

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Cecília Loyola Afonso dos Santos

**Caracterização de segurança e tecnológica de bactérias
acidoláticas termofílicas autóctones e aplicação em queijo
Parmesão**

**São José do Rio Preto - SP
2015**

Cecília Loyola Afonso dos Santos

**Caracterização de segurança e tecnológica de bactérias
acidoláticas termofílicas autóctones e aplicação em queijo
Parmesão**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto - SP
2015

Santos, Cecília Loyola Afonso dos.

Caracterização de segurança e tecnológica de bactérias acidoláticas termofílicas autóctones e aplicação em queijo parmesão / Cecília Loyola Afonso dos Santos. -- São José do Rio Preto, 2015
84 f. : il., tabs.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Alimentos - Microbiologia.
3. Bactérias gram-positivas - Aplicações industriais. 4. Segurança alimentar. 5. Queijo parmesão. I. Penna, Ana Lúcia Barretto.
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 664:576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Cecília Loyola Afonso dos Santos

**Caracterização de segurança e tecnológica de bactérias
acidoláticas termofílicas autóctones e aplicação em queijo
Parmesão**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna
UNESP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi
UFU - Uberlândia

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto - SP
2015

Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância.

(John F. Kennedy)

Dedico este trabalho...

À minha família.

Os meus mais sinceros agradecimentos...

A Deus, por estar sempre me guiando e abrindo novos caminhos.

Aos meus pais, Reginaldo e Ana Carolina, por mais uma vez estarem ao meu lado, sempre torcendo e participando de cada momento de minha trajetória. Vocês são meus exemplos de persistência, perseverança, força e batalha. Obrigada por tudo!

Ao meu irmão, Cícero, meus avós, Derly e Ignácio, e a todos os familiares e amigos que estiveram sempre na torcida e nas orações para que tudo ocorresse bem.

Ao meu namorado, Lucas, e toda sua família, pelo apoio e compreensão.

À minha orientadora, Ana Lúcia Barretto Penna, pela paciência e parceria.

Às minhas companheiras de laboratório Luana, Sabrina, Vivian, Aline, Bruna, Liane, Taís, Daniele, Carolina, por compartilhar não apenas o conhecimento de cada uma, mas também momentos de alegrias e descontração.

Ao Laticínio Promileite Indústria e Comércio de Leite, por ceder as instalações e mão de obra para a produção do queijo Parmesão.

Às minhas amigas Anelisa, Natália, Liara, Tatiane, pela parceria.

Aos professores, pela contribuição para minha formação.

Aos funcionários Ginaldo, Luís e Natália, além de todos os outros, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), por me proporcionar as melhores oportunidades da minha vida.

À CAPES e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

As culturas selvagens ou autóctones isoladas de diversos alimentos podem produzir enzimas, vitaminas e compostos aromatizantes, ou ainda, compostos que apresentem efeitos fisiológicos em humanos. Estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que algumas cepas autóctones isoladas de muçarela de búfala são produtoras de bacteriocinas, e outras apresentam características probióticas. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar as características de segurança e tecnológicas de treze cepas autóctones de bactérias acidoláticas (BAL) termófilas de *Lactobacillus helveticus* (SJRP56 e SJRP191), *S. thermophilus* (SJRP02, SJRP03, SJRP107 e SJRP109) e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (SJRP49, SJRP50, SJRP51, SJRP57, SJRP76, SJRP149, SJRP181). Para a caracterização de segurança das culturas foram verificadas a susceptibilidade a antibióticos, a atividade hemolítica e das enzimas β -glucosidase, *N*-acetil- β -glucosaminidase e β -glucuronidase, e a presença de genes que caracterizam fatores de virulência, produção de aminas biogênicas e resistência a antibióticos. As propriedades tecnológicas: cinética de acidificação, produção de exopolissacarídeos e atividade enzimática, foram avaliadas para todas as cepas. Para as cepas consideradas seguras também foram realizadas as análises da hidrólise da caseína e a atividade de aminopeptidases. A partir da caracterização de segurança e tecnológica foram selecionadas quatro cepas: *Lb. helveticus* SJRP56 e SJRP191, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57 e *S. thermophilus* SJRP107 para aplicação na produção de queijo Parmesão. Os queijos foram produzidos em escala industrial em dois processamentos independentes, utilizando-se leite pasteurizado e padronizado com 2,3% de gordura. Foi determinada a composição centesimal dos queijos após a

produção, e durante o período de maturação foram avaliadas as características físico-químicas (acidez, pH e proteólise). No terceiro mês de maturação, a qualidade microbiológica dos queijos foi avaliada. Durante os seis meses de maturação, os queijos produzidos com as culturas autóctones apresentaram redução do teor de umidade (27,01% no final da maturação) e aumento dos índices de proteólise e acidez, indicando a hidrólise da caseína e produção de ácidos orgânicos. Além disso, os queijos atenderam aos padrões físico-químicos e microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira. Os resultados demonstraram o potencial de aplicação das cepas selvagens para a produção de queijo Parmesão, não apenas representando um aumento da diversidade de BAL para uso comercial, mas também ampliando as possibilidades de aplicação dessas culturas em outros produtos lácteos.

Palavras-chave: Bactérias acidoláticas; Cultura autóctone; Segurança; Propriedades tecnológicas; Parmesão.

ABSTRACT

*Autochthonous lactic acid bacteria (LAB) isolated from various food can produce enzymes, vitamins, and flavor compounds, or compounds that exhibit physiological effects. Recently, studies performed by our research group showed that some autochthonous strains isolated from water buffalo mozzarella cheese are capable of producing bacteriocin as well as some strains presented probiotic properties. In this context, the aim of this study was to evaluate the safety and technological characteristics of autochthonous thermophilic lactic acid bacteria (LAB) strains of *Lactobacillus helveticus* (SJRP56 and SJRP191), *S. thermophilus* (SJRP02, SJRP03, SJRP107 and SJRP109) and *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (SJRP49, SJRP50, SJRP51, SJRP57, SJRP76, SJRP149 and SJRP181). For the safety characterization of the cultures, the antibiotic resistance, the hemolytic, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase and β -glucuronidase activities, and the investigation of the presence of genes that characterize virulence factors, production of biogenic amines and antibiotic resistance were carried out. The technological properties: acidification kinetics, exopolysaccharide production and enzymatic activity were evaluated for all strains. For the safe strains the analyses of the casein hydrolysis and aminopeptidase activity were also performed. From the safety and technological characterization, four strains were selected: *Lb. helveticus* SJRP56 and SJRP191, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57 and *S. thermophilus* SJRP107, and used in the production of Parmesan cheese. The cheese were produced in industrial scale in two independent processing using 2.3% fat pasteurized standardized milk. After cheese production, the chemical composition was determined, and during the ripening period, the physicochemical characteristics were evaluated (acidity, pH value and proteolysis). At the third month of*

ripening, the microbiological quality of cheese was carried out. During the six months of ripening, the Parmesan cheese produced with autochthonous cultures presented decrease in moisture content (27.01% at the end of ripening period) and increase in proteolysis indices and acidity, indicating the hydrolysis of casein and production of organic acids. Furthermore, the cheese was in accordance to the physicochemical and microbiological standards established by Brazilian law. The results demonstrated the potential application of wild strains for cheese production, not only representing an increase of the diversity of BAL for commercial use, but also expanding the application possibilities of these strains in other dairy products.

Keywords: Lactic acid bacteria; Autochthonous culture; Safety; Technological properties; Parmesan.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
1. Enzimas detectadas pelo kit API-ZYM.	38
2. <i>Primers</i> , temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos relacionados com genes de virulência, genes de resistência à vancomicina e produção de aminas biogênicas.	40
3. Substratos utilizados para a verificação da atividade de aminopeptidases.	42
4. Medida (mm) do halo de inibição formado pela ação do antibiótico sobre BAL termófilas (<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>).	53
5. Atividade enzimática de BAL termófilas (<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>).	58
6. Atividade de aminopeptidases de BAL termófilas (<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>).	60
7. Parâmetros da cinética de acidificação de cepas de BAL termófilas (<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>).	64
8. Produção EPS de cepas de bactérias acidoláticas termófilas.	67
9. Composição centesimal do queijo Parmesão (1 dia de maturação).	68
10. Características físico-químicas do queijo Parmesão ao longo da maturação.	70

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Sistema proteolítico de bactérias acidoláticas.	25
2. Proteólise e catabolismo de aminoácidos durante a maturação de queijos.	26
3. Etapas para a produção de compostos aromáticos a partir de ácidos graxos, durante a maturação de queijos.	27
4. Esquema para tomada de decisão para seleção de novas cepas de BAL para aplicação em alimentos.	31
5. Formação de aminas biogênicas.	32
6. Estruturas químicas de algumas aminas biogênicas	33
7. Fluxograma do processamento do queijo Parmesão.	46
8. Etapa de adição dos ingredientes para a fabricação de queijo Parmesão.	47
9. Etapa de corte com a agitação e aquecimento direto, durante o processamento de queijo Parmesão.	47
10. Etapa de enformagem da massa, durante o processamento de queijo Parmesão.	47
11. Etapa de maturação do queijo Parmesão.	48
12. Perfil de acidificação de cepas autóctones e comercial de <i>S. thermophilus</i> .	61
13. Perfil de acidificação de cepas autóctones de <i>Lb. helveticus</i> .	62
14. Perfil de acidificação de cepas autóctones de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .	63
15. Perfil de hidrólise da caseína por ação das culturas lácticas.	65

- 16.** Gel de eletroforese obtido a partir das amostras de queijo durante o período de maturação. **72**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. Bactérias acidoláticas (BAL)	20
3.1.1. <i>Lactobacillus helveticus</i>	21
3.1.2. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	22
3.1.3. <i>Streptococcus thermophilus</i>	23
3.2. Enzimas de bactérias acidoláticas importantes na fabricação de queijos.....	24
3.2.1. Proteases e peptidases	24
3.2.2. Lipases e esterases	267
3.3. Produção de exopolissacarídeos (EPS) por bactérias acidoláticas	288
3.4. Segurança de bactérias acidoláticas.....	299
3.5. Queijo Parmesão	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Obtenção das culturas termófilas de BAL	36
4.2. Avaliação de segurança das cepas	36
4.2.1. Susceptibilidade a antibióticos	36
4.2.2. Verificação da atividade das enzimas β -glucosidase, N-acetil- β - glucosaminidase e β -glucuronidase	37
4.2.3. Extração do DNA com Kit “Easy DNA” TM.....	38
4.2.4. Verificação da presença de genes relacionados a fatores de virulência, produção de aminas biogênicas e resistência a antibióticos.....	39
4.2.5. Verificação da atividade hemolítica	41

4.3. Propriedades tecnológicas.....	41
4.3.1. Atividade enzimática	41
4.3.2. Cinética de acidificação	42
4.3.3. Perfil de hidrólise da caseína	43
4.3.4. Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	43
4.4. Seleção das culturas para aplicação em queijos	44
4.5. Produção do queijo Parmesão	44
4.5.1. Preparo da cultura lática	44
4.5.2. Processamento do queijo Parmesão	45
4.6. Caracterização do queijo Parmesão	48
4.6.1. Determinação do rendimento	48
4.6.2. Composição e caracterização dos queijos	48
4.6.3. Caracterização do perfil eletroforético da caseína em gel de poliacrilamida (Urea – PAGE)	49
4.6.4. Caracterização microbiológica.....	50
4.7. Delineamento experimental e análise estatística dos resultados	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. Avaliação de segurança das cepas	51
5.1.1. Susceptibilidade a antibióticos	51
5.1.2. Verificação da atividade das enzimas <i>β-glucosidase</i> , <i>N-acetil- β-</i> <i>glucosaminidase</i> e <i>β-glucuronidase</i>	54
5.1.3. Verificação da presença de genes relacionados a fatores de virulência, produção de aminas biogênicas e resistência a antibióticos.....	55
5.1.4. Atividade hemolítica	56
5.2. Propriedades tecnológicas.....	56
5.2.1. Atividade enzimática	56
5.2.2. Cinética de acidificação	60

5.2.3. Perfil de hidrólise proteica	65
5.2.4. Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	65
5.3. Produção queijo Parmesão	67
5.3.1. Determinação do rendimento	67
5.3.2. Caracterização físico-química do queijo Parmesão	68
5.3.2.1. Composição centesimal	68
5.3.2.2. Acompanhamento das características físico-químicas durante o período de maturação	68
5.3.3. Análise do perfil de hidrólise proteica no queijo	71
5.3.4. Avaliação microbiológica.....	72
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

A pasteurização do leite é um processo necessário para assegurar a qualidade dos produtos lácteos e, principalmente, para garantir a segurança do consumidor pela destruição de bactérias patogênicas e enzimas que podem catalisar reações que alteram as características do leite.

Por outro lado, certos queijos fabricados com leite *in-natura* possuem características de sabor e aroma particulares quando comparados aos processados a partir de leite pasteurizado, uma vez que, quando submetido ao tratamento térmico, o leite perde a microbiota natural, sendo necessária a adição de culturas lácticas para realizar a fermentação.

Para a elaboração dos produtos fermentados, as empresas de laticínios geralmente adquirem culturas de bactérias acidoláticas (BAL) importadas, que nem sempre apresentam desempenho adequado, principalmente em função das diferenças na qualidade da matéria prima (leite cru).

As culturas selvagens ou autóctones são aquelas presentes em alimentos *in-natura*, nos equipamentos de processo ou no ambiente, e apresentam características interessantes, uma vez que sobrevivem às condições adversas do ambiente e predominam nesse ecossistema. Para que sobrevivam ao ambiente que habitam, necessitam resistir à competição com outros micro-organismos, geralmente pela produção de substâncias antimicrobianas, tais como os ácidos orgânicos, etanol, CO₂, H₂O₂, ou bacteriocinas.

Diversos estudos relatam ainda a produção de enzimas, compostos aromatizantes, vitaminas e diversos efeitos benéficos por culturas autóctones isoladas de diversos alimentos. Silva (2010) isolou e identificou culturas autóctones de amostras colhidas durante o processo de fabricação de muçarela de búfala. Estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que algumas cepas são produtoras de bacteriocinas, e outras apresentam características probióticas (JERONYMO-CENEVIVA, 2013; DE PAULA et al., 2014).

Neste contexto, o estudo das características de segurança e tecnológicas das culturas autóctones termofílicas isoladas previamente é muito importante, pois pode

identificar culturas com características específicas, com potencial para aplicação industrial e ampliar a diversidade de BAL utilizáveis na fabricação de queijos duros.

Este conhecimento permite a proposição de aplicações inovadoras na área de produtos lácteos fermentados, contribuindo, conseqüentemente, com o desenvolvimento científico e tecnológico da indústria nacional de produtos lácteos.

2. OBJETIVOS

- Avaliar as características de segurança e tecnológicas de cepas autóctones de *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*;
- Selecionar as cepas seguras e que apresentarem simultaneamente as melhores características tecnológicas, e aplicar em queijo Parmesão;
- Avaliar a qualidade microbiológica e as características físico-químicas desenvolvidas no queijo Parmesão elaborado com cultura autóctone durante o período de maturação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Bactérias acidoláticas (BAL)

As bactérias acidoláticas recebem esta denominação devido à sua capacidade de converter carboidratos fermentáveis em, principalmente, ácido láctico. São caracterizadas como micro-organismos Gram-positivos, não esporulantes, catalase-negativos, desprovidos de citocromo, anaeróbios facultativos e ácidos tolerantes. De acordo com a temperatura ótima de desenvolvimento, essas bactérias podem ser classificadas em mesofílicas (20-30 °C) ou termofílicas (35-45 °C) (REIS et al., 2011; GIRAFFA, 2012; ZHANG et al., 2013).

As bactérias dos gêneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* são consideradas pertencentes ao grupo das BAL (CROWLEY, MAHONY, SINDEREN, 2013).

As BAL são largamente utilizadas em diversas aplicações industriais, principalmente como culturas iniciadoras em alimentos fermentados, tais como: leites fermentados, queijos, manteiga, produtos cárneos fermentados, como salame e vegetais fermentados. Devido à sua capacidade de hidrolisar proteínas, açúcares e lipídeos, possuem grande influência sobre o perfil sensorial do produto final, resultando em melhora da textura e do aroma (PESCUMA et al., 2008).

Há décadas as BAL também são utilizadas na conservação de alimentos, e possuem o “status” “GRAS” (*Generally Recognized as Safe* – usualmente reconhecidas como seguras). Elas desempenham um reconhecido papel na conservação e na segurança microbiológica de alimentos fermentados, promovendo, assim, a estabilidade microbiana do produto final. Os efeitos protetivos são promovidos pela produção de ácidos orgânicos, CO₂, etanol, peróxido de hidrogênio, diacetil e componentes antimicrobianos, tais como os ácidos graxos e as bacteriocinas (GIRAFFA, 2012).

Diversos autores indicam a importância de produtos fermentados e de culturas de BAL para homens e animais, devido às diversas atividades fisiológicas

proporcionadas à saúde (RAMCHANDRAN, SHAH, 2008; CHOI et al., 2012; MRVCIC et al., 2012). No entanto, ultimamente, muitas cepas de BAL têm sido relacionadas com o aparecimento de enfermidades em humanos, fazendo-se necessária a verificação da segurança das cepas selecionadas para aplicação em alimentos, a fim de garantir que somente benefícios sejam proporcionados pelas BAL à saúde do consumidor.

Estudos científicos demonstraram que cepas autóctones de BAL isoladas de diferentes produtos, possuem potencial para produzir não só ácidos orgânicos, mas também diferentes compostos que contribuem para a qualidade sensorial do produto fermentado. Sendo assim, a caracterização de cepas autóctones de BAL é de grande importância para a seleção e aplicação industrial (AYAD et al., 2004).

3.1.1. *Lactobacillus helveticus*

Lactobacillus helveticus possui grande importância comercial, sendo predominantemente empregado como uma cultura iniciadora na fermentação do leite para a fabricação de diversos tipos de queijos duros, tais como: Gruyere, Emental, Parmesão e Pecorino, e na produção de bebidas lácteas fermentadas (GATTI et al., 2004; TAVERNITI, GUGLIELMETTI, 2012). É caracterizado como uma cultura láctica homofermentativa, pertencente ao grupo das BAL termófilas. Possui crescimento ótimo em temperaturas entre 42 a 45 °C e pH de 5,5 a 5,8. É uma espécie considerada fastidiosa, uma vez que tem necessidades nutricionais complexas de aminoácidos, peptídeos, bases nucleicas, vitaminas, minerais, ácidos graxos e carboidratos (HEBERT, RAYA, GIORI, 2000; SLATTERY et al., 2010).

Uma vez que a disponibilidade de aminoácidos essenciais no leite é limitada, a sobrevivência do *Lb. helveticus* depende de seu complexo sistema proteolítico. Assim como o da maioria das BAL, este sistema consiste em proteases, que inicialmente hidrolisam a caseína em grandes peptídeos, peptidases (intracelulares), que degradam esses peptídeos em peptídeos menores ou aminoácidos, e transportadores específicos de proteínas que transportam aminoácidos e peptídeos através da membrana citoplasmática. A proteólise não só possui função vital para os *Lb. helveticus*, mas também contribui para a textura, desenvolvimento do aroma e

pode estar relacionada à redução do amargor em queijos (HEBERT, RAYA, GIORI, 2000; KENNY et al., 2003; BROADBENT et al., 2011).

Lb. helveticus também possuem grande importância para a saúde do homem, uma vez que proporcionam diversos benefícios, sendo considerada uma bactéria probiótica por alguns autores (SLATTERY et al., 2010; TAVERNITI, GUGLIELMETTI, 2012). Os peptídeos formados durante a maturação dos queijos a partir da hidrólise das proteínas pelo *Lb. helveticus* podem apresentar propriedades bioativas, tais como anti-hipertensiva, imunomodulatória, anticarcinogênica e fixadora de cálcio (GRIFFITHS; TELLEZ, 2013).

Nos queijos italianos do tipo grana, assim como no provolone, a espécie de *Lb. helveticus* prevalece sobre as demais culturas iniciadoras presentes no soro fermento utilizado para a fabricação (GATTI, CONTARINI, NEVIANI, 1999). Em queijo duros, como por exemplo o Parmesão, esta espécie possui um papel fundamental durante a maturação, uma vez que possui alto poder proteolítico e peptidolítico e considerável capacidade lipolítica, fazendo com que ocorra o desenvolvimento de sabor, aroma e textura característicos deste tipo de produto (FURTADO, 2011b).

3.1.2. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* é um bacilo homofermentativo, que tem como temperatura ideal de crescimento 45 °C. É frequentemente utilizado em produtos lácteos fermentados, sendo importante, não só para a produção de ácido láctico, como também na hidrólise proteica, a qual dá origem a diversos compostos, como substâncias aromáticas e peptídeos, que podem desempenhar atividade biológica (FURTADO, 2011a; LIU et al., 2012; ZHENG et al., 2013).

Muitas cepas desta espécie apresentam potencial probiótico, assim como a cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57, isolada de muçarela de búfala (SILVA, 2010), que demonstrou capacidade de auto-agregação, co-agregação, hidrofobicidade e presença de genes de adesão à mucosa intestinal, em estudo realizado por Jeronymo-Ceneviva (2013).

Em geral, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentam a capacidade de se adaptar a diferentes meios, tolerar frio, calor e condições ácidas (LIU et al., 2012). Além disso, esta espécie é muitas vezes relacionada com a redução do gosto amargo em produtos lácteos e com a produção de *flavour* característico de leite fermentado, fazendo desta bactéria uma importante cultura iniciadora utilizada na indústria láctea (HOU et al., 2015).

3.1.3. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus é considerada a segunda cultura iniciadora de maior importância industrial, depois de *Lactococcus lactis*. É tradicionalmente usada na produção de iogurte e de queijos suíços, franceses e italianos (UMAMAHESWARI et al., 2014).

É um micro-organismo não-esporulado, homofermentador, anaeróbio facultativo e resistente à temperatura de pasteurização. A faixa ideal de temperatura para seu crescimento é de 37 a 43 °C e praticamente não se desenvolve abaixo de 18 °C. Apresenta alta velocidade de produção de ácido láctico na fabricação de queijos, sob condições ideais de temperatura e, se associado ao *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, essa velocidade de acidificação pode ser ainda maior, visto que estes micro-organismos possuem uma relação de proto-cooperação. Contudo, apesar de *S. thermophilus* produzir ácido rapidamente, não o produz em grande quantidade, uma vez que é gradualmente inibido quando o teor de ácido láctico atinge aproximadamente 1,2% (120 °D) (FURTADO, 2011a).

Além de estar relacionado com a produção de ácido láctico na fermentação do leite, *S. thermophilus* possui outros importantes aspectos tecnológicos, tais como: metaboliza a galactose, apresenta sistema proteolítico e atividade ureática, além de atributos funcionais, tais como a produção de exopolissacarídeos, bacteriocinas, biosurfactantes e vitaminas. Além disso, a partir do catabolismo de aminoácidos, produz diversos componentes aromáticos, tais como: acetaldeído e compostos derivados de leucina, fenilalanina e metionina (IYER et al., 2010; UMAMAHESWARI et al., 2014).

Em queijo Parmesão, *S. thermophilus* deve ser acrescentado em baixa proporção, uma vez que é forte produtor de ácido. A alta acidez, durante o processamento, ocasiona perdas de cálcio no soro, o que promove o aparecimento de trincas no queijo durante a maturação. Além disso, para manter a baixa produção de ácido durante a fabricação do Parmesão, também são utilizadas temperaturas superiores às ideais para o desenvolvimento das bactérias termofílicas, o que inibe sua multiplicação e consequente produção de ácido láctico (FURTADO, 2011b).

3.2. Enzimas de bactérias acidoláticas importantes na fabricação de queijos

No final do processamento dos queijos, as culturas iniciadoras geralmente estão presentes em quantidades superiores a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de queijo e, durante a maturação, as BAL dominam a microbiota presente (STEELE; BROADBENT; KOK, 2013). Estes micro-organismos, apesar de possuírem como função principal a produção de ácido láctico durante o processo fermentativo, também contribuem para a maturação de queijos, uma vez que suas enzimas são envolvidas nos processos de proteólise, lipólise e conversão de aminoácidos em compostos aromáticos (SLATTERY et al., 2010).

O desenvolvimento de *flavour* em queijos é um processo bioquímico dinâmico influenciado por: (i) tipo e composição do leite; (ii) condições de processamento; (iii) micro-organismos e enzimas presentes na matriz do queijo. A microbiota do queijo é a primeira fonte de enzimas que influencia o desenvolvimento do aroma (STEELE; BROADBENT; KOK, 2013).

3.2.1. Proteases e peptidases

As BAL necessitam de aminoácidos essenciais para seu desenvolvimento e, graças ao seu sistema proteolítico (Figura 1), conseguem obtê-los a partir da conversão de peptídeos em aminoácidos livres. Essa conversão e subsequente utilização destes aminoácidos formam a atividade metabólica central das BAL. A metabolização de caseínas (Figura 2) se inicia pela ação da “*cell-envelop-*

proteinase” (CEP), que hidrolisa a caseína em mais de 100 pequenos fragmentos de peptídeos, que por sua vez, são transportados para dentro da célula pela ação de múltiplos sistemas de transporte de oligopeptídeos (Opp). Uma vez dentro das células, os derivados de caseína são degradados pelas peptidases (RAMCHANDRAN; SHAH, 2008). Dentre as diversas peptidases produzidas por BAL, algumas, tais como: Pep N, Pep M, Pep A, Pep X, Pep I, Pep P, Pep O, Pep C, Pep L, endopeptidase e carboxipeptidase, possuem um papel importante no desenvolvimento de aromas e na redução do amargor em queijos (KILCAWLEY; WILKINSON; FOX, 2002).

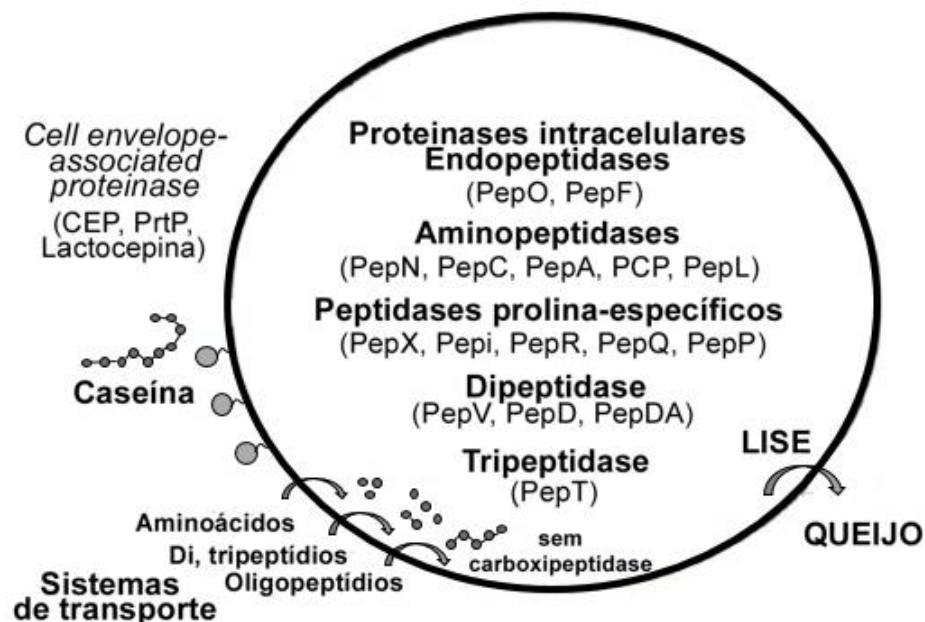


Figura 1: Sistema proteolítico de bactérias acidoláticas. FONTE: Adaptado de McSWEENEY (2004).

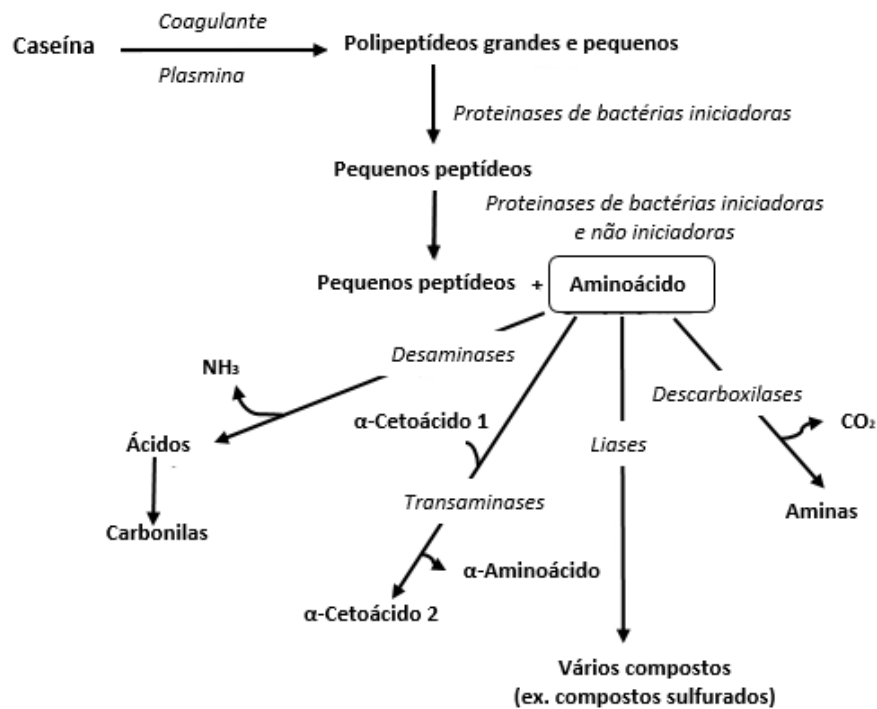


Figura 2: Proteólise e catabolismo de aminoácidos durante a maturação de queijos.
 FONTE: Adaptado de McSWEENEY (2004).

A atividade proteolítica não influencia apenas as características de odor, aroma e textura de produtos que contêm as BAL, mas também proporcionam a formação de peptídeos, que estão sendo, cada vez mais, associados às propriedades benéficas à saúde, denominados peptídeos bioativos (RAMCHANDRAN; SHAH, 2008; CHOI et al., 2012). Estes peptídeos, dependendo da estrutura, apresentam propriedades imunomodulatória, anti-hipertensiva, opióide, anti-carcinogênica, antidiarreica, antialérgica, antioxidante, antitrombótica, além de possuir capacidade de fixação de minerais (CHOI et al., 2012; GRIFFITHS; TELLEZ, 2013).

3.2.2. Lipases e esterases

A quebra da gordura do leite pelas lipases e esterases (Figura 3) é um dos principais eventos bioquímicos que ocorrem durante a maturação de muitas variedades de queijos, contribuindo significativamente para o desenvolvimento do

flavour, direta ou indiretamente. Em queijos, essa quebra da gordura se dá pela presença de agentes lipolíticos, que por sua vez, podem ser originados do leite, do agente coagulante utilizado, ou da microbiota presente (culturas iniciadoras – *starters*, e/ou não iniciadoras - *non starter lactic acid bacteria* – NSLAB, ou ainda de micro-organismos adjuntos) (McSWEENEY, 2004; SLATTERY et al., 2010).

Embora sendo consideradas como fracas produtoras de enzimas lipolíticas quando comparadas a outros micro-organismos, as BAL, quando em elevado número no queijo, produzem esterases e lipases intracelulares, responsáveis pela liberação de quantidade significativa de ácidos graxos durante o período de maturação (McSWEENEY, 2004).

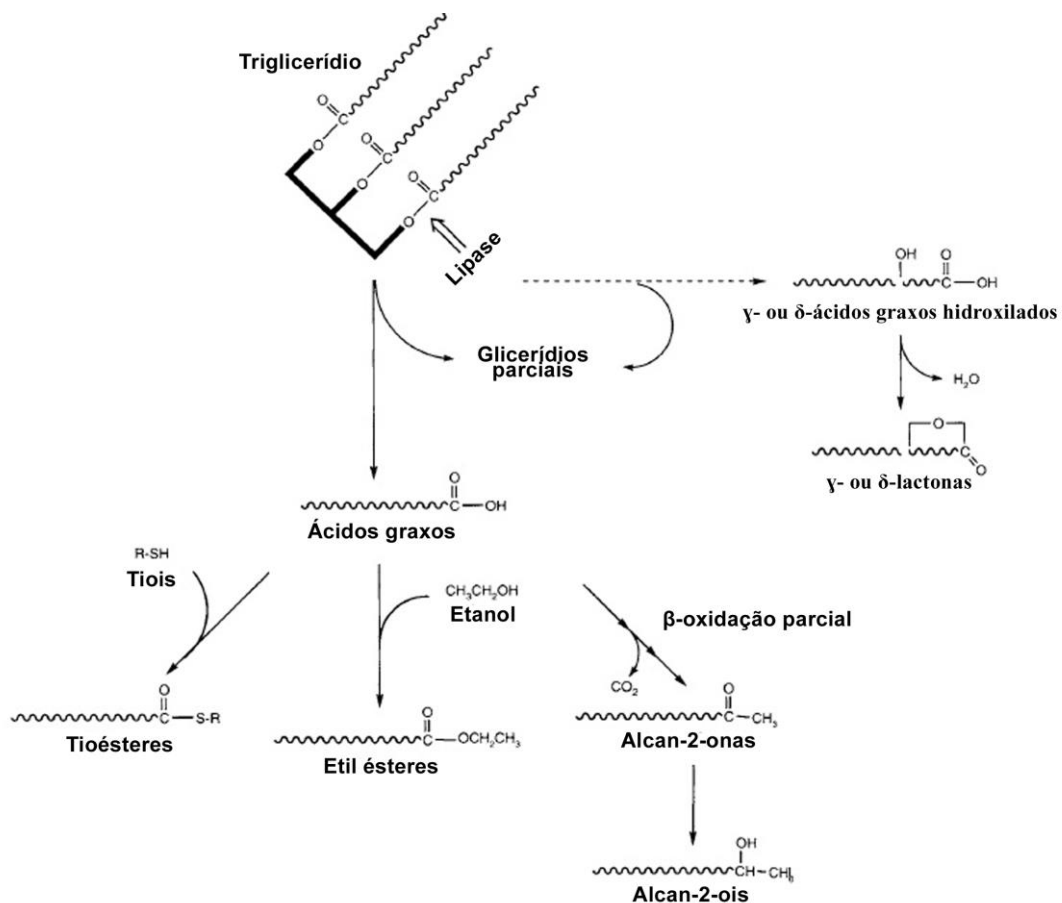


Figura 3: Etapas para a produção de compostos aromáticos a partir de ácidos graxos, durante a maturação de queijos. FONTE: Adaptado de McSWEENEY (2004).

3.3. Produção de exopolissacarídeos (EPS) por bactérias acidoláticas

A habilidade para produzir polissacarídeos é largamente difundida entre as BAL. Os micro-organismos conseguem sintetizar polissacarídeos, que possuem função estrutural ou de armazenamento. Contudo, algumas bactérias conseguem secretar polissacarídeos em sua superfície, os quais não possuem função fisiológica definida. Estes polímeros exocelulares compreendem os polissacáridos capsulares, que formam uma camada coesiva ou uma cápsula ligada covalentemente à superfície da célula, e os exopolissacarídeos (EPS), os quais formam uma camada limosa fracamente ligada à superfície da célula, ou são liberados para o ambiente (RUAS-MADIEDO, REYES-GAVILÁN, 2005).

O interesse por EPS produzidos por BAL vem aumentando devido à capacidade que estes biopolímeros possuem de melhorar as propriedades físicas de produtos fermentados, possuindo, assim, importância tecnológica para aplicações industriais. Estudos demonstram que EPS de BAL contribuem para a textura, paladar, percepção do sabor, além de auxiliar na estabilidade de produtos fermentados durante a estocagem, reduzindo a sinérese. Além disso, tem sido relatado que EPS de BAL podem possuir propriedades benéficas à saúde, tais como: atividade antitumoral e imunomodulatória, redução do colesterol ou prevenção ao aparecimento de úlceras (GROSU-TUDOR et al., 2013; JOSHI; KOIJAM, 2014).

Na produção de iogurte, a escolha das culturas bacterianas para a fermentação do leite é um fator importante para o controle das propriedades de textura. Folkenberg e colaboradores (2006) ao analisarem produtos fabricados com *S. thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produtores e não produtores de EPS, observaram que ao fim da fermentação por uma cepa produtora de EPS, pode-se obter um iogurte com alta viscosidade, elevada cremosidade e baixa firmeza do gel, que são características desejáveis neste tipo de produto. Esses atributos citados fizeram parte de um painel sensorial utilizado para descrever propriedades de textura em iogurtes (FOLKENBERG et al., 2006).

No entanto, às vezes, BAL produtoras de EPS são responsáveis pelo desenvolvimento de viscosidade indesejada em produtos alimentícios, como vinhos, cidras e cervejas (GROSU-TUDOR et al., 2013; JOSHI; KOIJAM, 2014).

3.4. Segurança de bactérias acidoláticas

Apesar das BAL serem consideradas seguras e benéficas ao homem, a preocupação em relação aos seus aspectos de segurança vem aumentando, uma vez que algumas cepas de diferentes gêneros apresentaram fatores de virulência, resistência a antibióticos ou foram associadas ao desenvolvimento de doenças (ADIMPONG et al., 2012; GIRAFFA, 2012).

Em *Enterococcus* spp., por exemplo, vários fatores de virulência, tais como, agregação de substâncias proteicas, produção das enzimas gelatinase, citolisina e hialuronidase e fatores de colonização de antígenos, foram encontrados e descritos na literatura (VANKERCKHOVEN et al., 2004; MARTIN-PLATERO et al., 2009). Uma vez que algumas cepas desta espécie apresentaram essas características de patogenicidade, além de já terem sido associadas a casos clínicos de endocardite, bacteremia, infecções pélvicas, intra-abdominais, no trato urinário e do sistema nervoso central, o uso de enterococos em alimentos, principalmente como probióticos, ainda é considerado uma questão controversa (FOULQUIE-MORENO et al., 2006).

Nos lactobacilos, diversas propriedades intrínsecas associadas às suas atividades metabólicas podem ter efeito nocivo à saúde humana, uma vez que descarboxilam a tirosina, degradam o ácido hialurônico, possuem atividades de desconjugação de sais biliares, agregação plaquetária, e enzimática, tais como: azoredutase, nitroredutase, β -glucuronidase, além de produção de metabólitos tóxicos (BERNARDEAU et al., 2008).

Sendo assim, para garantir a segurança de uma cepa a ser aplicada em alimentos, faz-se necessário o estudo de alguns fatores, tais como: especificações de origem, ausência de atividade de enzimas nocivas, susceptibilidade a antibióticos, ausência de genes que caracterizem fatores de virulência e produção de aminas biogênicas, dentre outros.

A preocupação com relação à resistência de BAL a antibióticos existe devido ao risco desses micro-organismos transferirem os genes resistentes para outras bactérias, incluindo as patógenas que, conseqüentemente, não poderão ser tratadas com os antibióticos que eram anteriormente eficazes (ADIMPONG et al., 2012;

ZHANG et al., 2013). São dois os tipos de resistência bacteriana a antibióticos: intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca ou natural está presente em todas as cepas de um determinado gênero ou espécie. Ela define os limites da ação de um antibiótico; é cromossômica e não transferível para outras bactérias. Por outro lado, a resistência adquirida pode ocorrer devido a dois mecanismos distintos: mutação ou aquisição de um gene resistente de outra bactéria por transferência lateral. No primeiro caso, a resistência é não transferível, e no segundo, o gene adquirido pode ser re-transferido a outra bactéria, tornando-a resistente (COURVALIN, 2006).

As BAL são potenciais fontes de genes que caracterizam a resistência a antibióticos. O gênero *Lactobacillus* apresenta grande resistência natural à bacitracina, cefoxitina, ciprofloxacina, ácido fusídico, canamicina, gentamicina, metronidazol, estreptomicina, sulfadiazina, ácido nalidixico e vancomicina. A resistência de muitas espécies de lactobacilos a glicopeptídeos é geralmente considerada intrínseca, exceto para *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*, e *Lb. crispatus* (BERNARDEAU et al., 2008; SHARMA et al., 2014).

Em estudo realizado por Drago e colaboradores (2013), 17 de 26 cepas probióticas analisadas apresentaram genes de resistência ao aminoglicosídeo gentamicina. No entanto, a maioria das cepas pertencia ao gênero dos *Lactobacillus* que apresenta resistência intrínseca a essa classe de antibióticos (DRAGO et al., 2013).

Para a seleção de novas cepas de BAL a serem usadas como culturas iniciadoras ou probióticas em produtos lácteos, a verificação de susceptibilidade a antibióticos tornou-se importante e necessária para garantir a saúde do consumidor (BERNARDEAU et al., 2008). Para uma bactéria a ser aplicada em alimentos, esta avaliação de segurança segue o esquema simplificado apresentado na Figura 4.

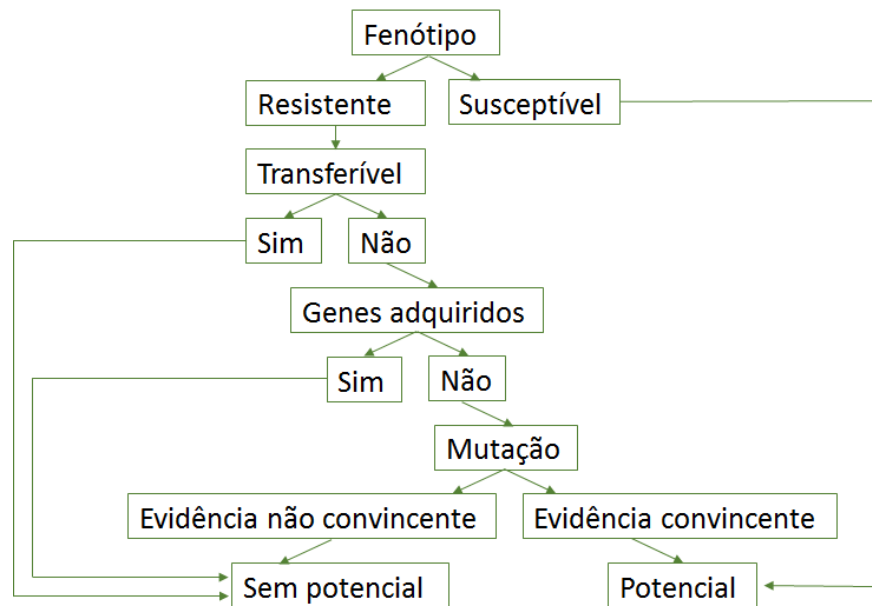


Figura 4: Esquema para tomada de decisão para seleção de novas cepas de BAL para aplicação em alimentos. FONTE: Adaptado de Courvalin, 2006.

Outro fator relevante para garantir a segurança da cultura lática é verificar a existência de genes que caracterizam a produção de aminas biogênicas. Estas aminas são bases orgânicas de baixo peso molecular com atividade biológica, podendo apresentar efeitos tóxicos se ingeridas em altas concentrações ou quando o processo natural de desintoxicação do organismo é inibido pela ação de medicamentos ou por alguma característica genética (GARAI et al., 2007; CALZADA, 2013).

A descarboxilação de aminoácidos, tais como: histidina, tirosina e ornitina, resulta na formação das aminas biogênicas correspondentes, histamina, tiramina e diaminobutano (putrescina), as quais são frequentemente encontradas em alimentos fermentados (GARAI et al., 2007). A tiramina caracteriza-se por ser uma potente vasoconstritora e sua ação na saúde humana geralmente limita-se à dor de cabeça e à enxaqueca. A histamina pode causar urticária, hipotensão, dor de cabeça, além de cólicas abdominais. As diaminas putrescina e cadaverina podem reagir com nitrito e formar nitrosaminas carcinogênicas. Poliaminas e diaminas podem ser convertidas em compostos N-nitrosos carcinogênicos estáveis e aumentar o crescimento de úlceras intestinais (CALZADA, 2013).

A formação de aminas biogênicas (Figuras 5 e 6) requer a presença de micro-organismos que são descarboxilase positiva, uma característica observada em muitos gêneros de BAL. Micro-organismos produtores de quantidades significativas de aminas biogênicas em condições de processamento não devem ser utilizados como culturas iniciadoras em alimentos fermentados (LORENCOVÁ et al., 2012).

O queijo é um substrato ideal para a produção de aminas, uma vez que seu processamento envolve a formação de aminoácidos livres advindos da proteólise e a provável presença de micro-organismos descarboxilase-positivos em condições ideais para seu crescimento. Outros fatores afetam a formação de aminas biogênicas em queijos, tais como: a presença de micro-organismos deteriorantes, o efeito sinérgico entre bactérias, a pasteurização do leite, a porcentagem de sal e o tempo de maturação. Sendo assim, a determinação de aminas biogênicas em alimentos pode ser feita por duas razões: primeiramente, devido à sua potencial toxicidade, mas também pode ser utilizada como indicativo de qualidade higiênico-sanitária do processo (TEN BRINK et al., 1990; LINARES et al., 2011; LOIZZO et al., 2013).

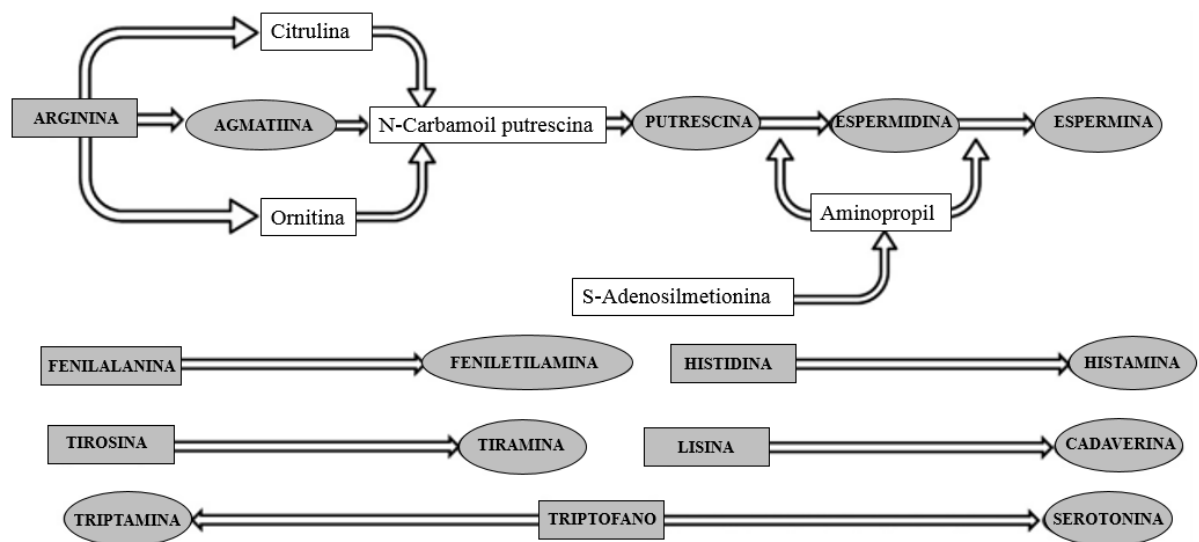


Figura 5: Formação de aminas biogênicas. FONTE: Adaptado de LOIZZO et al. (2013).

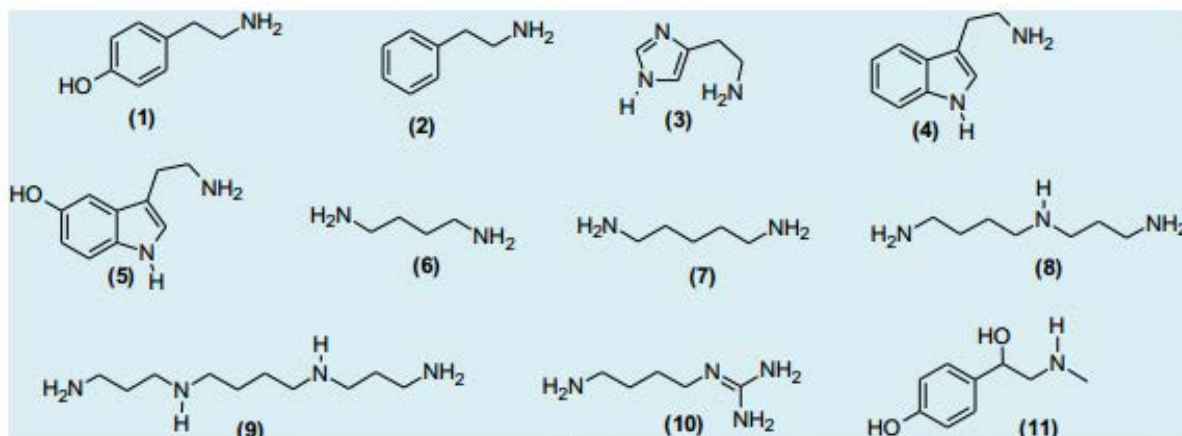


Figura 6: Estruturas químicas de algumas aminos biogênicas: tiramina (1); feniletilamina (2); histamina (3); triptamina (4); serotonina (5); putrescina (6); cadaverina (7); espermidina (8); espermina (9); agmatina (10) e sinefrina (11). FONTE: Cardozo et al. (2013).

Os métodos comumente utilizados para a quantificação de aminos biogênicas podem ser divididos em dois grupos: aqueles baseados na detecção das próprias aminos biogênicas, realizados por cromatografia, e aqueles baseados na detecção de micro-organismos produtores, verificados, principalmente, por técnicas de biologia molecular (LOIZZO et al., 2013).

Além disso, a atividade de enzimas prejudiciais, tais como a das enzimas β -glucosidase, *N*-acetil- β -glucosaminidase e β -glucuronidase, é um importante fator de segurança a ser estudado, uma vez que tem sido associado a transtornos de saúde e doenças intestinais (GIRAFFA, 2012). As β -glucuronidases, por exemplo, liberam toxinas e agentes mutagênicos que são glucuronados no fígado e excretados no intestino com a bile. Isto pode aumentar a concentração de componentes carcinogênicos, aumentando o risco de cânceres no intestino. As β -glucosidases podem causar efeitos tanto benéficos quanto prejudiciais para a saúde, uma vez que formam agliconas de diferentes glicosídeos, as quais podem possuir efeitos tóxicos/mutagênicos ou benéficos, tais como a liberação de flavonoides, que possuem ação antioxidante, da sua forma glicosilada (BEHLING et al., 2004; MANACH et al. 2004; DABEK et al., 2008; YOUN, PARK, JI, 2012). Estudos demonstram que a atividade da enzima β -glucuronidase está presente em BAL,

porém, a atividade de β -glucosidases é mais comumente encontrada (MICHLMAYR, KNEIFEL, 2014).

Para que sejam consideradas seguras, a atividade hemolítica deve ser ausente em cepas de BAL. Sendo assim, é importante que seja feita a verificação desta propriedade para a caracterização de segurança. A hemólise consiste no rompimento de uma hemácia, o que faz com que a hemoglobina seja liberada no plasma, ou seja, é a destruição dos glóbulos vermelhos do sangue por rompimento da membrana plasmática com liberação da hemoglobina (GIRAFFA, 2012).

3.5. Queijo Parmesão

O queijo Parmesão produzido no Brasil consiste de uma adaptação dos queijos tipo “Grana” italianos, Parmigiano Reggiano e Grana Padano, cujos nomes originais são protegidos por leis italianas e internacionais, não podendo ser adotados em outras regiões. Porém, a modificação não ocorreu apenas no nome, já que as características do queijo Parmesão brasileiro são bem diferentes das características dos queijos italianos; não só quanto ao sabor, aroma e textura, como também em relação ao tamanho. No Brasil, o Parmesão é geralmente fabricado em formas de 4 a 7 kg, em contraste com os originais italianos, que possuem cerca de 35 kg (FURTADO, 2011a). Outras diferenças se encontram no método de fabricação; os queijos italianos utilizam leite cru, e o Parmesão, leite pasteurizado. Além disso, no Brasil, faz-se a padronização da gordura do leite, enquanto para a fabricação de Grana Padano e Parmigiano Reggiano se faz o desnate natural, conhecido como processo de “*affioramento*”, no qual o leite passa por um prolongado repouso, e a gordura em suspensão, devido à sua menor densidade em relação aos demais componentes, tende a separar-se, formando uma camada espessa de creme na parte superior do leite, que é retirada (FURTADO, 2011b; NEVIANI et al., 2013).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos (Portaria 146/1996), o Parmesão é classificado como um queijo semi-gordo, com 25 - 44,9% de gordura no extrato seco (GES), de massa cozida, com baixa umidade ou queijo duro, podendo ter umidade máxima igual a 35,9%, quando completamente maturado (BRASIL, 1996). O Regulamento Técnico de Identidade e

Qualidade de Queijo Parmesão, Parmesano, Reggiano, Reggianito e Sbrinz (Portaria 353/1997) estabelece que estes tipos de queijos devem possuir consistência dura, textura compacta, consistente, superfície de fratura granulosa, cor ligeiramente amarelada, sabor salgado, ligeiramente picante a picante, odor suave, característico, agradável e bem desenvolvido, crosta firme, lisa e não-pegajosa, e não possuir olhaduras. Sua maturação deve ser de no mínimo 6 meses em temperatura não superior a 18 °C (BRASIL, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das culturas termófilas de BAL

Foram utilizadas 13 cepas de BAL termófilas, sendo 4 cepas de *S. thermophilus* (SJRP02, SJRP03, SJRP107 e SJRP109), 2 cepas de *Lb. helveticus* (SJRP56 e SJRP191) e 7 cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (SJRP49, SJRP50, SJRP51, SJRP57, SJRP76, SJRP149, SJRP181), previamente isoladas do processamento de muçarela de búfala fabricada com leite cru, e identificadas por Silva (2010) através do sequenciamento do gene 16S rRNA, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBILCE/UNESP).

As culturas estavam estocadas a -80 °C, sendo as de *Lactobacillus* em caldo Man-Rogosa-Sharpe – MRS (Difco, Sparks, EUA) acidificado até pH 5,4, e as de *Streptococcus* em caldo M17 (Himedia Laboratories, Bombay, Índia), adicionadas de glicerol estéril como crioprotetor. Na ocasião do uso, essas culturas lácticas foram retiradas do congelador e mantidas à temperatura ambiente para descongelamento. Para a ativação foi feita a inoculação em 10 mL de caldo MRS (2%, v/v) ou caldo M17, conforme a cepa, e incubação a 42 °C/24h em anaerobiose (VON MOLLENDORFF; TODOROV; DICKS, 2007), promovida por Anaerobac (Probac, São Paulo, Brasil).

4.2. Avaliação de segurança das cepas

4.2.1. Susceptibilidade a antibióticos

A susceptibilidade a antibióticos foi determinada através do teste de difusão em ágar, utilizando discos de antibióticos (Oxoid, Altrincham, Inglaterra). Para isso, as cepas de *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foram reativadas em 10 mL de meio líquido (M17 ou MRS, conforme a cepa) a 42 °C por

24 horas, e cultivadas em ágar sob mesma temperatura, por 48 horas. Uma colônia foi inoculada em caldo (M17 ou MRS, conforme a cepa) e incubada a 37 °C por 24 horas para obter o inóculo com cerca de 1×10^8 UFC/mL. Posteriormente, 100 µL foram adicionados a 10 mL de solução salina 0,85%, e então inoculados por profundidade em três placas com meio de cultura contendo 1% de ágar. Os discos de antibióticos foram distribuídos nas placas e inoculados a 42 °C por 24 horas.

Todas as cepas foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antibióticos: Ampicilina (10 µg/disco), Penicilina (10 µg/disco), Oxacilina (1 µg/disco), Vancomicina (30 µg/disco), Linezolida (30 µg/disco), Gentamicina (10 µg/disco), Estreptomicina (300 µg/disco), Eritromicina (15 µg/disco), Tetraciclina (30 µg/disco), Cloranfenicol (30 µg/disco), Nitrofurantoina (300 µg/disco), Norfloxacin (10 µg/disco), Ciprofloxacina (5 µg/disco), Bacitracina (10 µg/disco), Teicoplanina (30 µg/disco) e Fosfomicina (50 µg/disco).

Foram consideradas sensíveis as cepas que apresentaram formação de halo ao redor do disco de antibiótico maior que 2,0 mm, e resistentes as cepas cujo halo foi menor ou igual a 2,0 mm (MORANDI, SILVETTI, BRASCA, 2013; DE PAULA et al., 2014).

4.2.2. Verificação da atividade das enzimas *β*-glucosidase, N-acetil- *β*-glucosaminidase e *β*-glucuronidase

A atividade das enzimas *β*-glucosidase, N-acetil- *β*-glucosaminidase e *β*-glucuronidase foi determinada com a utilização do kit API-ZYM (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França). As enzimas, cuja presença foi avaliada pelo Kit API-ZYM, estão listadas na Tabela 1.

A suspensão de células foi preparada de acordo com instruções do fabricante e inoculada no kit API-ZYM. Os resultados foram graduados de 0,1 a 5 pela comparação com a cor desenvolvida em 5 minutos com a cor de reação padrão. O valor 0,1 corresponde a reação de menor intensidade e 5 a reação com máxima intensidade (AHMADOVA et al., 2013). Para a ausência de coloração, considerou-se

que uma possível reação não foi detectável pelo Kit API-ZYM, sendo identificado por ND (não detectável).

Tabela 1: Enzimas detectadas pelo kit API-ZYM.

Nº	Enzima detectada	Substrato	pH
1	Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato	8,5
2	Esterase (C:4)	2-naftil butirato	6,5
3	Esterase Lipase (C:8)	2-naftil caprilato	7,5
4	Lipase (C:14)	2-naftil miristato	7,5
5	Leucina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida	7,5
6	Valina arilamidase	L-valil-2-naftilamida	7,5
7	Cistina arilamidase	L-cistil-2-naftilamida	7,5
8	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	8,5
9	α -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	7,5
10	Fosfatase ácida	2-naftil fosfato	5,4
11	Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	Naftol-AS-BI-fosfato	5,4
12	α -galactosidase	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosídeo	5,4
13	β -galactosidase	2-naftil- β D-galactopiranosídeo	5,4
14	β -glucuronidase	Naftol-AS-BI- β D-glucuronídeo	5,4
15	α -glucosidase	2-naftil- α D-glucopiranosídeo	5,4
16	β -glucosidase	6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosídeo	5,4
17	N-acetil- β -glucosaminidase	1-naftil-N-acetil- β D-glucosaminídeo	5,4
18	α -manosidase	6-Br-2-naftil- α D-manopiranosídeo	5,4
19	α -fucosidase	2-naftil- α L-fucopiranosídeo	5,4

Fonte: Biomérieux.

4.2.3. Extração do DNA com Kit “Easy DNA” TM

As culturas lácticas termófilas autóctones e comerciais foram revitalizadas em 10 mL de caldo no qual estavam estocadas, incubadas a 42 °C por 24 h, e transferidas para placas contendo ágar, sob as mesmas condições. Em seguida, uma colônia foi incubada *overnight* em caldo a 42 °C. Posteriormente, 1,5 mL do caldo foi adicionado em um tubo de *Eppendorf* e centrifugado a cerca de 1.100 g por

10 min. O *pellet* obtido foi utilizado para a extração do DNA genômico bacteriano, utilizando o Kit “Easy DNA” TM (Invitrogen, Carlsbad, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os DNAs extraídos foram suspensos em tampão TE e posteriormente quantificados. Os cálculos de concentração do DNA foram feitos a partir de 1,5 µL de amostra usando o equipamento Thermo NanoDrop (Uniscience-Labsystems, Helsinki, Finlândia) em comprimento de onda de 260 nm (SILVA, 2010). O DNA obtido foi armazenado em freezer a -80 °C para posterior utilização.

4.2.4. Verificação da presença de genes relacionados a fatores de virulência, produção de aminos biogênicas e resistência a antibióticos

Os DNAs das cepas foram submetidos a reações da polimerase em cadeia (PCR) de acordo com Vankerckhoven et al. (2004), De Las Rivas, Marcobal e Muñoz. (2005) e Martin-Platero et al. (2009). Os *primers*, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos estão detalhados na Tabela 2.

Foi feita a pesquisa por genes relacionados à virulência, resistência à vancomicina e à produção de aminos biogênicas, tais como: *gel E* (gelatinase), *hyl* (hialuronidase), *asa 1* (substância de agregação), *esp* (proteína de superfície de enterococo), *cylA* (citolisina), *efaA* (antígeno da endocardite), *ace* (proteína de aderência ao colágeno), *van A* e *van B* (ambos relacionados à vancomicina), *hdc1* e *hdc2* (histidina descarboxilase), *tdc* (tirosina descarboxilase), *odc* (ornitina descarboxilase). Os produtos da PCR foram separados por eletroforese com gel de agarose 2,0% (p/v) contendo brometo de etídio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Tabela 2. Primers, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos relacionados com genes de virulência, genes de resistência à vancomicina e produção de aminas biogênicas.

Alvo	Gene	Primers	TA °C	TF (bp)	Referência
Virulência	<i>gelE</i>	TATGACAATGCTTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	47	213	Vankerhoven et al. 2004
	<i>Hyl</i>	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	53	276	Vankerhoven et al. 2004
	<i>asa1</i>	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	50	375	Vankerhoven et al. 2004
	<i>Esp</i>	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	47	510	Vankerhoven et al. 2004
	<i>cylA</i>	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	52	688	Vankerhoven et al. 2004
	<i>efaA</i>	GCCAATTGGGACAGACCCTC CGCCTTCTGTTCTTCTTTGGC	57	688	Martin-Platero et al. 2009
	<i>Ace</i>	GAATTGAGCAAAAGTTCAATCG GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC	48	1008	Martin-Platero et al. 2009
Resistência a antibióticos	<i>van A</i>	TCTGCAATAGAGATAGCCGC GGAGTAGCTATCCCAGCATT	52	377	Martin-Platero et al. 2009
	<i>van B</i>	GCTCCGCAGCCTGCATGGACA ACGATGCCGCCATCCTCCTGC	60	529	Martin-Platero et al. 2009
Aminas biogênicas	<i>hdc1</i>	AGATGGTATTGTTTCTTATG AGACCATAACCCATAACCTT	46	367	De Las Rivas et al. 2005
	<i>hdc2</i>	AAYTCNTTYGAYTTYGARARGARG ATNGGNGANCCDATCATYTTTGTGNCC	50	534	De Las Rivas et al. 2005
	<i>Tdc</i>	GAYATNATNGGNATNGGNYTNGAYCARGC CRTARTCNGGNATAGCRAARTCNGTRTG	55	924	De Las Rivas et al. 2005
	<i>Odc</i>	GTNTTYAAYGCNGAYAARACNTAYTTYGT ATNGARTTNAGTTCRCAYTTYTCNGG	54	1446	De Las Rivas et al. 2005

**gelE* (gelatinase), *hyl* (hialuronidase), *asa1* (substância de agregação), *esp* (proteína de superfície enterococos), *cylA* (citolisina), *efaA* (antígeno da endocardite), *ace* (adesão ao colágeno), *van A* e *van B* (resistência à vancomicina), *hdc1* e *hdc2* (histidina decarboxilase), *tdc* (tirosina decarboxilase) e *odc* (ornitina decarboxilase). TA: temperatura de anelamento; TF: tamanho do fragmento.

4.2.5. Verificação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi determinada em meio ágar-sangue, preparado a partir de *Tryptose Blood Agar Base* com adição de sangue de ovelha (Newprov, Pinhais, Brasil), de acordo com metodologia descrita por ADIMPONG et al. (2012) a 37 °C por 48 horas. A formação de um halo transparente em torno das colônias caracteriza atividade β -hemolítica, enquanto que um halo esverdeado indica atividade α -hemolítica, e a ausência de halo significa que há atividade γ -hemolítica (ou ausência de atividade).

4.3. Propriedades tecnológicas

4.3.1. Atividade enzimática

O perfil de atividade enzimática (glicolítica, proteolítica e lipolítica) (Tabela 1) das cepas autóctones foi determinado usando o kit API-ZYM (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França), conforme metodologia descrita no item 4.2.2.

Também foi verificada a atividade das aminopeptidases PepN, PepC, PepX e PepL, que são as mais ativas nas culturas usadas para fabricação de queijo Parmesão, de acordo com a metodologia descrita por GATTI et al. (2008). Os substratos para cada aminopeptidase se encontram listados na Tabela 3. Foram utilizados 0,656 mol/L de cada solução de substrato- β -naphthylamide (β NA) (Bachem Feinchemikalien AG, Budendorf, Switzerland) em solução tampão de fosfato de sódio 0,05 mol/L. Uma alíquota de 250 μ L de substrato- β NA foi incubado por diferentes períodos, conforme o aminoácido- β NA (Lys- β NA, 4 h; Arg- β NA e Phe-Pro- β NA, 6 h; Leu- β NA, 16 h) a 37 °C. A reação foi interrompida adicionando-se 250 μ L de HCl (2,0 mol/L). O grau de hidrólise foi quantificado pela leitura da densidade ótica em espectrofotômetro a 580 nm (A_{580nm}). As análises foram realizadas em duplicata e a unidade utilizada de atividade enzimática (AE) é definida pelo número de micromoles de β NA hidrolisada em 1 h por mL de amostra. Para a

determinação da quantidade de micromoles de β NA hidrolisada utiliza-se a equação da reta obtida pela curva padrão (micromoles de β NA x absorbância).

Tabela 3: Substratos utilizados para a verificação da atividade de aminopeptidases.

Aminopeptidase	Substrato
PepN	Lys- β NA
PepC	Arg- β NA
PepX	Phe-Pro- β NA
PepL	Leu- β NA

4.3.2. Cinética de acidificação

Para a determinação da cinética de acidificação, todas as culturas autóctones e foram reativadas em meio líquido e cultivadas em ágar, utilizando o meio de cultivo MRS (Difco, Sparks, EUA) para *Lactobacillus* e M17 (Himedia Laboratories, Bombay, Índia) para *Streptococcus*, nas mesmas condições em que foram isoladas (SILVA, 2010). Para o preparo do inóculo, uma colônia foi inoculada em caldo (MRS ou M17) e incubada a 37 °C por 24 horas para obter o inóculo com cerca de 1×10^8 UFC/mL. Em seguida, 4 mL do inóculo foram centrifugados a 5000 g por 6 minutos a 4 °C, lavados uma vez em solução salina 0,85% e suspensos em 4 mL de leite UHT integral. Para o preparo do inóculo da cepa comercial de *S. thermophilus* TA040 utilizada, pesou-se 0,15 g da cultura liofilizada, adicionou-se em 50 mL de leite UHT integral e incubou-se em estufa a 42 °C por 30 minutos. Posteriormente, 1% de cada inóculo preparado foi adicionado, separadamente, em 200 mL de leite UHT integral, acondicionados em frascos e incubados em banho-maria a 42 °C acoplado ao Sistema CINAC, que avaliou a cinética de acidificação durante a fermentação, até atingir pH 5,0 (pH final). Para a determinação da cinética de acidificação foram avaliados os parâmetros: velocidade máxima de acidificação ($V_{\text{máx}}$) (pH/min), tempo para atingir a velocidade máxima ($t_{\text{máx}}$) (h) e tempo necessário para atingir pH 5,0 (t_{pH5}), em horas (SILVA, 2015). As análises foram realizadas em duplicata. As culturas foram classificadas de acordo com a taxa de acidificação em rápidas, médias ou lentas. Foram consideradas rápidas, médias ou lentas quando a variação

do valor de pH (Δ pH) em relação ao pH inicial atingir 0,4U de pH em menos de 3 horas, entre 3 e 5 horas, ou mais de 5 horas, respectivamente (AYAD et al., 2004).

4.3.3. Perfil de hidrólise da caseína

A avaliação da capacidade de hidrólise da caseína pelas culturas autóctones selecionadas a partir da caracterização de segurança foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida (Urea - PAGE). As amostras utilizadas foram coletadas ao fim da determinação da cinética de acidificação, na qual o leite foi fermentado até pH 5,0, e congeladas para posterior avaliação. As amostras foram aplicadas em cuba de eletroforese vertical, Mini Protean 4 Cell (Bio Rad, Hercules, EUA), pelo método descrito por Merheb-Dini et al. (2012). Os extratos para eletroforese foram preparados dissolvendo-se 10 mg de amostra em 1 mL de tampão, preparado a partir de 1,50 g de tris-hidroximetil aminometano (TRIS) (Amresco, Solon, EUA) e 84 g de ureia (Synth, Diadema, Brasil) em 150 mL de água destilada, adicionado de ácido clorídrico (Quemis, Indaiatuba, Brasil) até pH 6,7, para um volume final de 200 mL. As amostras foram aquecidas a 37 °C por 1 hora, após, foram adicionados 5 μ L de β -mercaptoetanol (Amresco, Solon, EUA), seguido de aquecimento a 37 °C por 45 minutos, e por fim, foi adicionada uma pequena quantidade de azul de bromofenol (Amresco, Solon, EUA). Para a separação das frações, 10 μ L das amostras e 3 μ L do padrão de leite foram aplicados no gel, utilizando-se potência de 100 V, até o corante azul de bromofenol atingir o final do gel, em aproximadamente, 5 horas. Os géis foram corados com solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Amresco, Solon, EUA) por 24 h e descorados com solução descorante (água destilada, etanol e ácido acético, na proporção de 6:3:1).

4.3.4. Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Para a verificação da produção de EPS, as culturas autóctones foram reativadas em meio líquido e cultivadas em ágar, utilizando o meio de cultivo MRS (Difco, Sparks, EUA) para *Lactobacillus* e M17 (Himedia Laboratories, Bombay,

Índia) para *Streptococcus*, nas mesmas condições em que foram isoladas (SILVA, 2010). Uma colônia foi inoculada em 10 mL de caldo (MRS ou M17, conforme a cepa) e incubada a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, os caldos contendo as culturas foram centrifugados a 7077 x g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um béquer previamente pesado. Ao sobrenadante foram adicionados três volumes de álcool anidro (Synth, Diadema, Brasil) (4 °C) mantendo-o a 4 °C por 24 horas para a precipitação dos EPS. O EPS precipitado foi seco em estufa a vácuo a 55 °C até peso constante, determinando assim seu rendimento em miligramas por 10 mL de meio de produção (mg/10 mL) (GRANDI, 2010).

4.4. Seleção das culturas para aplicação em queijos

Foram selecionadas as cepas consideradas, simultaneamente, seguras e com as melhores características tecnológicas para utilização em queijo Parmesão, ou seja, culturas isentas de atividade hemolítica, fatores de virulência, resistência a antibióticos e de produção de aminas biogênicas, e que apresentaram relevante atividade enzimática, além de boa acidificação.

4.5. Produção do queijo Parmesão

4.5.1. Preparo da cultura lática

O preparo da cultura lática utilizada como inóculo para a fabricação do queijo foi feito de maneira análoga ao preparo do inóculo para a determinação da cinética de acidificação, no entanto, as células foram suspensas em leite UHT desnatado Molico (Nestlé, Araçatuba, Brasil), ao invés de leite UHT integral (item 4.3.2). O inóculo foi composto pela mistura das cepas termófilas selecionadas, as quais foram preparadas individualmente, a partir da inoculação de 1% do pré-inóculo, em volumes diferentes, para que, no final, a proporção entre as espécies de *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* fosse de 60:35:5,

respectivamente, e o volume total de inóculo correspondesse a 1,5% do volume total de leite a ser utilizado na fabricação dos queijos (FURTADO, 2011a).

4.5.2. Processamento do queijo Parmesão

A fim de simular uma produção em escala industrial, produziu-se os queijos no Laticínio Promileite Indústria e Comércio de Leite, localizado na cidade de Promissão, estado de São Paulo. Para isso, os inóculos de cada cepa, contendo 10^8 UFC/mL, recém preparados (frescos), devidamente acondicionados sob refrigeração, foram levados até o laticínio.

Os queijos foram produzidos em dois processamentos independentes, utilizando-se, para cada um deles, 150 L de leite pasteurizado e padronizado com 2,3% de gordura.

No tanque de fabricação, foram adicionados ao leite: solução de cloreto de cálcio (40 mL/100L de leite), as culturas lácticas (1,5%) e, por último, o coalho (12 mL/100L de leite). Após mistura, procedeu-se a etapa de coagulação da massa, realizada a 35 °C durante, aproximadamente, 25 minutos. Em seguida, cortou-se a massa, utilizando liras verticais e horizontais, e agitou-se por cerca de 20 minutos para que os grãos de coalhada atingissem tamanhos aproximados de grãos de arroz. Em seguida, por aquecimento direto, elevou-se a temperatura até 48 °C, com agitação por mais 20 minutos. Posteriormente, foi feita a dessoragem e, então, a massa foi distribuída em formas de cerca de 1 Kg, constituindo a etapa de enformagem. Os queijos enformados foram colocados em prensas verticais, onde permaneceram por cerca de 30 minutos em uma posição, foram virados e prensados por mais duas horas para prensagem uniforme. Após a prensagem, os queijos foram acomodados em estantes, ainda nas formas, onde permaneceram por aproximadamente 24 horas para que ocorresse o abaixamento pH até cerca de 5,2. Em seguida, os queijos foram desenformados e submetidos à salga. Os queijos foram imersos em salmoura contendo 18% de sal e permaneceram durante 24 horas a 8 °C. Logo após, foi realizada a secagem superficial dos queijos, a qual consistiu em deixar as peças em estantes em uma câmara refrigerada (8 °C) com circulação forçada de ar por 4 dias. Os queijos foram transportados até o Laboratório de Leites

e Derivados (LLD) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), onde foram maturados em estufa climatizada (B. O. D.) a 16 °C por 6 meses. A Figura 7 mostra o fluxograma do processamento realizado e as Figuras 8, 9, 10 e 11, ilustram algumas etapas do processo.

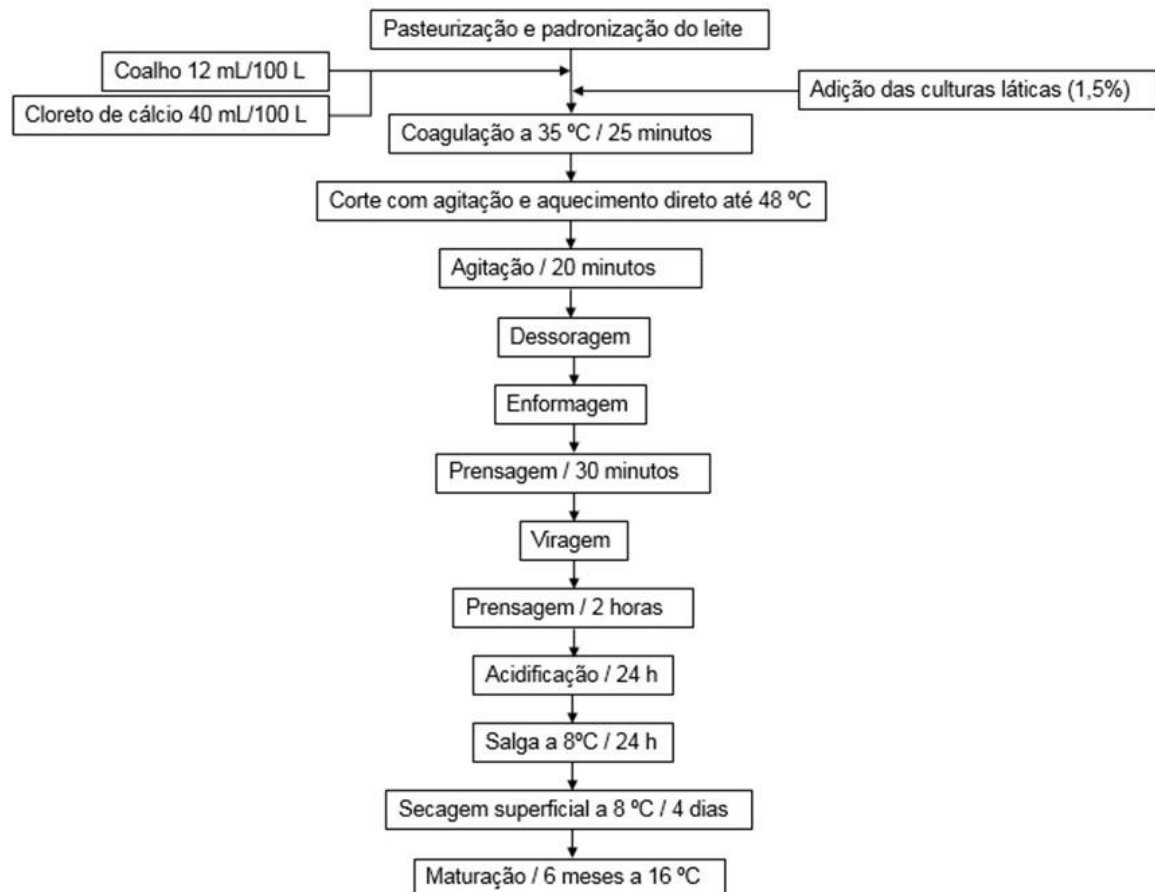


Figura 7: Fluxograma do processamento do queijo Parmesão.



Figura 8: Etapa de adição dos ingredientes para a fabricação de queijo Parmesão.



Figura 9: Etapa de corte com a agitação e aquecimento direto, durante o processamento de queijo Parmesão.



Figura 10: Etapa de enformagem da massa, durante o processamento de queijo Parmesão.



Figura 11: Etapa de maturação do queijo Parmesão.

4.6. Caracterização do queijo Parmesão

4.6.1. Determinação do rendimento

O rendimento dos queijos (L de leite/kg de queijo) foi calculado pela relação entre o volume de leite utilizado e a massa de queijo obtida.

4.6.2. Composição e caracterização dos queijos

Foi avaliada a composição centesimal dos queijos, após 3 dias de fabricação, em triplicata, e os métodos utilizados encontram-se descritos a seguir:

- Teor do extrato seco total (EST): foi determinado por secagem em estufa a vácuo por 24 horas a 70 °C (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1997);
- Teor de gordura (G): foi determinado pelo método de Gerber com butirômetro para queijo (BRASIL, 2006) e o teor de gordura no extrato seco (GES) foi calculado pela fórmula: $\% \text{ GES} = (G / \text{EST}) \times 100$;
- Teor de proteína total (PT): primeiramente, foi determinado o teor de nitrogênio total (NT) pelo método de Kjeldahl. O teor de proteína total foi calculado

multiplicando-se o valor do nitrogênio total pelo fator 6,38 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1997);

- Teor de cinzas: foi determinado por incineração em mufla a 550 °C (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1997);
- Teor de sal: foi determinado pelo método de doseamento nas cinzas, utilizando-se o método de titulometria por precipitação (Argentometria) (BRASIL, 2006);

Também foram realizadas, em triplicata, as análises físico-químicas de acidez, pH e índices de maturação durante o período de armazenamento de 180 dias, com amostragem a cada 30 dias. Os métodos utilizados encontram-se descritos a seguir:

- Acidez: foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N usando fenolftaleína como indicador (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1997). Os resultados foram expressos em % de ácido láctico;
- pH: obtido pela inserção direta do eletrodo calibrado do pHmetro (Modelo PG1800, Gehaka, São Paulo, Brasil) nas amostras de queijo, previamente trituradas, dispostas em béqueres;
- Proteólise: foi determinada pela degradação da caseína e quantificada pela relação entre os teores de nitrogênio solúvel (NS - nitrogênio não caseico e nitrogênio não proteico) e nitrogênio total (NT) (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). O nitrogênio não caseico (NNC) ou NS em pH 4,6 foi determinado pela dosagem de NT no filtrado obtido após precipitação isoeletrica das caseínas (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1997). O teor de nitrogênio não proteico (NNP) ou nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12% (NS TCA) foi determinado pela dosagem de NT no filtrado obtido após precipitação da totalidade das proteínas em presença de TCA 12% (AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1997);

4.6.3. Caracterização do perfil eletroforético da caseína em gel de poliacrilamida (Urea – PAGE)

Para a avaliação da degradação das frações de caseína dos queijos produzidos, utilizou-se a mesma metodologia descrita no item 4.3.3, porém

utilizando-se caseinato de sódio como padrão, ao invés de leite e 6 µL de amostra ao invés de 10 µL, uma vez que o queijo apresenta maior percentual proteico em relação ao leite. As amostras de queijo foram coletadas no primeiro dia de maturação e a cada 30 dias, até o final da maturação, sendo armazenadas congeladas para posterior avaliação.

4.6.4. Caracterização microbiológica

Para determinar a qualidade higiênico-sanitária, os queijos foram analisados após 110 dias de fabricação. Em atendimento aos Padrões Microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 2001), para os queijos de baixa umidade, como o queijo Parmesão, foram realizadas as análises de contagem de coliformes totais e fecais (NMP/g), Estafilococos coagulase positiva (UFC/g) e presença de *Salmonella sp.* As análises foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

4.7. Delineamento experimental e análise estatística dos resultados

O planejamento experimental da produção dos queijos envolve dois processamentos (duplicata) e sete períodos de estocagem (3, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias). Para a análise dos resultados, durante os períodos de estocagem foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparação de médias com um nível de significância igual a 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação de segurança das cepas

5.1.1. Susceptibilidade a antibióticos

De todas as cepas de *BAL* termófilas analisadas, apenas as cepas de *S. thermophilus* SJRP107 e SJRP109 foram sensíveis aos 16 antibióticos testados (Tabela 4). Dez antibióticos (linezolida, estreptomicina, eritromicina, bacitracina, teicoplanina, vancomicina, penicilina, cloranfenicol, tetraciclina e ampicilina) inibiram o crescimento de todas as 13 cepas de *BAL* desse estudo.

As cepas de *S. thermophilus* SJRP02 e SJRP03 apresentaram resistência à oxacilina. Contrariamente, em estudo realizado por Karapetkov e colaboradores (2011), a cepa de *S. thermophilus* LC201 não apresentou resistência a este antibiótico. Tosi e colaboradores (2007) relataram que diferentes cepas de *S. thermophilus* possuíam genes de resistências adquiridos. Sendo assim, mesmo não sendo um micro-organismo patogênico, esta espécie pode transferir genes de resistência para bactérias patogênicas, representando um potencial risco que deve ser melhor avaliado (DELORME, 2008). Neste aspecto, as cepas de *S. thermophilus* SJRP02 e SJRP03 devem ser submetidas a uma análise adicional que determine a natureza da resistência encontrada, uma vez que apenas a verificação do perfil de resistência a antibióticos não é suficiente para garantir sua segurança, já que este teste não indica ausência de mecanismos de transferência na cepa (BERNARDEAU et al., 2008).

Além disso, é recomendado que cepas de bactérias que possuem genes transferíveis de resistência a antibióticos não sejam aplicadas em alimentos (KARAPETKOV et al., 2011). Assim, as cepas de *S. thermophilus* SJRP02 e SJRP03 foram eliminadas do estudo.

As cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP51 e SJRP181 também foram resistentes à oxacilina. No entanto, geralmente, *Lactobacillus* são sensíveis a antibióticos da classe das penicilinas, tais como penicilina, ampicilina e oxacilina, as quais atuam inibindo a síntese da parede celular (AMMOR et al., 2007;

KARAPETKOV et al., 2011). Estas cepas apresentaram perfis totalmente diferentes dos demais *Lactobacillus spp.* estudados, sendo os únicos a apresentarem resistência à oxacilina e sensibilidade a fosfomicina.

Algumas cepas de *Lactobacillus sp.* têm sido consideradas intrinsecamente resistentes a glicopeptídeos, tal como vancomicina, e a aminoglicosídeos, tais como: gentamicina, canamicina e estreptomicina (AMMOR et al., 2007; BERNARDEAU et al., 2008; SHARMA et al., 2014). No entanto, Karapetkov e colaboradores (2011) e Drago e colaboradores (2013) encontraram cepas de *Lactobacillus sp.* sensíveis à vancomicina e a aminoglicosídeos. No presente estudo, apenas a cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP76 apresentou resistência à gentamicina (halo ≤ 2 mm) dentre os *Lactobacillus* testados (Tabela 4). Sendo assim, os diferentes resultados nos leva a crer que a resistência a glicopeptídeos e aminoglicosídeos é cepa dependente, e não intrínseca ao gênero *Lactobacillus*.

De acordo com Hummel e colaboradores (2007), *Lactobacillus* parecem ser intrinsecamente resistentes à fluoroquinolonas, tais como ciprofloxacina e norfloxacina. No presente estudo, muitas cepas de *Lactobacillus* apresentaram elevada resistência (ou baixa sensibilidade) a antibióticos que atuam inibindo a síntese de DNA (ciprofloxacina, nitrofurantoína e norfloxacina), mesmo mecanismo de atuação das fluoroquinolonas. Sendo assim, a resistência encontrada para estes antibióticos pode estar relacionada ao seu mecanismo de ação, sendo considerada intrínseca. Karapetkov e colaboradores (2011) também encontraram cepas de *Lb. acidophilus*, *Lb. lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* e *S. thermophilus* resistentes a antibióticos que atuam por inibição da síntese de DNA.

As duas cepas de *Lb. helveticus* e a maioria das cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foram resistentes à fosfomicina (Tabela 4). Este antibiótico atua pela inibição da formação da parede celular bacteriana e normalmente é aplicado para tratamento de infecções urinárias. A resistência de BAL à fosfomicina também foi observada em *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Leuconostoc citreum* isoladas de queijo (JERONYMO-CENEVIVA, 2013).

Apesar do gênero *Lactobacillus* ser grande detentor de resistência intrínseca, não há uma concordância entre os autores a respeito de quais antibióticos e qual a natureza dessa resistência.

Tabela 4: Medida (mm) do halo de inibição formado pela ação do antibiótico sobre BAL termófilas (*S. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)*.

Antibiótico	Classe de antibiótico	<i>S. thermophilus</i>				<i>Lb. helveticus</i>		<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>							
		2	3	107	109	56	191	49	50	51	57	76	149	181	
Inibidores da síntese da parede celular															
Ampicilina	β-lactâmicos	11	11	15	10	19	15	9	8	10	5	9	13	9	
Penicilina	β-lactâmicos	9	12	16	11	25	14	10	10	8	14	11	18	8	
Oxacilina	β-lactâmicos	0	0	8	3	10	10	5	5	0	8	4	10	0	
Vancomicina	Glicopeptídeo	5	5	6	5	12	8	7	6	7	8	7	9	7	
Bacitracina	Polipeptídeo	5	6	10	3	18	10	9	9	6	11	9	10	5	
Teicoplanina	Glicopeptídeo	6	10	8	5	10	7	5	4	6	7	5	7	5	
Fosfomicina	β-lactâmicos	9	9	10	6	0	0	0	0	8	0	0	0	8	
Inibidores da síntese proteica															
Linezolida	Oxazolidinona	11	11	9	9	10	14	10	10	15	18	11	13	11	
Gentamicina	Aminoglicosídeo	4	7	5	3	6	4	4	5	5	8	2	5	4	
Estreptomicina	Aminoglicosídeo	7	8	9	7	17	10	9	8	7	13	8	11	5	
Eritromicina	Macrolídeo	10	11	8	9	9	12	11	10	12	16	11	13	10	
Tetraciclina	Tetraciclina	10	11	12	5	15	13	11	12	13	14	11	12	13	
Cloranfenicol	Amfenicol	11	9	8	9	12	18	9	11	11	12	6	13	10	
Inibidores da síntese de DNA															
Nitrofurantoina	Nitrofurano	10	9	11	9	12	11	0	0	10	0	6	11	9	
Norfloxacin	Fluoroquinolona	7	6	5	3	0	1	1	3	6	0	2	5	6	
Ciprofloxacina	Fluoroquinolona	7	7	7	5	2	0	2	4	9	7	3	4	8	

*Cepa resistente ao antibiótico para halo de inibição ≤ 2 mm, e sensível para halo de inibição > 2mm.

5.1.2. Verificação da atividade das enzimas β -glucosidase, N-acetil- β -glucosaminidase e β -glucuronidase

A atividade da enzima *N-acetil- β -glucosaminidase* não foi detectada em nenhuma das cepas estudadas (Tabela 5). No entanto, duas cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (SJRP50 e SJRP76) apresentaram fraca atividade da β -glucuronidase. De acordo com Giraffa (2012), para a seleção de bactérias que serão utilizadas como probióticas, um dos critérios de segurança é a ausência da atividade dessas duas enzimas, uma vez que estão relacionadas a doenças intestinais e outros transtornos de saúde. Sendo assim, sob este aspecto, mesmo possuindo baixa atividade, as cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP50 e SJRP76 não devem ser utilizadas em alimentos, e desta forma, foram eliminadas do estudo.

As cepas de *Lb. helveticus* SJRP56 e SJRP191 apresentaram alta atividade da enzima β -glucosidase. Apesar de esta enzima poder provocar danos à saúde, muitos autores destacam os benefícios que esta enzima pode proporcionar. Taverniti e Gulielmetti (2012) relataram que cepas de *Lb. helveticus* possuem enzimas, incluindo β -glucosidase, que podem contribuir para o melhoramento da qualidade e segurança de alimentos. Por exemplo, Donkor e Shah (2008) realizaram um estudo no qual avaliou-se a conversão de isoflavonas em agliconas pela enzima β -glucosidase, produzida por bactérias acidoláticas. Além disso, a atividade da β -glucosidase é importante na conversão de metabólitos tóxicos em compostos com bioatividade benéfica ou com maior biodisponibilidade (MICHELMAYR, KNEIFEL, 2014). Em estudo realizado por Ahmadova e colaboradores (2013), a cepa de *Enterococcus faecium* AQ71 foi caracterizada como produtora da enzima β -glucosidase e, ainda assim, foi considerada segura para ser utilizada na indústria de alimentos. Além disso, cepas de *Escherichia coli*, que são naturais no nosso intestino, possuem alta atividade da enzima β -glucosidase (YOUN, PARK, JI, 2012), sendo assim, as cepas que apresentaram atividade desta enzima não foram descartadas do estudo.

5.1.3. Verificação da presença de genes relacionados a fatores de virulência, produção de aminos biogênicas e resistência a antibióticos

As cepas de *S. thermophilus* SJRP107 e SJRP109, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP49, SJRP57 e SJRP149, e *Lb. helveticus* SJRP656 e SJRP191, foram avaliadas quanto à existência de genes relacionados à virulência, resistência ao antibiótico vancomicina e produção de aminos biogênicas¹. As cepas de *S. thermophilus* SJRP107, de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP49 e SJRP57, e *Lb. helveticus* SJRP56 e SJRP191 não apresentaram nenhum dos genes relacionados a fatores de virulência, produção de aminos biogênicas e resistência à vancomicina. A ausência de fatores virulentos é de grande importância para cepas que serão aplicadas em alimentos, uma vez que é um dos quesitos de segurança de maior relevância.

As BAL podem possuir genes de virulência que conferem características de patogenicidade, incluindo a colonização e invasão de tecidos do hospedeiro. Algumas cepas de *Enterococcus* são patógenas oportunistas, podendo provocar bacteremia, endocardite e infecções do trato urinário entre outras infecções. Bactérias com fatores de virulência, uma vez presentes em produtos alimentícios, representam um risco para os consumidores (FRANZ et al., 2011; PERIN et al., 2014). Assim, a verificação da existência desses fatores, é um dos aspectos de segurança necessários para a seleção de novas cepas para aplicação em alimentos.

A cepa de *S. thermophilus* SJRP109 apresentou os genes *efaA* e *asa1*. A alta incidência desses genes é comumente encontrada em cepas de *Enterococcus* (CRETI et al., 2004; PERIN et al., 2014). Esses genes estão relacionados com a produção de diferentes substâncias relacionadas à colonização e adesão a superfícies bióticas e abióticas, e também com a invasão do sistema imune do hospedeiro (PERIN et al., 2014). Com este resultado, a cepa de *S. thermophilus*

¹ Este teste foi realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), por Luana Faria Silva, na ocasião, aluna de doutorado em Microbiologia, IBILCE – UNESP, uma vez que envolve conhecimentos específicos de biologia molecular.

SJRP109 foi eliminada do estudo, uma vez que não poderá ser aplicada na produção de alimentos.

5.1.4. Atividade hemolítica

Foi avaliada a atividade hemolítica das cepas de *S. thermophilus* SJRP107, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP49 e SJRP57, e *Lb. helveticus* SJRP56 e SJRP191. Para as cepas de *S. thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, houve a formação de um halo esverdeado, demonstrando atividade α -hemolítica, o que as caracteriza como não nocivas à saúde (ADIMPONG et al., 2012). As cepas de *Lb. helveticus* não se desenvolveram no meio ágar-sangue, mesmo testando duas temperaturas de incubação (42 °C e 37 °C) e sob condições de aerobiose e anaerobiose.

5.2. Propriedades tecnológicas

5.2.1. Atividade enzimática

As cepas de *S. thermophilus* apresentaram menor atividade enzimática em relação aos lactobacilos. Nenhuma cepa testada apresentou atividade para as enzimas fosfatase alcalina, lipase, tripsina, α -quimotripsina, α -manosidase e α -fucosidase (Tabela 5).

Com relação às aminopeptidases testadas pelo kit API ZYM, verificou-se baixa atividade da leucina-arilamidase para todas as cepas, com exceção para *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP149 (sem atividade). As cepas *Lb. helveticus* SJRP56 e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP50 apresentaram alta e intermediária atividade, respectivamente. Todas as cepas testadas apresentaram baixa ou nenhuma atividade para valina-arilamidase e cistina-arilamidase.

A atividade de esterase e esterase-lipase foi detectada para a maioria das cepas, porém, em baixa intensidade. Estas enzimas são responsáveis pelo aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (entre 4 e 10 carbonos), que são os maiores contribuintes para a formação do aroma e sabor em queijos (Figura 3,

citada anteriormente), principalmente os de longa maturação, como o Parmesão (McSWEENEY, 2004; AHMADOVA et al., 2013).

A enzima fosfatase ácida foi detectada em baixa e média intensidade para todas as cepas testadas. A atividade desta enzima possui grande importância para a hidrólise de fosfopeptídeos durante a maturação do queijo (AHMADOVA et al., 2013).

As cepas de *Lb. helveticus* se destacaram pela alta atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos, β -galactosidase e β -glucosidase, já mencionada anteriormente. Apenas a cepa de *S. thermophilus* SJRP109 e as cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP50, SJRP57, SJRP76 e SJRP149 apresentaram atividade para β -galactosidase. Esta enzima converte a lactose em galactose e glicose. A hidrólise da lactose no leite e outros produtos lácteos pela β -galactosidase possui grande interesse industrial, uma vez que pode evitar problemas tecnológicos, como por exemplo, a cristalização da lactose (VASILJEVIC, JELEN, 2002). Além disso, produtos que contenham β -galactosidase podem ser ingeridos por pessoas que apresentem intolerância à lactose (PANESAR et al., 2006).

A atividade da enzima α -galactosidase foi detectada apenas em três cepas de lactobacilos: *Lb. helveticus* SJRP191 e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP50 e SJRP149 (Tabela 5).

A verificação da atividade de aminopeptidases (AE) foi realizada para as cepas de *Lb. helveticus* SJRP56 e SJRP191, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP49, SJRP57 e SJRP149, e *S. thermophilus* SJRP107. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6. Por ser uma característica das BAL, as cepas apresentaram atividade para todas as aminopeptidases testadas (PepN, PepC, PepX e PepL). Embora as cepas testadas pertençam a gêneros e espécies diferentes, apresentaram valores próximos de AE para cada aminopeptidase. No geral, as cepas demonstraram maior atividade das aminopeptidases PepN e PepC, e menor atividade da PepL. Destaca-se a atividade de PepN da cepa de *Lb. helveticus* SJRP191.

[illegible]

As enzimas proteolíticas liberadas pelas BAL testadas estavam presentes na forma ativa e podem contribuir, juntamente com as proteinases naturais do leite, com uma extensiva degradação da caseína no queijo. No entanto, as enzimas proteolíticas que apresentaram baixa ou nenhuma atividade podem ser intracelulares, sendo liberadas apenas após a lise celular (McSWEENEY, 2004), e devido ao baixo tempo de incubação utilizado no protocolo analítico (4 horas), não foi possível detectar a atividade dessas enzimas.

A PepX normalmente é encontrada em muitas BAL mesofílicas e termofílicas, enquanto a PepN e PepC estão tipicamente associadas com *L. helveticus* e *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. A PepL poderia ser representativa da atividade de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (GATTI et al., 2008).

Gatti e colaboradores (2004) verificaram a atividade de aminopeptidases para diferentes espécies de lactobacilos e encontrou a maior atividade para PepX, diferente do encontrado no presente estudo. A PepX é uma aminopeptidase encontrada de forma ativa em todas as espécies de BAL (KUNJI et al., 1996; GATTI et al., 2004) e sua atividade pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: valor de pH, temperatura, teor de sal e umidade (GATTI et al., 2008).

A degradação de peptídeos pelas aminopeptidases, leva à formação de aminoácidos, tais como leucina, valina, fenilalanina ou metionina, e compostos voláteis, tais como, aldeídos, álcoois e ácidos (Figura 2, citada anteriormente), que podem ser percebidos mesmo em baixas concentrações, o que faz com que possuam importante papel na formação do aroma de produtos fermentados (PAPAMANOLI et al., 2003). Estas enzimas também podem atuar na redução do amargor durante a maturação de queijos (HERREROS et al., 2003).

Tabela 6: Atividade de aminopeptidases de BAL termófilas (*S. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*).

Cultura	Cepa	Aminopeptidase (AE)			
		Pep N	Pep C	Pep L	Pep X
<i>S. thermophilus</i>	SJRP107	30,98	31,05	7,85	11,99
<i>Lb. helveticus</i>	SJRP56	31,53	27,84	6,98	13,84
	SJRP191	34,33	30,62	7,10	9,24
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	SJRP49	29,41	24,07	6,64	13,82
	SJRP57	29,87	23,23	7,83	13,66
	SJRP149	30,62	30,04	7,15	12,30

5.2.2. Cinética de acidificação

A acidificação das cepas de *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentaram perfis distintos, mesmo para micro-organismos da mesma espécie, conforme mostram as Figuras 12, 13 e 14 respectivamente. Os parâmetros cinéticos (Tabela 7) calculados a partir dos dados gerados pelo sistema CINAC indicam a velocidade máxima de acidificação ($V_{\max}$), o tempo necessário para atingir a velocidade máxima ($t_{\max}$), o pH em que a velocidade máxima foi atingida ($\text{pH}_{V_{\max}}$), o tempo necessário para atingir pH 5,0 ($t_{\text{pH}=5,0}$) e o tempo necessário para atingir a diferença de 0,4 unidades de pH com relação ao pH inicial.

A taxa de acidificação de BAL é um critério importante para o desenvolvimento de produtos fermentados como queijos e iogurtes (HAN et al., 2014). Para a produção de queijo Parmesão, por exemplo, é necessária a escolha de culturas lácticas que, inicialmente acidifiquem moderadamente e, posteriormente, realizem a proteólise, caracterizando uma boa maturação (FURTADO, 2011a).

Quarenta e três por cento (3/7) das cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e 40% (2/5) das de *S. thermophilus* foram classificadas como rápidas, enquanto todas as cepas de *Lb. helveticus* demonstraram média atividade acidificante. Nenhuma das cepas analisadas apresentou perfil lento de acidificação. É muito importante o decréscimo rápido do pH durante as primeiras etapas de preparação de alguns tipos de queijos, uma vez que o meio ácido ajuda na coagulação e na

prevenção ou redução do crescimento de uma microflora indesejada (AYAD et al., 2004).

As cepas que possuem perfil de acidificação rápida provavelmente são menos exigentes nutricionalmente, ou apresentam sistema proteolítico mais eficiente, ou ainda, são mais adaptadas ao leite como substrato (GATTI et al., 1999).

Para a determinação da cinética de acidificação de *S. thermophilus* utilizou-se a cultura comercial de *S. thermophilus* TA040 (Danisco, Dangé-Saint-Romain, França) como controle, a qual demonstrou o melhor desempenho dentre todas as cepas, apresentando a maior velocidade máxima e o menor tempo para atingir pH 5,0. No entanto, a cepa SJRP107 apresentou perfil muito próximo ao da comercial (Figura 12), o que a faz uma cepa com características potenciais para utilização industrial. A identificação e seleção de novas cepas que detenham propriedades potenciais para uso industrial é de relevante importância para o aumento da diversidade de culturas de BAL disponíveis para produção de queijos e produtos lácteos.

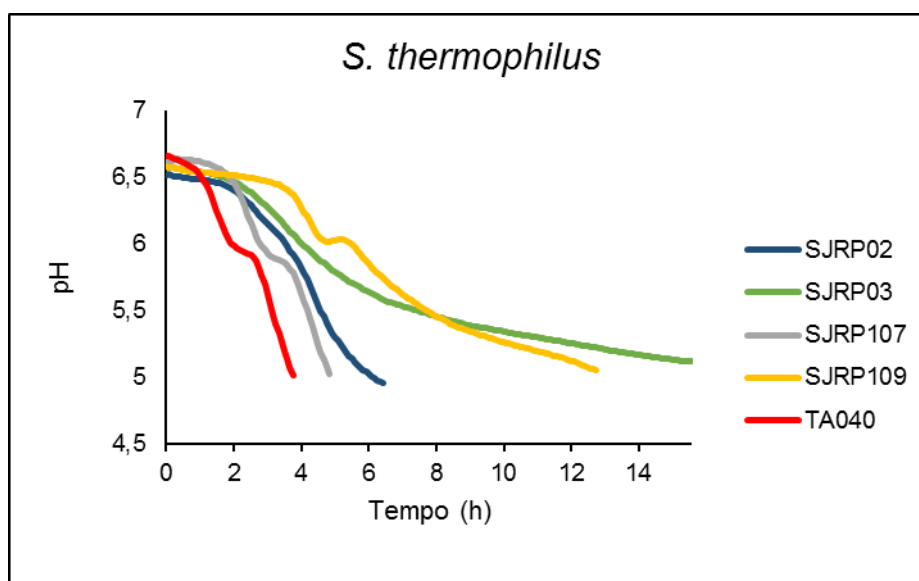


Figura 12: Perfil de acidificação de cepas autóctones e comercial de *S. thermophilus*. TA040: controle positivo (Danisco, Dangé-Saint-Romain, França).

Ainda para o grupo dos *S. thermophilus*, houve grande variação de comportamento entre as cepas testadas, com tempo de fermentação variando de 4 horas e 13 minutos (cultura comercial TA040) a 18 horas e 23 minutos (SJRP03). Esta diferença no comportamento de cepas da mesma espécie também foi

encontrada em estudo realizado por Setachaimongkon e colaboradores (2014), em que uma cepa proteolítica de *S. thermophilus* apresentou maior velocidade de acidificação em relação a outra cepa não proteolítica.

As cepas de *Lb. helveticus* SJRP56 e SJRP191 apresentaram perfis de acidificação diferentes (Figura 13), sendo que *Lb. helveticus* SJRP191 obteve taxa de fermentação mais constante, enquanto *Lb. helveticus* SJRP56 demonstrou rápido declínio de pH no começo do processo fermentativo e, posteriormente, menor atividade de acidificação.

Os *Lb. helveticus* são as BAL mais utilizadas para a produção de queijo Parmesão, sendo adicionados ao leite como cultura pura ou na forma de soro fermento, e predominam na microbiota do queijo. Sua principal contribuição para a qualidade deste tipo de queijo está relacionada com seu eficiente sistema proteolítico durante a maturação e sua capacidade de metabolizar a lactose após a produção do queijo, evitando o escurecimento não enzimático. Em vista disso, a utilização de *Lb. helveticus* torna-se determinante para a obtenção das características típicas de textura, sabor e aroma, além da coloração amarelo-pálida do Parmesão (FURTADO, 2011a). Sendo assim, embora as cepas analisadas possuam perfis cinéticos diferentes, sob o ponto de vista de produção de ácido, ambas poderiam compor a cultura lática utilizada na produção de queijo Parmesão.

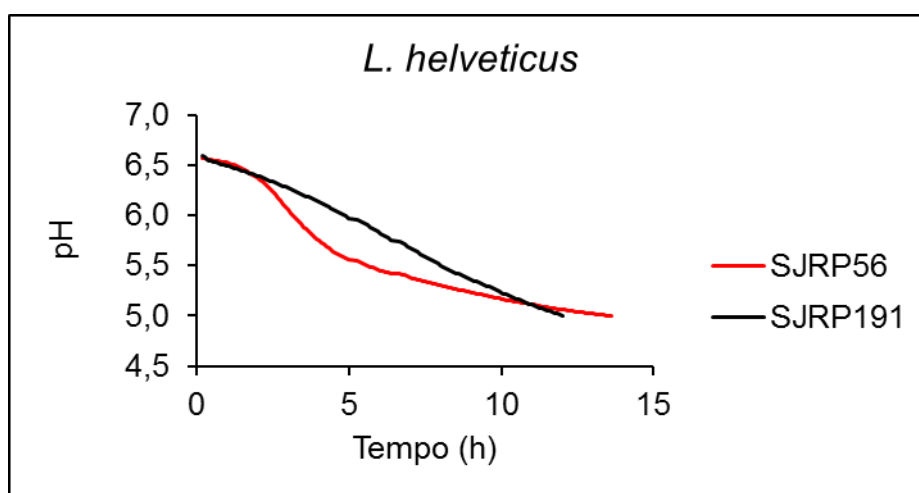


Figura 13: Perfil de acidificação de cepas autóctones de *Lb. helveticus*.

As cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentaram perfil de acidificação semelhante (Figura 14), porém com tempo de fermentação variando de 5 horas e 46 minutos a 14 horas e 12 minutos. Quando presentes no leite

juntamente com *S. thermophilus*, atuam em simbiose, na qual o *S. thermophilus* produz ácido mais rapidamente, reduzindo o pH do leite a um valor ótimo para o crescimento de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Este, por sua vez, possui sistema proteolítico mais eficiente e degrada a caseína e peptídeos presentes no meio, fornecendo outros peptídeos e aminoácidos livres necessários para o crescimento do *S. thermophilus* (SETACHAIMONGKON et al., 2014).

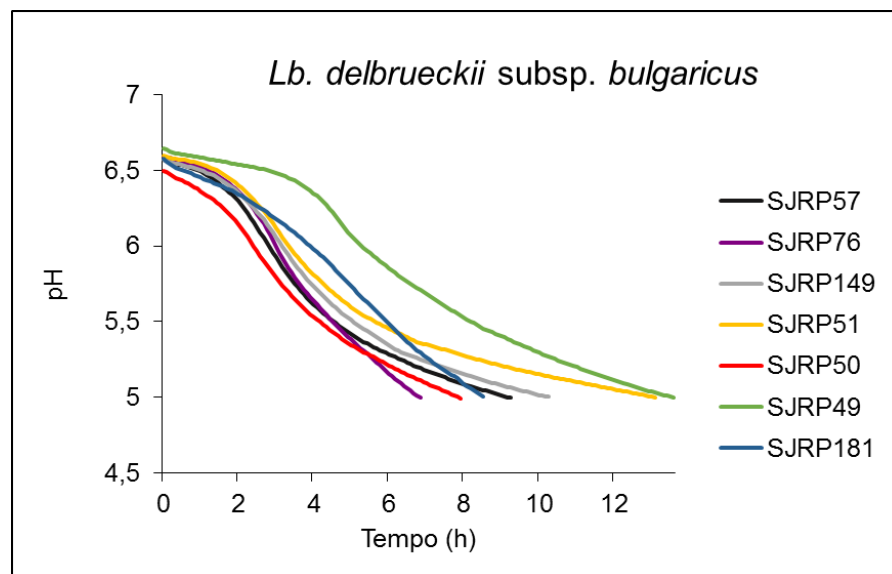


Figura 14: Perfil de acidificação de cepas autóctones de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Tabela 7: Parâmetros da cinética de acidificação de cepas de BAL termófilas (*S. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*).

Cultura	Cepa	pH inicial	Vmax (10 ⁻³ upH/min)	t _{vmax} (h)	pH _{vmax}	t _{pH5,0} (h)	t _{ΔpH=0,4}	Classificação
<i>S. thermophilus</i>	SJRP02	6,52	09,49 (±0,57)	4h33min (±0,00)	5,69 (±0,02)	06h21min (±0,18)	3h25min	Médio
	SJRP03	6,58	06,19 (±0,03)	3h42min (±0,00)	6,18 (±0,02)	18h23min (±0,17)	3h50min	Médio
	SJRP107	6,62	13,23 (±0,71)	4h25min (±0,11)	5,51 (±0,02)	05h32min (±0,12)	2h50min	Rápido
	SJRP109	6,58	07,47 (±0,24)	4h02min (±0,08)	6,23 (±0,02)	13h00min (±0,47)	4h25min	Médio
	Controle	6,66	15,23 (±0,58)	3h21min (±0,41)	5,50 (0,26)	4h13min (±0,42)	1h58min	Rápido
<i>Lb. helveticus</i>	SJRP56	6,57	06,03 (±0,00)	2h67min (±0,00)	6,14 (±0,02)	13h04min (±0,41)	3h15min	Médio
	SJRP191	6,58	03,21 (±0,20)	6h09min (±0,47)	5,77 (±0,03)	12h11min (±0,18)	4h07min	Médio
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	SJRP49	6,64	05,27 (±0,01)	4h75min (±0,00)	6,20 (±0,04)	13h59min (±0,23)	4h58min	Médio
	SJRP50	6,52	06,55 (±0,40)	2h55min (±0,18)	6,01 (±0,08)	08h30min (±0,53)	2h33min	Rápido
	SJRP51	6,59	05,97 (±0,66)	3h13min (±0,06)	6,13 (±0,01)	14h12min (±1,83)	3h00min	Rápido
	SJRP57	6,56	06,61 (±0,90)	2h67min (±0,12)	6,09 (±0,02)	09h25min (±1,90)	2h58min	Rápido
	SJRP76	6,58	07,82 (±0,16)	3h28min (±0,66)	6,05 (±0,07)	05h46min (±1,36)	3h13min	Médio
	SJRP149	6,57	06,07 (±0,03)	3h17min (±0,02)	6,05 (±0,00)	10h42min (±0,23)	3h23min	Médio
	SJRP181	6,57	04,78 (±0,71)	6h03min (±1,35)	5,65 (±0,15)	09h32min (±1,18)	3h16min	Médio

5.2.3. Perfil de hidrólise proteica

A avaliação da capacidade de hidrólise proteica foi realizada para as cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP49 e SJRP57, *Lb. helveticus* SJRP56 e SJRP191, e *S. thermophilus* SJRP107.

A partir do gel (Figura 15) obtido pela análise de eletroforese, não foi possível observar diferenças no perfil de hidrólise proteica entre as culturas testadas. Todas as culturas hidrolisaram a caseína com a formação das frações α_{s1} -caseína e β -caseína, quando comparado com o padrão de caseína (PC). Sendo assim, esta análise não contribuiu para a seleção das cepas que seriam utilizadas na fabricação dos queijos.

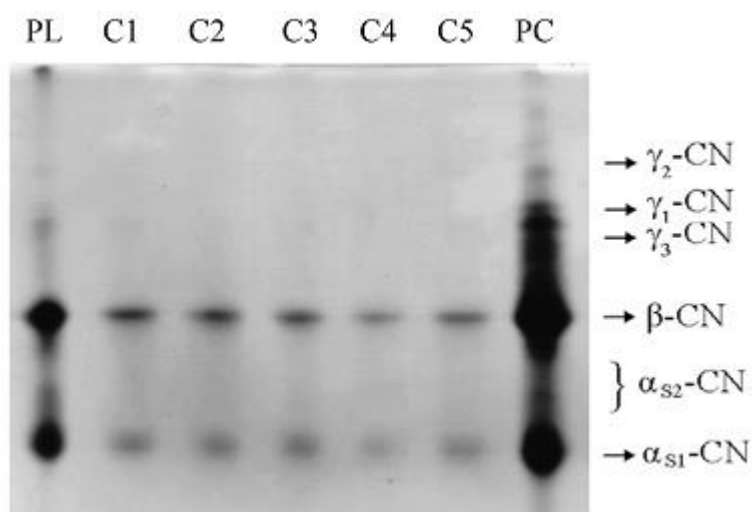


Figura 15: Perfil de hidrólise da caseína por ação das culturas lácticas. PL: Padrão de leite; C1: cultura de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP49; C2: cultura de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57; C3: cultura de *Lb. helveticus* SJRP56; C4: *Lb. helveticus* SJRP191; C5: cultura de *S. thermophilus* SJRP107; PC: Padrão de caseína.

5.2.4. Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Todas as cepas foram produtoras de EPS (Tabela 8), com variação de 34,9 a 62,2 (mg/10 mL meio), utilizando-se os meios M17 para os *S. thermophilus* e MRS para os *Lactobacillus*. De acordo com Petry e colaboradores (2000), o meio de

fermentação influencia a produção de EPS por BAL. Sendo assim, não é possível comparar cepas de *S. thermophilus* e *Lactobacillus*. Entretanto, as cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentaram maior produção de EPS quando comparadas com as de *Lb. helveticus*, as quais foram submetidas às mesmas condições. Para a complementação dos resultados, a análise pode ser realizada utilizando-se leite desnatado reconstituído, adicionado ou não de uma fonte de carbono, a fim de obter informações adicionais sobre a produção de EPS em produtos lácteos.

Grandi (2010) estudou a produção de EPS por cepas autóctones de *L. helveticus*, e obteve uma produção de 70,04 mg de EPS/10mL de meio suplementado com 2% de glicose. A produção de EPS é quase sempre favorecida por temperaturas mais baixas de incubação, pelo pH próximo da neutralidade (6,0 a 7,0) ou por uma alta taxa de carbono/nitrogênio (GRANDI, 2010). Sendo assim, os valores de EPS produzidos por *L. helveticus* neste estudo (Tabela 8) encontram-se de acordo com o esperado, uma vez que apresentaram-se inferiores àqueles cujo meio foi suplementado com uma fonte de carbono.

No entanto, pela técnica proposta, obteve-se um extrato bruto rico em carboidratos, mas também contendo proteínas, sendo necessária sua precipitação para se obter dados mais precisos do teor de EPS produzido.

Os EPS produzidos por BAL são geralmente considerados de grau alimentício e são produzidos naturalmente. Além disso, fornecem comprovada contribuição à viscosidade e textura de iogurtes e de alguns tipos de queijos, prevenindo a sinérese. Os EPS produzidos por BAL podem também substituir amidos modificados quimicamente ou a gordura do leite em iogurtes comerciais. Adicionalmente, tem sido relatado que alguns EPS possuem importantes características prebióticas, tais como propriedades imunoestimulativas, efeitos antioxidantes e atividade antimicrobiana contra patógenos (WU et al., 2014).

Os EPS produzidos por BAL ainda podem ajudar no controle da produção de biofilme por bactérias patogênicas, considerado um grande problema nas indústrias. Em função da dificuldade de erradicação desses micro-organismos, se tornam fontes de contaminação dos produtos (LI et al. 2014).

Tabela 8: Produção EPS de cepas de bactérias acidoláticas termófilas.

Cultura	Cepa	EPS (mg/10mL meio)
<i>S. thermophilus</i>	SJRP02	40,1
	SJRP03	34,9
	SJRP107	34,9
	SJRP109	37,0
<i>Lb. helveticus</i>	SJRP56	47,3
	SJRP191	46,0
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp.	SJRP49	57,7
<i>bulgaricus</i>	SJRP50	50,1
	SJRP51	62,2
	SJRP57	52,1
	SJRP76	54,0
	SJRP149	50,9
	SJRP181	61,3

5.3. Produção queijo Parmesão

A partir da caracterização de segurança e tecnológica, as cepas de *Lb. helveticus* SJRP56 e SJRP191, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57 e *S. thermophilus* SJRP107 foram selecionadas e aplicadas na produção de queijo Parmesão.

5.3.1. Determinação do rendimento

Para a produção das amostras de queijo, foram utilizados 300 litros de leite, gerando 23,95 Kg de queijo. Sendo assim, tem-se que o rendimento do queijo Parmesão foi de 12,53 litros de leite por quilo de queijo.

5.3.2. Caracterização físico-química do queijo Parmesão

5.3.2.1. Composição centesimal

No primeiro dia de maturação, fez-se a determinação da composição centesimal do queijo e os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 9. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos (Portaria 146/1996), para ser classificado como Parmesão, o queijo deve possuir de 25 a 44,9% de gordura no extrato seco (GES) (BRASIL, 1996), sendo assim, o queijo produzido com cultura autóctone atendeu aos padrões exigidos pela legislação em relação a este parâmetro, uma vez que o valor de GES calculado foi de $43,6 \pm 1,3\%$.

Tabela 9: Composição centesimal do queijo Parmesão (1 dia de maturação).

Parâmetro	Valor* (%)
Umidade	$36,59 \pm 0,26$
Proteína	$30,29 \pm 1,63$
Gordura	$27,7 \pm 0,8$
Cinzas	$4,66 \pm 0,16$
Sal	$2,02 \pm 0,28$

*Os valores referem-se a média de dados obtidos em triplicata.

5.3.2.2. Acompanhamento das características físico-químicas durante o período de maturação

Durante o período de maturação, a cada 30 dias, determinou-se as características físico-químicas, descritas na Tabela 10. O teor de umidade reduziu significativamente a cada mês de maturação, variando de 36,59 a 26,85% entre 1 e 120 dias de maturação. Com 150 dias, houve um aumento do valor de umidade, voltando a cair com 180 dias. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos (Portaria 146/1996), o Parmesão pode ter umidade máxima igual a 35,9%, quando completamente maturado (BRASIL, 1996). Sendo assim, a partir do 30º dia de maturação, o queijo já obedecia às normas estabelecidas.

A relação N_{TCA}/NT expressa o índice de proteólise, uma vez que N_{TCA} indica o teor de nitrogênio não proteico presente na amostra. A partir da Tabela 10, vê-se que houve aumento do valor obtido por essa relação durante todo o período de maturação. A medida que ocorre a hidrólise da caseína em peptídeos e estes em aminoácidos, aumenta-se a quantidade de nitrogênio não proteico na amostra. Estes peptídeos possuem grande importância no desenvolvimento de sabor e aroma característicos dos queijos (BROADBENT et al., 2011).

A relação entre $NS_{pH4,6}/NT$ também é um indicador da proteólise uma vez que $NS_{pH4,6}$ indica o teor de nitrogênio não caseico, que devido à hidrólise da caseína, tende a aumentar durante o período de maturação. Observa-se o aumento desta relação mês a mês (Tabela 10). Este aumento é um bom indicador da atividade proteolítica devido à ação do agente coagulante, onde são determinados os peptídeos de peso molecular alto e médio provenientes das α e β -caseínas, podendo também estar incluídos peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos (BARROS, 2009).

A acidez do queijo possui grande relevância para assegurar o desenvolvimento da microbiota láctica, além de favorecer as diferentes reações enzimáticas durante o período de maturação do queijo (BARROS et al., 2011; SALÄUN, MIETTONB, GAUCHERON, 2005). O teor de acidez não variou significativamente ($p>0,5$) entre 1 e 30 dias de maturação, indicando uma acidificação mais lenta neste período. No entanto, a partir de 30 dias, houve aumento significativo até 90 dias de maturação, com posterior redução, não diferenciando-se entre 90 e 120 dias, e posteriormente entre 150 e 180 dias.

Apesar dos valores de pH terem apresentado variação significativa durante o período de 180 dias, estas variações foram pequenas (5,22 a 5,36) e podem ser considerados aceitáveis no processo industrial, uma vez que normalmente ocorrem variações pela heterogeneidade das peças dos queijos.

Tabela 10: Características físico-químicas do queijo Parmesão ao longo da maturação.

Parâmetro	Tempo de maturação (dias)						
	1	30	60	90	120	150	180
Umidade (%)	36,59 ± 0,26 ^A	33,19 ± 0,60 ^B	31,94 ± 0,66 ^C	29,78 ± 0,95 ^D	26,85 ± 0,12 ^F	28,43 ± 1,29 ^E	27,01 ± 0,37 ^F
N _{TCA} /NT (%)	0,2	0,8	1,4	1,6	2,2	2,6	2,7
NS _{pH4,6} /NT (%)	0,5	2,0	2,7	2,8	3,4	3,8	4,3
Acidez (%)	0,37 ± 0,01 ^A	0,51 ± 0,02 ^A	1,03 ± 0,02 ^B	1,40 ± 0,22 ^C	1,47 ± 0,15 ^C	2,16 ± 0,34 ^D	2,43 ± 0,18 ^D
pH	5,25 ± 0,02 ^B	5,29 ± 0,08 ^{AB}	5,36 ± 0,04 ^A	5,25 ± 0,07 ^B	5,35 ± 0,05 ^A	5,22 ± 0,09 ^B	5,36 ± 0,02 ^A

N_{TCA}: nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético; NS_{pH4,6}: nitrogênio solúvel em pH 4,6. NT: nitrogênio total. A, B, C, D Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05).

5.3.3. Análise do perfil de hidrólise proteica no queijo

A proteólise é o evento mais complexo e, para algumas variedades de queijos, o evento bioquímico de maior importância que ocorre durante a maturação. Em muitas variedades de queijos, a hidrólise inicial da caseína é causada pela ação do coagulante e, em menor grau, pela plasmina ou proteinases de células somáticas que podem estar presentes no leite, resultando na formação de peptídeos grandes e médios, os quais, por sua vez continuam sofrendo a ação do coagulante mas também são hidrolisados por enzimas de culturas iniciadoras e não-iniciadoras presentes no queijo. A produção de pequenos peptídeos ocorre devido à ação de proteinases microbianas, enquanto que a atuação de aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases, que são intracelulares, é responsável pela formação de aminoácidos livres, após a lise celular (McSWEENEY, 2004).

Pode-se observar a evolução da maturação do queijo Parmesão (Figura 16). Nota-se que há diminuição da fração de β -caseína (β -CN), cujos principais produtos de degradação são as frações γ_1 , γ_2 e γ_3 -caseína (γ_1 , γ_2 e γ_3 -CN), que, por sua vez, apresentaram aumento da intensidade da coloração ao decorrer do tempo, indicando aumento da concentração. Também pode-se observar a diminuição da fração de α -caseína (α -CN) que tem como principal produto a α_{s1} -I-caseína (α_{s1} -I-CN). O surgimento da fração α_{s1} -I-CN-9P (f24-199) em queijos é característico da proteólise primária, indicando possível ação residual do coalho (BARROS, 2009).

Os resultados encontrados são semelhantes aos observados em estudos de maturação de queijos duros por aplicação da eletroforese em gel de Ureia-PAGE (SIHUFE, ZORRILLA, RUBIOLO, 2010; MAYER, 1996). Além disso, os dados obtidos nesta análise estão coerentes com os obtidos na análise físico química (Tabela 10), na qual verificou-se aumento da hidrólise proteica pelo aumento da relação entre nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético e nitrogênio total.

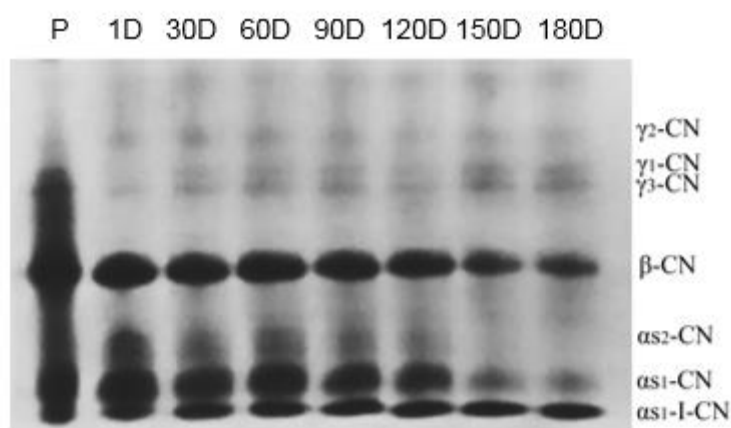


Figura 16: Gel de eletroforese obtido a partir das amostras de queijo durante o período de maturação. P - padrão de caseína; D - dias de maturação.

5.3.4. Avaliação microbiológica

O queijo produzido com as culturas autóctones atendeu ao Padrão Microbiológico para Alimentos (RDC 12 – BRASIL, 2001), apresentando valor $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g para estafilococos coagulase positiva, 0,0 NMP/g para coliformes termotolerantes, e ausência de *Salmonella* em 25 g de amostra, conforme mostra o laudo analítico (Anexo 1).

6. CONCLUSÕES

- As cepas de *Lb. helveticus* SJRP56 e SJRP191, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57, e *S. thermophilus* SJRP107 foram consideradas seguras e apresentaram boas características tecnológicas para aplicação em alimentos, especialmente queijo Parmesão;
- O queijo Parmesão produzido com as culturas autóctones apresentou características típicas desse queijo, demonstrando a aplicabilidade dessas cepas no produto;
- Os resultados demonstraram o potencial de aplicação das cepas selvagens para a produção em larga escala, não apenas representando um aumento da diversidade de BAL para uso comercial, mas também ampliando as possibilidades de aplicação dessas culturas em outros produtos lácteos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIMPONG, D. B. et al. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 75, p. 1-12, 2012.

AHMADOVA, A. et al. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 631-641, 2013.

AMMOR, M. S.; BELÉN FLÓREZ, A.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 559-570, 2007.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Dairy Products. In: **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington, 1997.

AYAD, E. H. E. et al. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 715-725, 2004.

BARROS, J. J. C. **Estudo *in situ* de culturas autóctones de *Lactobacillus helveticus* autolíticos sobre a dinâmica bioquímica e sensorial do queijo Parmesão**. 2009. 106 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

BARROS, J. J. C. et al. Queijo Parmesão: caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 285-294, 2011.

BEHLING, M. C. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278-285, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de Jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 7 de Março de 1996. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF. 7 Mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 353 de 4 de Setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Parmesão, Parmesano, Reggiano, Reggianito e Sbrinz. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF. 4 Set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12 de Dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 Dez. 2006.

BROADBENT, J. R. et al., Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4313-4328, 2011.

CALZADA, J. et al. Reducing biogenic-amine-producing bacteria, decarboxylase activity, and biogenic amines in raw milk cheese by high-pressure treatments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1277-1283, 2013.

CARDOZO, M. et al. Aminas biogênicas: um problema de saúde pública. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 149-168, 2013.

CHOI, J. et al. Bioactive peptides in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 1-12, 2012.

COURVALIN, P. Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, n. 2, p. 261-265, 2006.

CRETI, R. et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 13-20, 2004.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; SINDEREN, D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 93-109, 2013.

DABEK, M. et al. Distribution of β -glucosidase and β -glucuronidase activity and of β -glucuronidase gene *gus* in human colonic bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 3 p. 487-495, 2008.

DE LAS RIVAS, B.; MARCOBAL, A.; MUÑOZ, R. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, n. 2, p. 367-372, 2005.

DE PAULA, A. T. et al. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo Mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 899-910, 2014.

DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 274-277, 2008.

DONKOR, O. N.; SHAH, N. P. Production of β -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 1, p. 15-20, 2008.

DRAGO, L. et al. Phenotypic and genotypic antibiotic resistance in some probiotics proposed for medical use. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 4, p. 396-397, 2013.

FOLKENBERG, D. M. et al. Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 2, p. 111-118, 2006.

FOULQUIE'-MORENO, M. R. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

FRANZ, C. M. A. P. et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 125-140, 2011.

FURTADO, M. M. Fundamentos originais dos queijos grana italianos. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 66, n. 378, p. 40-50, 2011b.

FURTADO, M. M. **Queijos duros**. São Paulo: Ed. Setembro, 2011a.

GARAI, G. et al. Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 73-78, 2007.

GATTI, M. et al. A model to assess lactic acid bacteria aminopeptidase activities in Parmigiano Reggiano cheese during ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 11, p. 4129-4137, 2008.

GATTI, M. et al. Biodiversity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 182-190, 2004.

GATTI, M. et al. Relationship between acidification capacity on milk, presence of yeast extract, proteolytic and peptidase activities in *Lactobacillus helveticus* species. **Microbiologie, aliments, nutrition: the journal of the International College Alexandre Tessier**, v. 17, n. 1, p. 23-31, 1999.

GATTI, M., CONTARINI, G., NEVIANI, E. Effectiveness of chemometric techniques in discrimination of *Lactobacillus helveticus* biotypes from natural dairy starter cultures on the basis of phenotypic characteristics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1450-1454, 1999.

GIRAFFA, G. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 391-398, 2012.

GRANDI, A. Z. **Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus* autóctone isolado de soro-fermento natural**. 2010. 56 f. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

GRIFFITHS, M. W.; TELLEZ, A. M. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. **Frontiers in Food Microbiology**, v. 4, n. 30, p. 1-9, 2013.

GROSU-TUDOR, S. S. et al. Isolation of novel homopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from Romanian raw milk and fermented dairy products. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 4, p. 609-615, 2013.

HEBERT, E. M.; RAYA, R. R.; GIORI, G. S. Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5316-5321, 2000.

HERREROS, M. A. et al. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 469-479, 2003.

HOU, J. C. et al. Effect of culturing conditions on the expression of key enzymes in the proteolytic system of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 16, n. 4, p. 317-326, 2015.

HUMMEL, A. S. et al. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 730-739, 2007.

IYER, R. et al. *Streptococcus termophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 3, p. 133-141, 2010.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B. O. **Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

JOSHI, S.R.; KOIJAM, K. Exopolysaccharide production by a lactic acid bacteria, *leuconostoc lactis* isolated from ethnically fermented beverage. **National Academy Science Letters**, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.

KARAPETKOV, N. et al. Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains. **Beneficial Microbes**, v. 2, n. 4, p. 335-339, 2011.

KENNY, O. et al. Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 7, p. 509-516, 2003.

KILCAWLEY, K. N.; WILKINSON, M. G.; FOX, P. F. Determination of key activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 310-320, 2002.

KUNJI, E. R. S. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 70, n. 2-4, p. 187-221, 1996.

LI, W. et al. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P1, p. 732-739, 2014.

LINARES, D. M. et al. Biogenic amines in dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 7, p. 691-703, 2011.

LIU, E. et al. A model of proteolysis and amino acid biosynthesis for *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in whey. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 742-751, 2012.

LOIZZO, M. R. et al. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 38-55, 2013.

LORENCOVÁ, E. et al., Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2086-2091, 2012.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARTIN-PLATERO, A. M. et al. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 1, p. 24-32, 2009.

MAYER, H. K. Electrophoretic ripening index for the evaluation of proteolysis and the deduction of the age of Parmesan cheese. **European Food Research and Technology**, v. 202, n. 6, p. 465-470, 1996.

McSWEENEY, P. L. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p. 127-144, 2004.

MERHEB-DINI, C. et al. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 859-865, 2012.

MICHLMAYR, H.; KNEIFEL, K. β -glucosidase activities of lactic acid bacteria: mechanisms, impact on fermented food and human health. **FEMS Microbiology Letters**, v. 352, n. 1, p. 1-10, 2014.

MORANDI, S.; SILVETTI, T.; BRASCA, M. Biotechnological and safety Characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 103, n. 1, p. 239-249, 2013.

MRVCIC, J. et al. Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 2771-2782, 2012.

NEVIANI, E. et al. New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: the case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. **Frontiers in Food Microbiology**, v. 4, n. 36, p. 1-14, 2013.

PANESAR, P. S. et al. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 530-543, 2006.

PAPAMANOLI, E. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v. 65, n. 2, p. 859-867, 2003.

PERIN, L. M. et al., 2014. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 121-126, 2014.

PESCUMA, M. et al. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 442-451, 2008.

PETRY, S. et al. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3427-3431, 2000.

RAMCHANDRAN, L.; SHAH, N. P. Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and α -glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. 75-81, 2008.

REIS, J. a et al., Probióticos e seus efeitos terapêuticos na saúde humana. São José do Rio Preto: Cultura Acadêmica Editora, 2011.

RUAS-MADIEDO, P.; REYES-GAVILÁN, C. G. Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 3, p. 843-856, 2005.

SALÄUN, F.; MIETTONB, B.; GAUCHERON, F. Buffering capacity of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 22, p. 95-109, 2005.

SETACHAIMONGKON, S. et al. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus on the metabolite profile of set-yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 29-36, 2014.

SHARMA, P. et al. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Research International**, v. 57, p. 176-195, 2014.

SIHUFE, G. A.; ZORRILLA, S. E.; RUBIOLO, A. C. The influence of ripening temperature and sampling site on the proteolysis in Reggiano Argentino cheese. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 247-253, 2010.

SILVA, L. F. **Avaliação da evolução da microbiota láctica autóctone isolada de queijo Mussarela de búfala**. 2015. 149 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2015.

SILVA, L. F. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de búfala**. 2010. 153 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

SLATTERY, L. et al. Invited review: *Lactobacillus helveticus* – A thermophilic dairy starter related to gut bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4435-4454, 2010.

STEELE, J.; BROADBENT, J.; KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 135-141, 2013.

TAVERNITI, V.; GUGLIELMETTI, S. Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 392, p. 1-13, 2012.

TEN BRINK, B. et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 73-84, 1990.

TOSI, L. et al. Susceptibility of *Streptococcus thermophilus* to antibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 21-28, 2007.

UMAMAHESWARI, T. et al. *Streptococcus thermophilus* strains of plant origin as dairy starters: Isolation and characterisation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 1, p. 117-122, 2014.

VANKERCKHOVEN, V. et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4473-4479, 2004.

VANKERCKHOVEN, V. et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence

determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4473-4479, 2004.

VASILJEVIC, T.; JELEN, P. Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude β -galactosidase extracts from *Lactobacillus bulgaricus* 11842. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, n. 2, p. 175-184, 2002.

VON MOLLENDORFF, J. W.; TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Factors affecting the adsorption of bacteriocins to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus sp.* **Applied Biochememistry and Biotechnology**, v. 142, n.2, p. 209-220, 2007.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Boletim do Leite**, São Paulo, v. 56, n. 61, p. 1-8, 1983.

WU, Q. et al. Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. **Scientific Reports**, v. 4, n. 4974, p. 1-7, 2014.

YOUN, S.Y.; PARK, M.S.; JI, G.E. Identification of the β -glucosidase gene from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and its expression in *B. bifidum* BGN4. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n.12, p. 1714-1723, 2012.

ZHANG, H. et al. The association of biofilm formation with antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented foods. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 2, p. 114-120, 2013.

ZHENG, Z. et al. Effects of fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, refrigeration and simulated gastrointestinal digestion on the antigenicity of four milk proteins. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 3, p. 1106-1112, 2014.

Anexo 1

Laudo da análise microbiológica do queijo Parmesão



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CENTRO DE LABORATÓRIO REGIONAL X - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
NÚCLEO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS E BROMATOLÓGICAS
Rua: Alberto Sufredine, 2325 - CEP: 15060-020
Fone/Fax: (17) 32242602 - São José do Rio Preto - SP



LAUDO DE ANÁLISE Nº 1856/2015

Unidade Analítica:	MICROBIOLOGIA ALIMENTAR
--------------------	-------------------------

Nome do Ensaio: Pesquisa de coliformes termotolerantes

Referência: Resolução RDC nº 12, de 01/01/2001, da ANVISA/MS - Anexo I – item 8

Resultado: 0,0 NMP/g

Método/Técnica: Número Mais Provável

Conclusão: Satisfatório

Nome do Ensaio: Pesquisa de estafilococos coagulase positiva

Referência: Resolução RDC nº 12, de 01/01/2001, da ANVISA/MS - Anexo I – item 8

Resultado: menor que $1,0 \times 10^2$ UFC/g

Método/Técnica: Contagem em Placas *Spread – Plate*

Conclusão: Satisfatório

Nome do Ensaio: Pesquisa de *Salmonella*

Referência: Resolução RDC nº 12, de 01/01/2001, da ANVISA/MS - Anexo I – item 8

Resultado: Ausência em 25g

Método/Técnica: Presença/Ausência

Conclusão: Satisfatório



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CENTRO DE LABORATÓRIO REGIONAL X - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
NÚCLEO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS E BROMATOLÓGICAS
Rua: Alberto Sufredine, 2325 - CEP: 15060-020
Fone/Fax: (17) 32242602 - São José do Rio Preto - SP



LAUDO DE ANÁLISE Nº 1856/2015

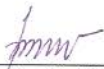
Observações :

- 1 - A avaliação da rotulagem não foi objeto de análise.
 - 2 - Os resultados desta análise têm significação restrita e se aplica tão somente à amostra analisada, não podendo ser utilizados para fins de propaganda.
-

Conclusão: Satisfatório

Complemento da Conclusão: Trata-se de queijo de acordo com a legislação vigente, segundo as determinações realizadas.

São José do Rio Preto, 05 de março de 2015.



Maria do Rosário Viçeta Lopes
PqC III - Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas
RG.13.894.590-1



Jacqueline Tanjiry Macruz Peresi
PqC V/Diretor do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas
RG.11.514.685-4