25	0,05	2,9*
<i>Listeria innocua</i>	2,3*	-	1,5*
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,0*	-	-
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i>	0,7*	-	-
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-
<i>Aspergillus sp</i>	-	-	-

\*testes não realizados em duplicata



**Figura 12:** Inibição da estirpe *Lactobacillus paracasei* MRS59. 1a *Escherichia coli* 1311; 1b *Escherichia coli* 1229; 1c *Escherichia coli* 5121565; 2a *Salmonella enteritidis* 2b *Salmonella typhimurium*.

## 6. DISCUSSÃO

Diante da crescente busca de consumidores por novos produtos alimentícios que sejam mais saudáveis e não possuam conservantes, a indústria de alimentos vem aumentando o desenvolvimento de alimentos funcionais e a introdução de bioproteção nos produtos (Silva *et al.*, 2017). A indústria de alimentos lácteos tem papel fundamental nesta atual mudança, pois a matriz destes alimentos permite a introdução de microrganismos probióticos, garantindo um ambiente menos agressivo para os mesmos. Os probióticos vem ganhando destaque devido aos seus diversos benefícios e conhecida atividade como bioprotetores (Dantas *et al.*, 2016). Neste cenário, o desenvolvimento de um queijo Minas Frescal com característica probiótica se torna interessante.

Neste trabalho foi realizada a produção de queijo Minas frescal com diferentes fermentos lácteos. Os queijos armazenados a 8 °C e foram analisados microbiologicamente e quanto ao pH a cada 3 dias durante 21 dias.

Para o estudo, foi utilizado leite do tipo pasteurizado. O leite pasteurizado é vendido em poucos pontos de comércio e possui validade curta, de 7 dias. Essa curta validade se dá pelo processo de pasteurização não ser capaz de eliminar todos os microrganismos, podendo permanecer patógenos deteriorantes que se multiplicam no rico ambiente do leite. Essa característica não se repete no leite ultrapasteurizado, que é estéril, sem presença de microrganismos. Para a produção de queijo Minas frescal, o uso de leite ultrapasteurizado não é recomendado pois a grande variação de temperatura a qual o leite é submetido pode alterar as características da caseína do leite, dificultando a sua coagulação.

Os 6 lotes de leites utilizados para a produção dos queijos estavam de acordo com a legislação vigente estipulada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Portaria RDC N° 12 (ano de publicação), não sendo detectados *Salmonella spp* nem coliformes totais. Estes dados construíram com a literatura, onde diversos estudos apontam alta frequência de contaminação nos leites pasteurizados comercializados no Brasil. Araujo *et al.*, 2012 pesquisaram a presença de patógenos em leite pasteurizado do tipo A, B e C comercializados no mercado varejista de Natal, Rio Grande do Norte, e detectaram 6 de 7 amostras fora da legislação vigente em relação a quantificação de coliformes totais. Atualmente, no estado do Rio de Janeiro não é feita a classificação A, B e C do leite pasteurizado vendido pois todo leite pasteurizado comercializado deve se enquadrar na categoria A. O grupo Garrido *et al.*, 2001 analisaram 390 amostras de leite do tipo A, B e C em Ribeirão Preto, São Paulo. Como

resultado da análise microbiológica, foram detectados em desacordo com a legislação vigente: 32,5% do leite tipo C, 32,6% do tipo B e 31,0% do tipo A, apesar de nenhum apresentar o patógeno *Salmonella* sp.

Nos lotes de leite foi pesquisada também a presença de fungos e leveduras que só foram detectados em 4 dos 6 lotes. Os lotes onde os fungos não foram detectados foram os últimos a serem utilizados, o que pode ser resultado de uma implementação de boas práticas de fabricação, como melhor manipulação, transporte e armazenamento do leite pasteurizado utilizado.

Apesar de não estipulados pela legislação vigente, esse trabalho quantificou na análise microbiológica do leite, a presença de bactérias mesófilas heterotróficas totais. As contagens obtidas permaneceram entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/mL nos 6 lotes pesquisados. A pesquisa por bactérias mesófilas tem como objetivo verificar a contaminação geral de um alimento, é usada como indicador da qualidade higiênica e para fornecer uma perspectiva do tempo útil de conservação (Franco & Landgraf, 1996). Picoli *et al.*, (2006) analisaram diversos ingredientes utilizados na fabricação de queijo Minas frescal e detectaram a presença de bactérias mesófilas em 2 dos 3 lotes de leite pasteurizado pesquisados, com contagem entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/mL. Este mesmo grupo analisou também a contagem de mesófilas presente em leite cru, com contagem entre  $10^6$  e  $10^8$  UFC/mL, demonstrando assim, a importância da pasteurização do leite cru que, apesar de não eliminar todos os microrganismos presentes, pode diminuir sua contagem em até 5 log.

O leite pasteurizado possui como parte da microbiota natural bactérias ácido lácticas (BAL), sendo este o motivo da contagem de BAL na análise microbiológica do leite. Lima *et al.*, 2009, detectaram a presença de *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum* como microbiota de leite utilizadas para a fabricação de queijo Minas frescal. Estepar *et al.*, 1999, também detectaram como microbiota láctica do leite antes da produção de queijo Peñamellera, com predominância de microrganismos dos gêneros *Lactococcus* spp e *Leuconostoc* spp.

Os queijos produzidos nesse trabalho estavam de acordo com o estipulado pela legislação vigente, Portaria RDC N° 12 da ANVISA e pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) 1996.

Durante a produção dos queijos os resultados sugerem que a maior parte de BAL permaneceu na matriz do alimento, sendo uma pequena fração perdida no soro. A perda de BAL no soro, quando em grande quantidade, não é desejável pois prejudica o produto probiótico final. Neste estudo não foi avaliado se estas BAL eram microrganismos da microbiota do leite ou dos fermentos inoculados. Entretanto, as contagens de BAL nos queijos inoculados com fermentos lácticos foram proporcionalmente maiores do que as dos queijos não inoculados.

Como resultado do tipo de processamento, o rendimento do queijo Minas na indústria varia entre 22,2 e 16,7% (ILCT, 2003). Os cinco queijos com diferentes fermentos lácticos apresentaram rendimento semelhantes entre si, porém um pouco abaixo do encontrado na indústria, com média variando entre 16,6 e 15,5%. Esse valor um pouco abaixo da média da indústria pode ser explicado por ser um queijo realizado de forma artesanal e sem equipamentos de escala industriais, com os quais é possível uma maior otimização da produção. O uso dos diferentes fermentos lácticos não influenciou no rendimento dos queijos produzidos.

A acidificação durante o período de estocagem do queijo pelos fermentos é uma característica desejável pois ajuda a prevenir a contaminação por microrganismos deterioradores (Wolfschoon-Pombo & Lima, 1989). As estirpes isoladas do Kefir, *Lactobacillus paracasei* MRS59 e *Lactococcus cremoris* M1711B utilizadas como fermento láctico apresentaram baixa capacidade de acidificação, com pH mínimo de 5,9, enquanto a cultura comercial Christian Hansen® apresentou pH mínimo de 5,1. Esse aumento da acidez está relacionado com a fermentação de lactose em ácido láctico realizada pelas bactérias lácticas. A espécie *Lactobacillus paracasei* é heterofermentativa, produzindo principalmente ácido láctico, enquanto *Lactococcus cremoris* é homofermentativa, podendo produzir além de ácido láctico, diversos produtos, como etanol e ácido acético. Já foi descrito na espécie *Lactobacillus paracasei* a produção de duas enzimas isômeras de lactato, aumentando assim sua capacidade de fermentação (Vianna *et al.*, 2005).

Sangaletti *et al.*, (2007) e Buriti *et al.*, (2005) obtiveram redução de pH entre 6,16 e 5,38 durante 21 dias de estocagem do queijo Minas frescal, equivalente ao resultado do nosso estudo.

Cândido *et al.*, (2013) avaliaram a viabilidade probiótica de queijo Minas frescal com teor reduzido de lactose adicionado de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium sp.* e *Streptococcus thermophilus*. As análises microbiológicas e de pH também foram realizadas

durante 21 dias e os resultados foram semelhantes ao deste trabalho com pH permanecendo entre 6,6 e 5,2 com queda mais acentuada nos primeiros sete dias de estocagem. No estudo de Cândido *et al.*, (2013) foi analisado também o teor de acidez do queijo com culturas probióticas que foi diretamente proporcional a queda do pH.

Dantas *et al.*, 2016, por outro lado, obtiveram resultados diferentes do presente trabalho na produção de queijo Minas frescal probiótico com a incorporação do microrganismo *Lactobacillus casei* Zhang. Os queijos produzidos com a cultura probiótica apresentaram alta capacidade de acidificação, chegando ao pH mínimo de 5,2 e 4,9 ao final de 20 dias de estocagem. O citado grupo também comparou o pH de queijo Minas probiótico coagulado por ação enzimática apresentou pH mais ácido (4,9) que aquele coagulado por acidificação direta (5,2) após 20 dias de estocagem.

Embora tenham mostrado baixa capacidade de acidificação quando comparadas com o fermento comercial, os fermentos testados neste estudo, principalmente *Lactobacillus paracasei* MRS59 isolado do Kefir, mostram que a acidificação não é um fator determinante para a proteção do alimento. Neste caso, o uso destas como fermento seria desejável em alimentos em que a elevada acidez não seja uma característica sensorial desejável. A produção de alimentos com os fermentos utilizados neste estudo, levariam a um produto menos ácido e desta forma melhorando a condição de viabilidade de microrganismo probióticos, sem alterar sua segurança.

A atividade antifúngica de bactérias lácticas já foi demonstrada em diferentes estudos como revisado por Perczak, *et al.*, 2018. Esta atividade é atribuída a substâncias como ácidos orgânicos, ácido acético e ácido lático, peróxido de hidrogênio, reuterina, ácido caprótico, ácidos 3 fenil-acético, diacetil, dipeptídios cíclicos, dióxido de carbono e 3 hidroxipropilaldeído. Já foi demonstrado que *L. paracasei subsp. paracasei* produz como substâncias antifúngicas: ácido lático, ácido propionico, ácido acético, ácido succinico e ácido 3 hidroxifenil-lático. Apesar da não inibição de fungos filamentosos no teste de *spot on agar* das estirpes isoladas do Kefir utilizadas como fermento, no queijo 3 inoculado com *Lactobacillus paracasei* MRS59 houve uma contagem de até 2 log menor em relação aos outros queijos. No teste de antagonismo realizado contra leveduras, houve inibição das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia kluyveri* pela estirpe *Lactobacillus paracasei* MRS59. O nosso grupo tem interesse em continuar a investigação dessa estirpe quanto a inibição de leveduras.

Lacanin *et al.*, 2017, analisaram a propriedade antifúngica de *Lactobacillus paracasei*

e *Pediococcus spp* em produtos lácticos com resultado promissor de bioproteção contra os principais fungos contaminantes de alimentos lácticos. Os resultados do nosso trabalho também sugerem uma aplicação dessas estirpes na prevenção de contaminação de alimentos por bolores e leveduras. O gênero *Candida*, gênero *Kluyveromyces*, gênero *Penicillium*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica* e *Zygosaccharomyces bailii* são os fungos mais comuns associados à contaminação de produtos lácteos (Mayoral *et al.*, 2015).

A proteção de bactérias ácido lácticas contra diversos microrganismos pode estar associada à capacidade anti-oxidante e a compostos como: bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, diacetil, ácidos orgânicos comumente produzidos por bactérias lácticas como ácido láctico e ácido acético (Yang *et al.*, 2012). Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas antimicrobianas sintetizadas ribossomicamente produzidas por procariotos. Entre as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas, a nisina e suas variantes são as mais estudadas e de maiores aplicações. Entre outras bacteriocinas produzidas por BAL pode-se citar lacticina 3147, já demonstrada inibindo *Staphylococcus aureus* metaciclina resistente e *Clostridioides difficile* (Rea *et al.*, 2007) e pediocina PA-1 já foi demonstrada inibindo *Listeria monocytogenes* (Eijssink *et al.*, 1998). Como revisado por Weerapong *et al.*, 2016, a espécie *Lactobacillus paracasei* já foi descrita produzindo bacteriocinas, porém não classificadas. Dentro da classe dos *Lactococcus* já foi descrita a produção de bacteriocinas de classe I como nisina A e bacteriocinas da classe IIc como enterocina AS-48.

Dentre os produtos lácteos, o queijo possui vantagens na implementação de probióticos pois apresenta pH menos ácido quando comparado com o iogurte e ao leite fermentados, ter maior vida de prateleira, menos oxigênio livre, maior disponibilidade de nutrientes e por possuir alto teor de gordura, oferecendo proteção aos microrganismos probióticos na passagem pelo trato gastrointestinal, (Gardiner *et al.*, 1999). Sharp, McMahon, & Broadbent, 2008, comprovaram essa melhor viabilidade do queijo em comparação com iogurte expondo ambos os produtos contendo microrganismos probióticos a um ambiente de pH 2 condizente com o ambiente gástrico. Os autores concluíram que o queijo manteve uma melhor performance, apresentando  $10^4$  UFC/g de células viáveis ao final da exposição a pH 2 por 120 minutos enquanto no iogurte a contagem final foi de  $10^1$  UFC/g.

O queijo Minas frescal, por ser um queijo fresco, apresenta ainda as vantagens de possuir alta atividade de água, pH acima de 5 e não possuir conservantes (Buriti *et al.*, 2005).

Desta forma, a incorporação de bactérias isoladas do Kefir com características probióticas no queijo Minas frescal se torna ideal como desenvolvimento de um novo produto.

Como revisado por da Cruz *et al.*, 2009, na incorporação de microrganismos probióticos em alimentos, diversos fatores devem ser levados em consideração. O fator mais importante é manter a viabilidade do microrganismo probiótico durante o processo de produção. No caso da incorporação em queijos, o processo de maturação pode ser uma barreira visto que diversos fatores físico-químicos do queijo são alterados como pH e atividade de água, podendo criar um ambiente hostil para a sobrevivência dos probióticos. Desta forma, os queijos frescos como o queijo Minas frescal, que não passam por processo de maturação, são candidatos ideais para a incorporação de microrganismos probióticos.

Assim como em outros estudos de desenvolvimento de queijo Minas frescal probiótico, entre eles Cândido *et al.*, (2013), Buriti *et al.*, 2004 e Ribeiro *et al.*, (2009), a média final de bactérias ácido lácticas neste trabalho alcançou contagem superior a  $10^6$  UFC/mL podendo ser assim considerado um alimento probiótico de acordo com a ANVISA, 2008.

A produção de queijo probióticos já foi descrita em diversos trabalhos com diversos microrganismos probióticos em uma variedade de tipos de queijos. Speranza *et al.*, 2017, realizaram a produção de um cream cheese funcional com características probióticas e prebióticas. Para isso o grupo citado utilizou os microrganismos *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus reuteri* e inulina, frutooligossacarídeos e lactulose como prebióticos. A adição de prebióticos em produtos alimentícios se torna interessante visto que a sua presença aumenta a sobrevivência dos probióticos no trato gastrointestinal, aumentando assim os benefícios que os probióticos promovem (Yoo & Kim, 2016). Em trabalhos futuros, a adição de prebióticos juntamente com os probióticos em queijo Minas frescal pode ser de interesse comercial.

A Comissão Internacional de Especificação Microbiológica para Alimentos (1997) estipula que a qualidade microbiológica do queijo Minas frescal é influenciada pelas condições higiênico sanitárias em que o leite foi obtido, pelo processamento industrial, pelas condições de limpeza do ambiente de produção e pelo armazenamento e transporte, tanto da matéria-prima, quanto do produto.

Sangaletti *et al.*, (2007) estudaram a vida útil de um queijo Minas frescal durante 30 dias realizando análises semelhantes ao nosso trabalho no dia 1, 10, 20 e 30. No 20 dia, a média da contagem de bactérias lácticas chegou a  $10^7$  UFC/mL enquanto a de bactérias mesófilas chegou a  $10^8$  UFC/mL. A média da contagem de bactérias lácticas no estudo de Sangaletti *et al.*, condiz com o resultado encontrado no queijo 2, sem inóculo láctico, realizado no presente trabalho. Já os outros queijos, 1, 3, 4 e 5 apresentaram uma contagem superior de bactérias lácticas, alcançando  $10^9$  e  $10^{10}$  UFC/mL. Isso pode ser explicado pela adição de fermento lácteos ser opcional na produção de queijo Minas frescal e pelos queijos do presente trabalho terem sido adicionados de  $10^6$  UFC/mL de inóculo láctico.

Papadooulou *et al.*, desenvolveram queijo feta probiótico utilizando *Lactobacillus plantarum* como fermento láctico e avaliaram o queijo durante a estocagem a 4 e a 12 °C. No trabalho do grupo citado, também houve diminuição da população de fungos e leveduras em 2 log a medida que a população de bactérias ácido lácticas crescia como no presente trabalho.

Em estudo realizado por Saad *et al.*, 2001, foi realizada a quantificação de *Escherichia coli* em queijo Minas frescal adicionado e não adicionado de cultura lácticas comercial. Nos queijos produzidos não adicionados de cultura láctica, a quantificação de *E. coli* foi superior ao queijo adicionado de cultura láctica em 2 log. Em nosso estudo foi obtido resultado similar, com média de contagem final de *E.coli* de até  $10^{11}$  UFC/g no queijo sem inóculo láctico, enquanto no queijo com inóculo láctico a média de contagem final permaneceu entre  $10^8$  e  $10^{10}$  UFC/g.

A estirpe isolada do Kefir *Lactobacillus paracasei* MRS59 apresentou comportamento inibitório do patógeno *Escherichia coli* superior aos demais fermentos lácticos utilizados em 1 log. Esse resultado é condizente com estudos anteriores de Leite, 2012, onde a estirpe foi capaz de inibir *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Lactococcus lactis* IL1403 em teste de spot on ágar.

Neste presente trabalho foi possível observar a inibição da estirpe no ambiente do queijo Minas frescal em relação com estudos anteriores in vitro. Nos testes de spot on ágar também houve forte inibição de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* pela estirpe *Lactobacillus paracasei* MRS59. Não é comum a atividade contra microrganismos Gram negativos e esta geralmente é associada a compostos inespecíficos como ácidos orgânicos, embora a atividade de algumas bacteriocinas já tenham sido descritas como a pediocina

ALTA® 2351 (Santiago-Silva *et al.*, 2009).

Houve também, pela mesma estirpe, inibição de 3 espécies de *Escherichia coli*, a 1229 utilizada para contaminar intencionalmente os queijos produzidos, a *Escherichia coli* 5121565, *Escherichia coli* 1311, ambas de alta importância médica visto que são colistina resistente e produtoras de carpabenemas, respectivamente. A inibição de *Staphylococcus aureus* pela estirpe é desejável visto que *S. aureus* é um contaminante comum em alimentos lácteos. A inibição de *Listeria innocua* ocorreu, porém não foi possível realizar a duplicata. Os resultados do grupo em relação a inibição a *Listeria* spp são divergentes. Leite, 2012, apresentou inibição de *Listeria monocytogenes* pela estirpe *Lactobacillus paracasei* MRS59, por outro lado, Rosa dos Santos Junior, 2018, testou 8 estirpes isoladas do Kefir e não obteve resultado de inibição contra *L. monocytogenes*.

A estirpe *Lactococcus cremosis* M1711B também apresentou inibição contra as três *Escherichia coli* testadas assim como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*. Esta estirpe obteve maior inibição contra *Escherichia coli* 5121565, *S. aureus* e *Salmonella enteritidis*.

Além da capacidade inibitória de bactérias lácticas de microrganismos de importância alimentar, já foi apresentada a capacidade de diversos *Lactobacillus*, entre eles *L. paracasei*, de inibir bactérias do trato urinário. No estudo realizado por Shim *et al.*, 2013, as estirpes de *Lactobacillus* testadas foram capazes de inibir *Enterococcus fecalis*, *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*. Desta forma, a aplicação de bactérias ácido lácticas como bioprotetoras possui aplicação em diversos âmbitos, tanto de alimentos quanto na área da saúde.

Em relação aos resultados avaliados, ficou evidente a contribuição das culturas lácticas nas características tecnológicas do queijo produzido. Apesar de opcional, o uso das mesmas apresenta uma melhora na segurança do produto. O queijo produzido sem fermento láctico apresentou média de contagem de microrganismos contaminantes superior aos demais queijos com fermento láctico: a média de contagem de fungos foi superior em até 3 log, a média de contagem de bactérias mesófilas superior em até 2 log e média de contagem de *Escherichia coli* superior em até 3 log.

Queijos suplementados de microrganismos probióticos podem ser uma boa estratégia para a indústria de laticínios, que visa diversificar seus produtos e aumentar sua competição no mercado. As 2 estirpes isoladas do Kefir, *Lactobacillus paracasei* MRS59 e *Lactococcus*

*cremosis* M1711B, utilizadas neste trabalho, apresentaram efeito antagônico na microbiota do queijo equivalente ou, em alguns parâmetros, melhor ao observado na cultura comercial. Com isso, pode-se afirmar que as culturas isoladas do Kefir apresentam potencial de interesse comercial, visto que, além de promover segurança ao queijo, também possui características probióticas, trazendo assim benefícios ao consumidor.

## 7. CONCLUSÕES

- Os queijos produzidos com estirpes isoladas do Kefir *Lactobacillus paracasei* MRS59 e *Lactococcus cremoris ssp cremoris* M1711B apresentaram características probióticas ao final de 21 dias de estocagem a 8 °C.
- As estirpes utilizadas produziram queijos com rendimento e vida de prateleira igual à cultura comercial.
- A capacidade de acidificação não foi diretamente relacionada à proteção dos alimentos.
- Os resultados deste trabalho apontam que as estirpes utilizadas podem ser aplicadas como fermentos lácticos onde não seja desejável a alta acidificação.
- Os fermentos isolados do Kefir apresentaram atividade antifúngica, além da atividade antibacteriana esperada.
- Os fermentos apresentaram atividade antagônica contra bactérias com perfil de resistência a antimicrobianos de perfil hospitalar.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12. De 02 de janeiro de 2001.
- Alamprese C, Foschino R, Rossi M, Pompei C, and Corti S. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. *Int. J. Dairy Technol.* 2005; 58: 200–206.
- Allerberger, F., Wagner, M., 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 16
- Amagase H. Current marketplace for probiotics: A Japanese perspective. *Clinic Infection Dis* 2008;46:S73-5.
- Ammor M; Sand Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Sci.* 2007; 76: 138–146.
- Araújo C.G.F.; Rangel, A.H.N.; Medeiros, H.R.; Mendes, C.G.; Abrantes, M.R.; Sousa, E.S.; Silva, J.B.A. Avaliação Qualitativa do Leite Pasteurizado Tipo A, B e C comercializado em Natal, RN (2012) *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.79, n.2, p.283-286
- Arora, M., and Baldi, A. (2015). Regulatory categories of probiotics across the globe: a review representing existing and recommended categorization. *Ind. J. Med. Microbiol.* 33, 2–10.
- Assadi, M. M., Pourahmad, R., and Moazami, N. (2000). Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 541–543.
- Association of official analytical chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1141. 14th ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists, 1984.
- Bourrie BCT; Willing BP and CotterPD (2016) The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Front. Microbiol.* 7:647.
- Bergamini CV, Hynes ER, and Zalazar CA. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *Int. Dairy J.* 2006; 16: 856–866.
- Boylston TD, Vinderola CG, Ghoddusi HB, and Reinheimer JA. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int. Dairy J.* 2004; 14: 375–387.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos.
- BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria no 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 359, de 23 de dezembro de 2003.
- Buriti, F. C. A.; Rocha, J. S.; Saad, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, v. 15, n. 12, p. 1279-1288, Dez. 2005.
- Collins YF, McSweeney PLH, Wilkinson MG. 2004. Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese, p 373–

390. In Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP (ed), Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, 3rd ed, vol 1. General Aspects. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

Câmara, S. A. V.; Amaral, G. B.; Muller, M. T.; Silveira, K. C. S.; Almeida, T. N de; Medeiro, C. F (2002) Avaliação microbiológica de queijo Minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 32- 36.

Casal, E., Montilla, A., Moreno, F.J., Olano, A., Corzo, N., 2006. Use of chitosan for Selective removal of - lactoglobulin from whey. *J. Dairy Sci.* 89 (5), 1384–1389.

CDC, 2013. Vital signs: Listeria illnesses, deaths, and outbreaks--United States, 2009-2011., *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*.

Cerbulis, J. and Farrell, H. M., Jr. 1975. Composition of milks of dairy cattle. I. Protein, lactose, and fat contents and distribution of protein fraction. *J. Dairy Sci.* 58, 817- 827

Cheirsilp B, Shimizu H, Shioya S (2003) Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol* 100:43-53.

Choi, K.-H., Lee, H., Lee, S., Kim, S. e Yoon, Y. (2016). Cheese microbial risk assessments, a review. *Asian - Australasian J. Anim. Sci.* 29, 307–314.

Crittenden, R.; Incorporating Probiotics into Foods in Handbook of probiotics and prebiotics / Yuan Kun Lee, Seppo Salminen. – 2nd edition.

da Cruz, A.G., Al Buriti, F.C., de Souza, C.H.B., Faria, J.A.F., and Saad, S.M.I. (2009) Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends Food Sci Technol* 20, 344-354 <sup>[1]</sup> <sub>[sep]</sub>

Dantas, A.B., Jesus, V.F., Silva, R., Almada, C.N., Esmerino, E.A., Cappato, L.P., Silva, M.C., Raices, R.S.L., Cavalcanti, R.N., Carvalho, C.C., Sant’Ana, A.S., Bolini, H.M.A., Freitas, M.Q. and Cruz, A.G. (2016) Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. *J Dairy Sc* 99, 18-30

De Kruif CG, Holt C. 2003. Casein micelle structure, functions and interactions, p 233–276. In Fox PF, McSweeney PLH (ed), *Advanced Dairy Chemistry*, 3rd ed, vol 1. Proteins, Part A. Kluwer Academic

Delavenne, Emilie; Ismail, Rached; Pawtowski, Audrey; Mounier, Jerome; Barbier, Georges Le Blay, Gwenaelle. (2012) Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures.

De Wit, J.N., 2001. *Lecturer’s Handbook on Whey and Whey Products*, first ed. European Whey Products Association, Brussels: Belgium.

Doleyres Y and Lacroix C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *Int. Dairy J.* 2005; 15: 973–988.

Donkor ON and Shah NP. Production of b-Glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *J. Food Sci.* 2008; 73

Erickson, Marilyn C., Doyle, Michael P. (2016) The Challenges of Eliminating or Substituting Antimicrobial Preservatives in Foods in *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2017. 8:17.1–17.20

Estepar, J.; Sanchez, M.M.; Alonso, L. *et a.*, Biochemical and microbiological characterization of artisanal ‘Peñamellera’ cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, v.9, p.737-743, 1999.

Eijsink, V.G., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., and Nes, I.F. (1998) Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64, 3275– 3281.

FAO/WHO (2008a). Food and Agricultural Organization/World Health Organization. Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables: Meeting Report. In: *Microbiological Risk Assessment Series*, Rome: Pre-publication version, 25p.

- Farnworth ER, Mainville I (2008) Kefir - A Fermented Milk Product. In: Farnworth, E. R. (2th ed.), Handbook of Fermented Functional Foods (2 ed). CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, p. 89-127.
- Fernandes, A. M., Andreatta, E., & Oliveira, C. A. F. de. (2006). Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. *Revista Higiene Alimentar*, 20(144), 54-56.
- Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening in *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk* (2th) 1997 Blackie Academic & Professional, London, UK
- Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo, Atheneu, 181 p. 1996.
- Freire, C. B. F. Efeito da adição de *Bifidobacterium bb-12* e/ou do emprego da acidificação direta sobre as propriedades de queijo Minas Frescal. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- Garrido, N.S. Moraes, J.M.T.; Brigati, R.C.; Oliveira, M.A.; Bergamini, A.M.M; Oliveira S.A.V.; Favaro, R.M.D.; Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60(2):141-146, 2001
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni G (2010) Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In F. Mozzi, R. R. Raya & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Novel Applications* pp. 327-340. Iowa: Blackwell Publishing.
- Gemechu T. (2015) Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *Afr J Food Science* ;9(4):170–5.
- Geurts TJ, Walstra P, Mulder H. 1974. Water binding to milk protein, with particular reference to cheese. *Neth Milk Dairy J* 28:46–72.
- Giambiagi-deMarval, M., Mafra, M.A., Penido, E.G.C. e Bastos, M.C.F. (1990). Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1591-1599.
- Giroto, G. M.; Pawlowsky, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. *Brasil Alimentos*, n. 10, set./ out., 2001
- Gobbetti, M., Cagno, R. D., and De Angelis, M. (2010). Functional microorganisms for functional food quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 716–727.
- Gösta Bylund, M.Sc. (1995) *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB S-221 86 Lund, Sweden
- Guimarães, Pedro. M. R; Teixeira, José A.; Domingues, Lucília (2010) Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances* 28, 375–384
- Hampe, Christiane S.; Roth Christiane S. (2017) Probiotic strains and mechanistic insights for the treatment of type 2 diabetes
- Herody C, Soueux Y, Beeh Hanson E, Gillies K (2010) Legal status of microbial food cultures in the European union: An overview. *Eur Food Feed Law Review*.
- Harboe M, P. Budtz P. 1999. The production, action and application of rennet and coagulants, p 33–65. In Law BA (ed), *Technology of Cheesemaking*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Instituto de Laticínios Cândido Tostes - ILCT. *Fabricação de Queijos*. Juiz de Fora, MG, 2003.
- Internaciona Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1997. *APPCC na Qualidade e Segurança Microbiológica de Alimentos*. Varela, São Paulo. 377 p

Isepon, J. S., and A. J. Oliveira. 1995. Influencia do emprego de culturas lácticas nas características do queijo tipo Minas frescal. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 15:1–5.

Jones, M. L., Martoni, C. J., Parent, M., and Prakash, S. (2012). Cholesterol- lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *Br. J. Nutr.* 107

Johnson MA, Law BA. 1999. The origins, development and basic operations of cheesemaking technology, p 1–32. In Law BA (ed), *Technology of Cheesemaking*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Karimi, R., Mortazavian, A. M., and Gomes Da Cruz, A. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Sci. Technol.* 91

Keenan TW, Mather IH. 2006. Intracellular origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane, p 137–172. In Fox PF, McSweeney PLH (ed), *Advanced Dairy Chemistry*, 3rd ed, vol 2. Lipids. Springer Science Business Media

Kirjavainen PV, Salminen S, and Isolauri E. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2003.

Komatsu, Raquel Satomi *et al.*, Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijo minas frescal produzidos em Uberlândia-MG (2010) *BiosCience*. Uberlândia, v.26, n, 2.

Koroleva, N.S., Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts, in *Therapeutic Properties of Fermented Milks*, Robinson, R.K. Ed., Elsevier Applied Science, London, 1991, pp. 159–179.

Ines Lačanin, Jérôme Mounier, Audrey Pawtowski, Marta Dušková, Josef Kameník, Renáta Karpíšková Assessment of the antifungal activity of *Lactobacillus* and *Pediococcus* spp. for use as bioprotective cultures in dairy products (2017) *World J Microbiol Biotechnol* 33:188

Leite, A.M.O. (2012). Análise da diversidade microbiana de grãos de kefir, caracterização da bebida fermentada e potencial das estirpes isoladas Tese [Doutorado em Ciências (Alimentos)] – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Leite A.M.O, Mayo B, Rachid CTCC, Peixoto RS, Silva JT, Paschoalin VMF, Delgado S (2012) Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiol* 31:215-221

Leite A.M.O, Miguel MAL, Peixoto RS, Rosado SA, Silva JT, Paschoalin VMF (2012) Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology* 44

Leite A.M.O, M. A. L. Miguel, R. S. Peixoto, P. Ruas-Madiedo, V. M. F. Paschoalin, B. Mayo and S. Delgado (2015) Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains, *American Dairy Science Association*.

Lima, Ana Clara Melo; Chaul Tobas, Luisa; Pereira, Aline; Correia da Silva, Geovanna B. H; (2015) Pesquisa de *Listeria Monocytogenes* em queijo muçarela fatiado comercializado em estabelecimentos varejistas de Goiana, GO, *Electronic Journal of Pharmacy* vol XII, n 4, p 87-92.

Lima, C.D.L.C.; Lima, L.A.; Cerqueira, M.M.O.P.; Ferreira, E.G.; Rosa, C.A.; Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais (2009) *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.1, p.266-272

Lima, Fabiana Regina; Rocha, Larissa de Oliveira (2017) Aproveitamento do soro de leite proveniente da produção do queijo do Serro para fabricação do doce de leite: viabilidade econômica. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 83-93

Linossier, J.P., and Dousset, X., Stimulation de la croissance et du métabolisme de *Lactobacillus kefir* par *Candida*

kefir, *Microbiol. Aliments Nutr.*, 12, 341–351, 1994.

Linskens, R. K., Huijtedens, X. W., Savelkoul, P. H., *et al.*, (2001). The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 234, 29–40.

Loguercio, A.P.; Aleixo, J.A.G. Microbiologia de queijo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.6, p.1063-1067, 2001.

Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J (2006) Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol* 23:67-74.

Lucklow T, Sheehan V, Delahunty C, Fitzgerald G. Determining the odor and flavour characteristics of probiotic, health promoting ingredients and the effects of repeated exposure on consumer acceptance. *J. Food Sci.* 2005; 70: S53–S59.

MacGibbon AKH, Taylor MW. 2006. Composition and structure of bovine milk lipids, p 1–42. In Fox PF, McSweeney PLH (ed), *Advanced Dairy Chemistry*, 3rd ed, vol 2. Lipids. Springer Science+Business Media, Inc., New York, NY.

McIntyre, L., Wilcott, L., Naus, M., 2015. Listeriosis outbreaks in British Columbia, Canada, caused by soft ripened cheese contaminated from environmental sources. *Biomed Res. Int.* 2015, 131623.

Magalhães KT, Pereira GVM, Campos CR, Dragone G, Schwan RF (2011) Brazilian Kefir: Structure, Microbial Communities and Chemical Composition. *Braz J Microbiol* 42:693-702.

Magnusson, J. and Schnurer, J. (2001) *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1<sup>^</sup>5.

Margulis, L., From ke r to death, in *How Things Are*, Brockman, J., and Matson, K., Eds., William Morrow and Co., New York, 1995, pp. 69–78.

Markowiak, Paulina; Slizewska, Katarzyna (2017) Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients review*, Poland.

Mattila-Sandholm T, Mylläarinen P, Crittenden R, Morgensen G, Fond en R, and Saarela R. Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* 2002; 12: 173–182.

Mayoral, M. B., Martín, R., Sanz, A., Hernández, P. E., González, I., & García, T. (2005). Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. *International Journal of Food Microbiology*, 105

Mieszkin, Sophie; Hymery, Nolwenn; Debaets, Stella; Coton, Emmanuel; Le Blay, Gwenaëlle; Valence, Florence; Mounier, Jérôme (2016) Action mechanisms involved in the bioprotective effect of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1.Np against *Yarrowia lipolytica* in fermented milk *International Journal of Food Microbiology*, FOOD 7526

Mills, S., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R. (2011). New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annual Review of Food Science and Tech- nology*, 2, 299e329.

Morr, C. V.; Foegeding, E. A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. *Food Technology*, v. 44, p. 100-112, 1990.

Moshfegh, A.J., Holden, J.M., Cogswell, M.E., Kuklina, E.V., Patel, S.M., Gunn, J.P., Gillespie, C., Hong, Y., Merritt, R. e Galuska, D.A. (2012). Vital signs: food categories contributing the most to sodium consumption – United Sates, 2007-2008. *Morb. Mortal Wkly. Rep.* 61, 92-98.

Mozaffarian, D., Cao, H., King, I.B., Lemaitre, R.N., Song, X., Siscovick, D.S. e Hotamisligil, G.S. (2010). Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults: A cohort study. *Ann. Intern. Med.*

153, 790-799.

Neves-Souza, R.D.; Silva, R.S.S.F. (2005) Estudo de custo-rendimento do processamento de queijos tipo minas frescal com derivado de soja e diferentes agentes coagulantes. *Cien. Tecnol. Aliment.* V. 25(1).

Nitschke, M; Rodrigues, V; Schinatto, L. F Formulação de meios de cultivo a base de soro de leite para produção de goma xantana por *X.campestris* C7L. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v.21 numero 1, p82-85, 2001

Noble P. & Jenness,R; *Fundamentals of Dairy Chemistry* 1988 3th Edition, Springer US

Oliveira, J. S. Queijo: fundamentos tecnológicos. *Ciência e Tecnologia*. 2. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1986.

Öner Z, Karahan AG, Çakmakçi MLE (2010) Effects of different milk types and starter cultures on kefir. *Gida* 35:177-182.

Otles S. and Cagindi Oe. (2003) Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pak J Nutr.*;2(2):54–9.

Oxaran, V.; Hwa S.; Lee, I.; Chaul, L. T; Corassin, T. H.; Barancelli, G. V.; Alves, F.; Oliveira, C.A.F; *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products, *Food Microbiology* (2017)

Pereira, M.L.; Gastelois M.C.A.; Bastos, E.M.A.F.; Caiaffa W.T.; Faleiro E.S.C. Avaliação de ensaios analíticos para detecção de coliformes fecais em queijo Minas Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.51 n.5 Belo Horizonte out. 1999

Picoli, S. U. *et al.*, Quanti cação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesó los presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 1, n. 26, p. 64-69, jan./mar. 2006.

Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V and Soccol CR (2015) Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front. Microbiol.*

Prazeres Ana R.; Carvalho, Fátima; Rivas, Javier; Patanita, Manuel; Dôres, José Reuse of pretreated cheese whey wastewater for industrial tomato production (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (2014) *Agricultural Water Management* 140 87–95 Elsevier

Ratray FP, O'Connell MJ (2011) Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2th ed). Academic Press , San Diego, USA, p.518-524.

Rea, M.C., Clayton, E., O'Connor, P.M., Shanahan, F., Kiely, B., Ross, R.P., and Hill, C. (2007) Antimicrobial activity of lacti- cin 3,147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol* 56, 940–946.

Rocha, J.S.; BURITI, F.C.A. and SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. 2006

Rosa DD, Dias MM, Grześkowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL. Maria do Carmo GP. (2017) Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev.*;30(1):82–96.

Rosa dos Santos Junior, E. (2018) Estabilidade físico-química e microbiológica de Micropartículas de Kefir obtidas por spray drying e análise sensorial de bebida reconstituída. Tese [Mestrado em Ciências (Alimentos)] – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Saad, Susana M. I.; Vanzin, César; Oliveira, Maricê, N.; Franco, Bernadette, D. G. M.; Influence of Lactic Acid Bacteria on Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Inoculated Minas Cheese during Storage at 8.5 C (2001) *Journal of Food Protection*, Vol. 64, No. 8, 2001, Pages 1151–1155

Sangaletti, N. (2007) Estudo da vida útil do queijo Minas Frescal disponível no mercado. 2007. 81 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Santiago-Silva, P., Soares, N. F. F., Nóbrega, J. E., Júnior, M. A. W., Barbosa, K. B., Volp, A. C. P., Würlitzer, N. J. (2009). Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, 20, 85–89.

Saxelin, M; Lassig, A.; Karjalainen, H.; Tynkkynen, S.; Surakka, A.; Vapaatalo, H.; Järvenpää, S.; Korpela, R.; Mutanen, M. & Harakka, K. (2010) Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 293-300.

Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as bio- preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 70e78.

Silva, M.P.; Cavalli; D.R. and Oliveira, T.C.R.M.. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*

Sharp, M. D., McMahon, D. J., & Broadbent, J. R. (2008). Comparative evaluation of yogurt and low-fat Cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Science*, 73(7), M375eM377.

Silva, H.L.A., Balthazar, C.F., Esmerino, E.A., Vieira, A.H., Cappato, L.P., Neto, R.P.C., S., Verruck, Cavalcanti, R.N., Portela, J.B., Andrade, M.M., Moraes, J., Franco, R.M., Tavares, M.I.B., Prudencio, E.S., Freitas, M.Q., Nascimento, J.S., Silva, M.C., Raices R.S.L. and Cruz, A.G. (2017) Effect of sodium reduction and flavor enhancer addition on probiotic Prato cheese processing. *Food Res Int* 99, 247-255

Siro, I., Kápolna, E., Kápolna, B., and Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance: a review. *Appetite* 51, 456–467

Sharifi, Mohammadreza; Moridnia, Abbas; Mortazavi1, Deniz; Salehi, Mahsa; Bagheri, Marzieh ; Sheikhi, Abdolkarim (2017) Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties.

Speranza, B., Campaniello, D., Monacis, N., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Functional cream cheese supplemented with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 and prebiotics, *Food Microbiology* (2017)

Siso, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 1-11, 1996.

Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB. (2001) Market potential for probiotics. *Am J Clin Nutr*; 73: 476-83S.

Swaisgood H. 2003. Chemistry of the caseins, p 139–202. In Fox PF, McSweeney PLH (ed), *Advanced Dairy Chemistry*, 3rd ed, vol 1. Proteins, Part A. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.

Szajewska H, Setty M, Mrukowica J. (2006) Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. *J Pediatrics Gastrointest Nutr.*;42:454–475.

Tamime AY (2006) Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime, AY (ed.), *Fermented Milk* Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, p.174-216.

Tesser, Ionara Casali; Fariña, Luciana Oliveira; Schrepp, Talita; Mendonça, Saraspathy Naidoo Terroso Gama (2010) Elaboração de Pão de Queijo Adicionado de Soro de Queijo em pó. *Rev. Inst. Latic.* “Cândido Tostes”, Jan/Fev, nº 372, 65: 3-8, 2010

Yadav H, Jain S and Sinha PR (2007). Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutr*, 23: 62-68

Yang, En; Fan, Lihua; Jiang, Yueming; Doucette, Craig and Fillmore, Sherry (2012) Antimicrobial activity of

bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express* 2012, 2:48  
<http://www.amb-express.com/content/2/1/48>

Yoo, Youn Ji; Kim, Soo Sung. Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders; *Nutrients* 2016, 8, 173

Vallim, D. C.; Hofer, C. B.; Lisbôa, R. C.; Barbosa, A. V.; Rusak, L. A. Falavina dos Reis C. M.; and Hofer, E. Twenty Years of *Listeria* in Brazil: Occurrence of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* Serovars in Food Samples in Brazil between 1990 and 2012. (2015) Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2015, Article ID 540204, 8 pages

Viljoen, B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 37–44.

Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ. 2006. *Dairy Science and Technology*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

WHO, World Health Organization estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.

Wolfschoon-Pombo, A. L.; Lima, A. Extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 44, n. 261-266, p. 50-52, 1989.

Zacarchenco, P. B.; Spadoti, L. M.; Trento, F.K.H.S.; Gallinda, D.A & Silva e Alves, A. T. (2011) Influência dos métodos de fabricação de queijo Minas Frescal sobre sua segurança alimentar. *Rev. Ind. Lat.* 91, 111-118.

Zoegui, A. *et al.*, 2014. *Mini Rev Med Chem.* 14(1):84-98 7, 999-1007