

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ANA PAULA DE OLIVEIRA
ISABELA DE SOUZA MATTOS

DESENVOLVIMENTO DE LEITE FERMENTADO POR *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus*

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2021

ANA PAULA DE OLIVEIRA
ISABELA DE SOUZA MATTOS

DESENVOLVIMENTO DE LEITE FERMENTADO POR *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus*

DEVELOPMENT OF FERMENTED MILK BY *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus*

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marly Sayuri Katsuda

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Furlaneto Maia

LONDRINA
2021



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es).

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

TERMO DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE LEITE FERMENTADO POR *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus*

ANA PAULA DE OLIVEIRA
ISABELA DE SOUZA MATTOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 12 de maio de 2021 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos e foi avaliado pelos seguintes professores:

Prof^a. Dr^a. Marly Sayuri Katsuda
Prof.(a) Orientador(a)

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Professor Avaliador 1

Prof^a. Dr^a. Mayka Reghiany Pedrao
Professor Avaliador 2

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à nossa orientadora Prof^a. Dr^a. Marly Sayuri Katsuda e co-orientadora Prof^a. Dr^a. Luciana Furlaneto Maia, por terem aceitado conduzir e auxiliar o nosso projeto de pesquisa em todas as tarefas realizadas.

A todo o Departamento Acadêmico de Alimentos, pela dedicação e pelo conhecimento passado a nós.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo espaço concedido para a realização do projeto.

À Débora Pinhatari, Letícia Milani e Veridiana Almeida pela colaboração durante as análises.

Especialmente a Deus pela saúde e força a nós concedida para seguirmos até o fim.

Aos nossos familiares, por todo o apoio e motivação durante toda a nossa trajetória. Em especial ao meu irmão Iraú que me incentivou a ingressar no curso e a minha mãe Ercília por toda ajuda durante esses anos (Isabela). E ao meu marido Leonardo, e aos meus filhos por toda a paciência e incentivo (Ana).

Por fim, agradecemos aos nossos amigos por estarem presentes em todos os momentos, e a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não é a força, mas a constância dos bons resultados que conduz os homens à felicidade” (Friedrich Nietzsche).

RESUMO

Os *E. faecium* compõem uma espécie de bactérias ácido-láticas que podem apresentar propriedades probióticas, além de serem encontrados frequentemente em produtos lácteos fermentados. O leite fermentado é um segmento de produto lácteo com boa aceitação de um amplo segmento de consumidores, além de oferecer diversos benefícios para a saúde. Portanto, este trabalho propôs formular três tipos de leite fermentado por: *E. faecium* (EF), *Lb. helveticus* (LH) e a mistura de *E. faecium* + *Lb. helveticus* (EFLH), visando avaliar o efeito da atividade das culturas lácticas na composição proximal (no tempo inicial e final) e na evolução da acidez titulável e pH ao longo de 28 dias de estocagem a 5°C. Os resultados demonstraram que a composição proximal do leite fermentado por todas as cepas não apresentou diferença estatística no início da estocagem. Aos 28 dias de estocagem houve aumento significativo no teor de extrato seco total e proteína do produto nos três tratamentos. Não houve efeito significativo no teor de cinzas e carboidrato ao longo da estocagem, porém foi observado um aumento significativo de carboidratos somente do leite fermentado por EFLH. O *E. faecium* apresentou maior acidez titulável (0,51 g de ácido láctico/100 g) e menor pH (5,5) no início da estocagem e continuou evoluindo ao longo da estocagem. O *Lactobacillus helveticus* apresentou menor teor de acidez titulável e maior pH. O estudo permitiu concluir que o *Enterococcus faecium* apresentou um bom desempenho tecnológico considerando que é uma cultura autóctone, demonstrando ser promissor para a produção de leite fermentado e novos estudos serão necessários para otimizar a atividade desta cultura na produção de leite fermentado.

Palavras-chave: Composição proximal. Característica físico-química. Acidez titulável. Estocagem.

ABSTRACT

E. faecium is a species of lactic acid bacteria that can have probiotic properties, in addition to being frequently found in fermented dairy products. Fermented milk is a dairy product segment with good acceptance by a wide segment of consumers, in addition to offering several health benefits. Therefore, this work proposed to formulate three types of fermented milk by: *E. faecium* (EF), *Lb. helveticus* (LH) and the mixture of *Enterococcus faecium* + *Lactobacillus helveticus* (EFLH), aiming to evaluate the effect of the activity of lactic cultures on the proximal composition in the initial and final of storage time) and in the evolution of the titratable acidity and pH over 28 days of storage at 5°C. The results demonstrated that the proximate composition of fermented milk for all strains did not present statistical difference at the beginning of storage. At 28 days of storage, there was a significant increase in the total dry matter and protein content of the product. There was no significant effect on the ash and carbohydrate content during storage, but a significant increase in carbohydrates was observed only in milk fermented by EFLH. *Enterococcus faecium* showed higher titratable acidity (0,51g lactic acid /100g) and lower pH (5,5) at the beginning of storage and continued to evolve throughout storage. *Lactobacillus helveticus* demonstrated lower content of titratable acidity and higher pH. The study allowed to conclude that *Enterococcus faecium* presented a good technological performance considering that this is an indigenous culture, proving to be promising for the production of fermented milk and further studies will be necessary to optimize the activity of this culture in the production of fermented milk.

Keywords: Proximal composition. Physico-chemical characteristic. Titratable acidity. Storage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vantagens e desvantagens relacionadas ao emprego de <i>Enterococcus</i> spp. em alimentos.....	15
Figura 2 – Calda com adição das diferentes cepas antes de ir à estufa.....	19
Figura 3 – Desenvolvimento da acidez titulável dos leites fermentados por <i>E. faecium</i> (EF), <i>Lb. helveticus</i> (LH) ou mistura de <i>E. faecium</i> e <i>Lb. helveticus</i> (EFLH) ao longo do tempo de 28 dias de estocagem a 5°C.....	24
Figura 4 – Desenvolvimento do pH dos leites fermentados por <i>E. faecium</i> (EF), <i>Lb. helveticus</i> (LH) ou mistura de <i>E. faecium</i> e <i>Lb. helveticus</i> (EFLH) ao longo do tempo de 28 dias de estocagem a 5°C.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Opções de gêneros para a produção de diferentes tipos de leite fermentado.....	14
Tabela 2 – Composição proximal dos leites fermentados por <i>E. faecium</i> (EF), <i>Lb. helveticus</i> (LH) ou mistura de <i>E. faecium</i> e <i>Lb. helveticus</i> (EFLH) ao longo do tempo de 28 dias de estocagem a 5°C.....	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	12
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	12
3. LEITE FERMENTADO	13
3.1 GRUPO <i>Enterococcus</i> spp.....	14
3.2 <i>Enterococcus</i> EM ALIMENTOS E ESPÉCIE <i>E. faecium</i>	15
3.3 GRUPO <i>Lactobacillus</i>	16
3.4 ESPÉCIE <i>Lactobacillus helveticus</i>	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 MATERIAIS.....	18
4.2 PRODUÇÃO DE LEITE FERMENTADO.....	18
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
4.4 COMPOSIÇÃO PROXIMAL.....	19
4.5 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	20
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE FERMENTADO.....	20
5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	23
6. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

Os leites fermentados são produtos muito conhecidos no setor alimentício que possuem em geral, uma boa aceitação populacional pelos seus diversos benefícios à saúde. Considerando esses fatores, muitos estudos acerca do assunto foram realizados revelando informações significativas a respeito do processamento de tais produtos. Segundo a ANVISA (2008), os leites fermentados podem ser divididos em dois grupos: os que contêm substâncias alimentícias provenientes da coagulação do leite e de sua diminuição do pH, e os que contêm produtos lácteos provenientes da fermentação láctica mediante o cultivo de microrganismos probióticos. Por serem fabricados com bactérias que atuam no funcionamento do intestino, são indicados para tratamentos medicinais em conjunto com os próprios medicamentos, em especial na infância onde a microbiota não está totalmente formada. Entretanto, fatores extrínsecos e intrínsecos como condições de estocagem, acidez, interações entre as espécies e práticas de inoculação das bactérias, podem ter grande influência na sobrevivência desses microrganismos nos produtos lácteos fermentados. Influência essa, considerada fundamental para gerar benefícios fisiológicos no organismo (GALLINA, *et al.* 2011).

De natureza fermentativa, o gênero *Enterococcus* spp. compartilha uma série de características biotecnológicas de grande relevância para a indústria láctea, tais quais produção de enzimas proteolíticas que contribuem com a liberação de peptídeos bioativos com propriedades antimicrobianas, produção de bacteriocinas, propriedades probióticas, entre outras. Desse modo, existem algumas espécies dentro desse gênero que são muito utilizadas em produções de alimentos fermentados como, por exemplo, as linhagens de *E. faecium* (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997).

As *E. faecium* são uma espécie de bactérias ácido-láticas (BAL) com propriedades probióticas capazes de aderir à mucosa do intestino endógeno e produzir substâncias que inibem o crescimento de bactérias indesejáveis. Além disso, são capazes de prevenir algumas doenças como hipercolesterolemia, câncer de cólon e infecções gastrointestinais. São consideradas como microrganismos seguros para a fabricação de produtos lácteos, práticos e úteis, pois não são exigentes nutricionalmente falando, podendo se proliferar rapidamente durante o processamento e conservação do alimento (BRANDALIZE, 2013; GALLINA *et al.*

2011; GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997). Além disso, estudos comprovam que a *E. faecium* possui relevantes propriedades proteolíticas como a atividade de peptidase e de protease, apontando que tais características sejam eficazes para a obtenção de sabor e espessura de leites fermentados (GHRAIRI *et al.*, 2008).

Dentre as bactérias lácticas, outro gênero muito famoso no meio industrial são os *Lactobacillus*. Uma bactéria gram-positiva, produtora de ácido láctico, que apresenta potencial probiótico e inúmeros benefícios ao organismo como, por exemplo, a regularização e equilíbrio da microbiota intestinal, prevenção de constipações, inflamações intestinais, etc. (BURITI; SAAD, 2007). Contudo nem todas as espécies de *Lactobacillus* são consideradas como probióticas como é o caso dos *Lactobacillus helveticus*, que não entram na lista da ANVISA (2017) sobre linhagens aprovadas para potenciais probióticos. Essa linhagem atua como biorreator para a produção de ácido láctico, pois possui caráter fermentativo e contribui positivamente para a inibição de patógenos, para a estimulação do sistema imunológico e para o auxílio da digestão (LEITE, 2006).

Com base nesse contexto, este estudo visou avaliar a capacidade tecnológica do *E. faecium* na produção de leite fermentado associado ou não com *Lb. helveticus* ao longo da estocagem sob refrigeração.

2. OBJETIVO

Avaliar as características físico-químicas do leite fermentado por *E. faecium* e/ou *Lb. helveticus* ao longo do tempo de estocagem.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir um leite fermentado por *E. faecium* e/ou *Lb. helveticus*;
- Analisar a composição proximal dos leites fermentados no tempo inicial e final da estocagem a 5°C;
- Avaliar as características físico-químicas do leite fermentado por cepas das bactérias *E. faecium* e *Lb. helveticus* ao longo do tempo de estocagem.

3. LEITE FERMENTADO

De acordo com os Padrões de Identidade e Qualidade (BRASIL, 2000), leite fermentado é definido como produto constituído ou não de outras substâncias alimentícias, provenientes por coagulação e diminuição do pH do leite natural, ou leite reconstituído, acidificado por bactérias lácticas, resultando em consistência e textura típicas. Segundo a legislação a definição do produto lácteo depende do tipo de cultivo ou microrganismo que será empregado na fermentação, ou seja, de acordo com o cultivo empregado se dá a denominação do produto que pode ser iogurte, leite fermentado, leite acidófilo, kefir, kumys, e/ou coalhada, (BRASIL, 2007).

O método de fabricação dos leites fermentados é visto como simples onde o seu preparo é de alta qualidade com um custo acessível (LEITE, 2016). Além disso, são produtos considerados como pioneiros na área dos funcionais ganhando destaque como fonte de nutrição humana (SANCHÉZ *et al.*, 2009; DONNELLY, 2006). No passado, esse produto era consumido em função da teoria da longevidade onde se acreditava que os indivíduos que consumiram o leite fermentado viveriam mais tempo já que as BALs presentes no produto colonizam o intestino inibindo possíveis patógenos e retardando o processo de envelhecimento (YAMAMOTO, 2016). Atualmente sabe-se que o leite fermentado só passou a ser comprovado como benéfico à saúde já no século XX, após pesquisadores conseguirem explicar cientificamente os efeitos que as bactérias ácido-láticas causam no organismo (SHAH, 2007).

Devido às características físico-químicas do leite fermentado, é possível afirmar que ele é o produto de maior capacidade de transporte de linhagens probióticas quando comparado aos outros produtos alimentícios provenientes da fermentação, como queijos e sorvetes que são de matrizes diferentes (NASCIMENTO, 2017). Na tabela 1 apresentamos os principais tipos de leites fermentados seguidos de suas possíveis culturas lácticas.

Tabela 1 - Opções de gêneros para a produção de diferentes tipos de leite fermentado

LEITE FERMENTADO	GÊNERO
iogurte	<i>Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus</i>
Leite acidófilo	<i>Lactobacillus</i>
Leite fermentado	<i>Lactobacillus, Enterococcus</i>
Kefir	<i>Lactococcus, Lactobacillus</i>
Kumys	<i>Lactobacillus, Saccharomyces</i>

Fonte: Adaptado de Carla A. F. Artilha *et al.* (2019).

3.1 GRUPO *Enterococcus* spp.

Os *Enterococcus* spp. são um grupo de bactérias anaeróbias facultativas, classificadas como cocos isolados, aos pares ou em cadeias curtas, Gram-positivas, catalase-negativa, não esporuladas, ácido tolerantes, possuem reação de oxidase negativa e capacidade de produzir ácido lático. De origem intestinal, compreende, segundo Facklam *et al.* (2002) um total de 16 linhagens: *Enterococcus avium*; *Enterococcus casseliflavus*; *Enterococcus columbae*; *Enterococcus cecorum*; *Enterococcus dispar*; *Enterococcus durans*; *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; *Enterococcus gallinarum*; *Enterococcus hirae*; *Enterococcus malodoratus*; *Enterococcus mundtii*; *Enterococcus pseudoavium*; *Enterococcus raffinosus*; *Enterococcus saccharolyticus*; *Enterococcus sulfureus*, onde as mais estudadas são as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Para serem consideradas probióticas devem ter capacidade de sobreviver durante o trânsito intestinal e colonizar, transitoriamente, o intestino (BRANDALIZE, 2013; NASCIMENTO, 2017). Tais bactérias podem habitar diferentes lugares da natureza como águas, solos, plantas, vegetais, microbiotas e floras intestinais. Sua temperatura de crescimento ideal é de 35°C a 37°C, porém algumas cepas são capazes de se multiplicar entre 10°C e 45°C. Não exigem ambiente controlado para sua multiplicação e a partir do metabolismo de suas cepas com o meio, a fermentação da glicose resulta em ácido lático como principal produto desse processo (Hardie; Whiley, 1997; Gomes, 2007). Além disso, esse gênero de microrganismos se sobressai pela sua velocidade de reprodução se comparados a outros gêneros ácido-láticos. Enquanto as espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* se reproduzem por volta de 60 minutos, algumas espécies de *Enterococcus* como a *E. faecium* tem capacidade de reprodução em 19 minutos, eliminando as floras intestinais patogênicas e possibilitando um impacto benéfico no organismo muito mais rápido (Foulquié Moreno *et al.* 2006; De Paula, 2019). Entre

outras características importantes, vale ressaltar que as *Enterococcus* possuem resistência de até 6,5% a concentrações elevadas de NaCl. Já em relação ao pH, a resistência de suas variações pode chegar a 9,6 segundo Foulquié Moreno *et al.* (2006).

3.2 *Enterococcus spp.* EM ALIMENTOS E ESPÉCIE *E. faecium*

Existem muitas controvérsias quando se trata de *Enterococcus spp.* em alimentos. De acordo com alguns estudos, essas bactérias podem sobreviver e se multiplicar em equipamentos e tanques de laticínios possibilitando contaminações diretas e deteriorações das fabricações posteriores. No entanto, já outros pesquisadores defendem o fato de que este microrganismo seja capaz de desenvolver particularidades sensoriais em queijos e leites fermentados (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Gelsomino *et al.*, 2002; Gomes, 2007). A Figura 1 nos possibilita observar quais as vantagens e desvantagens em se empregar esse grupo de bactérias em alimentos.

Figura 1 - Vantagens e desvantagens relacionadas ao emprego de *Enterococcus spp.* em alimentos

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Cepas probióticas • Cultura fermentadora • Produção de bacteriocinas 	<ul style="list-style-type: none"> • Contaminação direta • Transferência de genes de resistência • Fatores de virulência

Fonte: Adaptado de Bruna Carrer Gomes (2007).

Em específico, as linhagens de *E. faecium* são bastante empregadas em queijos de produções artesanais, segundo Foulquié-Moreno *et al.* (2006) devido a capacidade de metabolizar o citrato tendo por consequência reações bioquímicas como a produção de diacetil, acetaldeído, acetoína, 2-3 butanodiol e dióxido de carbono que atribuem características sensoriais em produtos lácteos.

Vale ressaltar que as *Enterococcus* spp. vão além do uso tecnológico apenas. Em 2008 a espécie *E. faecium* foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para o uso como linhagem probiótica em determinados alimentos, ocasionando uma diminuição significativa dos riscos de doenças intestinais em seres vivos (GOMES, 2007; ANVISA, 2008). Considerada membro natural da microbiota digestiva em humanos, variando em abundância (10^2 a 10^8 UFC/g de conteúdo digestivo) de indivíduo para indivíduo e ao longo do trato gastrointestinal, a *E. faecium* é uma bactéria não patogênica que se destaca por atuar no tratamento de invasões principalmente por rotavírus de maneira mais acentuada que as demais espécies do gênero (BRANDALIZE, 2013; REDONDO, 2008). Tal bactéria vem sendo efetiva na prevenção e no alívio de diversos episódios clínicos evitando problemas como a produção de gás no organismo, acarretando em efeitos osmóticos e quadros envolvendo a proliferação de patógenos e uma possível infecção bacteriana (SAAD, 2006).

3.3 GRUPO *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* spp. são um gênero de bactérias bastonetes tradicionalmente encontrados na microbiota intestinal especificamente no intestino delgado. São ácido-láticas, aeróbias facultativas, gram-positivas, não formadora de esporos, termofílicas, ácido tolerantes e comumente catalase negativa. Capazes de fermentar rapidamente a lactose produzindo ácido lático e deixando o meio ácido que por sua vez, inibe o crescimento de bactérias patogênicas. Em geral, o tempo de reprodução deste gênero é de aproximadamente 60 minutos, e as temperaturas de crescimento estão entre 40°C a 45°C sendo 45°C considerada a temperatura ideal (DELLAGLIO; FELIS, 2005; BERGEY'S, 1975; FIGUEIREDO; PASSOS, 2003; RAFTER, 2003; MELO *et al.*, 2011).

Os *Lactobacillus* spp. podem ser homofermentativos e produzir apenas ácido lático em cerca de 85%, ou, heterofermentativos produzindo além do ácido lático, o CO₂, etanol e ácido acético. Em ambos os casos a bactéria utiliza a glicose como fonte de carbono. Além disso, este gênero compreende um número muito grande de espécies, porém, as com maior reconhecimento para fins alimentares são *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* e *Lb. rhamnosus* (REDONDO, 2008; LEITE, 2006).

3.4 ESPÉCIE *Lactobacillus helveticus*

Dentre as espécies, apesar de não muito comentada no meio alimentício, encontra-se o *Lactobacillus helveticus*. Natural da flora intestinal humana é utilizado na cultura oriental, segundo Tannock, (1999), para a produção de leites fermentados há mais de 30 anos, onde atua na regularização do trânsito intestinal e no tratamento de constipações. Além disso, as culturas de *Lb. helveticus* mostraram-se capazes de produzir peptídeos e aminoácidos livres, que ao serem liberados resultam em atributos importantes como efeitos antimicrobianos contra patógenos e equilíbrio da microbiota. Isso só se torna possível devido à atividade intensa de suas proteases relacionadas à membrana celular e a variedade de peptídeos liberados no leite durante a hidrólise de suas proteínas pelo microrganismo proteolítico como o *Lb. helveticus* (FUGLSANG *et al.*, 2003; TAVERNITI; GUGLIELMETTI, 2012; REDONDO, 2008; GRIFFITHS; TELLEZ, 2013). Tais peptídeos são provenientes da caseína, que ao ser fermentada, é convertida em moléculas denominadas peptídeos bioativos (MATAR *et al.*, 1996).

Sabe-se que o sistema proteolítico do *Lb. helveticus* já foi muito estudado, pois apresenta eficácia ao reduzir o amargor de queijos e liberar peptídeos no decorrer da fermentação (KIPLI, 2077; FERNÁNDEZ *et al.*, 1994). De acordo com Griffiths e Tellez (2013), há dois importantes fatores no sistema proteolítico dos *Lactobacillus helveticus*, a proteinase e a peptidase. A proteinase ocorre com a hidrólise da caseína por meio de um envelope celular capaz de degradar a proteína em oligopeptídeos. Já a peptidase está ligada à hidrólise de peptídeos resultando na liberação de aminoácidos essenciais, sendo utilizado para beneficiar funções fisiológicas de acordo com a sequência desses aminoácidos. Entre os benefícios se encontram os peptídeos imunoestimulantes, antimicrobianos, anti-hipertensivos, entre outros (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para a produção do leite fermentado foi utilizado leite em pó desnatado da marca Molico e sacarose comercial adquirido na forma de consumidor. A bactéria ácido-lática *E. faecium* foi isolada de queijo e identificada por Katsuda *et al* (2019) e encontra-se na bacterioteca do Laboratório de microbiologia básica e aplicada (LaMBA), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, coordenado pela Prof^a Dra. Luciana Furlaneto Maia. O *Lb. helveticus* (LH 091 Lyofast) foi adquirido da empresa Sacco Brasil. Todos os reagentes utilizados nas análises físico-químicas neste estudo foram de grau de pureza analítica.

4.2 PRODUÇÃO DO LEITE FERMENTADO

A produção do leite fermentado foi baseada nos procedimentos descritos por Ferreira (1996) para a produção de iogurte. A calda consistiu na reconstituição de 14% de leite em pó desnatado e 7% de sacarose em 11 L de água potável. Em seguida a calda foi tratada termicamente a 85°C por 30 minutos e resfriada até 42°C onde posteriormente, foi acondicionada em volumes de 1 L em frascos de vidro hermético previamente higienizados com capacidade de 3 L. Foram elaboradas 3 formulações (tratamentos) de calda diferindo quanto ao tipo de cultura láctica responsável pela fermentação:

EF – Adicionou-se *E. faecium* na concentração de 1×10^7 UFC/mL de células previamente ativada em caldo BHI a 37°C por 24 h;

LH – Adicionou-se a mesma contagem de *Lb. helveticus* industrial;

EFLH – Foram adicionados 5×10^6 UFC/mL de *E. faecium* e a mesma contagem de *Lb. helveticus*.

Os frascos foram fechados e submetidos à fermentação em estufa com temperatura controlada em 42°C até atingir acidez mínima de 0,5g de ácido láctico/100g (Figura 2). A coalhada foi submetida ao resfriamento até 10°C por um período de 1 h e em seguida foram fracionadas em potes de vidros com volume de 200 mL e mantidas sob refrigeração a 5°C por 28 dias de estocagem. A produção do leite fermentado foi realizada em 3 repetições.

Figura 2 – Calda com adição das diferentes cepas antes de ir à estufa



Fonte: Próprio autor (2021).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo consistiu em avaliar o desempenho tecnológico da cultura autóctone de *E. faecium* comparado ao *Lb. helveticus* industrial, bem como a estabilidade físico-química ao longo de 28 dias de estocagem a 5°C. Foram elaboradas três formulações de leite fermentado envolvendo dois tratamentos testemunhas: *E. faecium* (EF) e *Lb. helveticus* (LH) em comparação com a misturas das cepas de *E. faecium* e *Lb. helveticus* (EFLH). A adição da sacarose seria para reproduzir formulações industriais, embora a proporção do açúcar definido para a condução deste estudo foi inferior ao praticado em leite fermentado comercial. Após o processo de fermentação estes foram estocados em frascos menores para análise da composição proximal realizados nos tempos 1 e 28 dias de estocagem a 5°C e outros para análise físico-química que ocorreram nos tempos 1, 7, 14 e 28 dias de estocagem na mesma temperatura.

4.4 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

As amostras e a calda foram submetidas à análise de composição proximal nos tempos 1 e 28 dias de estocagem. As análises realizadas foram extrato seco

total, gordura, proteína e cinzas conforme os procedimentos descritos por Adolfo Lutz (2008). Todas essas análises foram realizadas em triplicata.

O teor de carboidrato foi determinado por diferença dos componentes secos seguindo a metodologia da RDC 360 (BRASIL, 2003).

4.5 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

As análises físico-químicas consistiram no monitoramento da acidez titulável e pH ao longo do tempo de estocagem (1, 7, 14 e 28 dias) sob a temperatura de 5°C. Os procedimentos analíticos foram conduzidos segundo a metodologia descrita no Instituto Adolfo Lutz (2008). Todas essas análises foram realizadas em triplicata.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados por delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados da composição proximal e físico-química foram compilados e submetidos à análise de variância considerando os fatores: tratamentos e tempos. As médias foram comparadas por teste de Tukey no nível de 5% de significância com o auxílio do programa STATISTICA 10.0 (Statsoft®, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE FERMENTADO

A composição proximal compila a proporção dos principais componentes que possuem valores nutricionais de um determinado alimento. Na tabela 2, encontram-se os teores de extrato seco total, umidade, proteínas, cinzas e carboidratos determinados nos fermentados por *E. faecium*, *Lb. helveticus* ou mistura de *E. faecium* e *Lb. helveticus* no tempo inicial e final de estocagem.

Tabela 2 - Composição proximal dos leites fermentados por *E. faecium* (EF), *Lb. helveticus* (LH) ou mistura de *E. faecium* e *Lb. helveticus* (EFLH) ao longo do tempo de 28 dias de estocagem a 5°C

Componente	Tempo (dias)	Tratamentos		
		EF	LH	EFLH
Extrato Seco Total (%)	1	17,29 ± 0,14 ^{aB}	17,34 ± 0,12 ^{aB**}	17,27 ± 0,25 ^{aB}
	28	17,76 ± 0,38 ^{aA}	17,81 ± 0,28 ^{aA}	17,71 ± 0,44 ^{aA}
Umidade (%)	1	82,71 ± 0,14 ^{aA}	82,66 ± 0,12 ^{aA}	82,73 ± 0,25 ^{aA}
	28	82,24 ± 0,38 ^{aB}	82,19 ± 0,28 ^{aB}	82,29 ± 0,44 ^{aB}
Proteína (%)	1	3,33 ± 0,46 ^{aB}	3,47 ± 0,33 ^{aB}	4,25 ± 0,72 ^{bA}
	28	4,14 ± 0,12 ^{aA}	4,01 ± 0,16 ^{aA}	3,75 ± 0,25 ^{aA}
Cinzas (%)	1	0,98 ± 0,07 ^{aA}	0,97 ± 0,12 ^{aA}	0,97 ± 0,07 ^{aA}
	28	0,97 ± 0,09 ^{aA}	1,01 ± 0,21 ^{aA}	0,96 ± 0,09 ^{aA}
Carboidratos (%)	1	13,39 ± 1,15 ^{aA}	13,24 ± 1,16 ^{aA}	12,05 ± 0,52 ^{bB}
	28	12,89 ± 0,36 ^{cA}	14,56 ± 2,01 ^{bA}	16,77 ± 0,44 ^{aA}

* letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença estatística no nível de 5% de significância entre tratamentos no mesmo tempo de estocagem.

** letras maiúsculas diferentes indicam que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ao longo do tempo de estocagem no mesmo tratamento.

A quantificação do extrato seco em produtos lácteos é um importante indicador na qualidade nutricional desses alimentos. O extrato seco total (EST) abrange, com exceção da água, todos os componentes do leite. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2016), o teor de EST de leites fermentados deve apresentar-se em valores superiores a 11,5%. Neste estudo a calda foi formulada com 14% de leite em pó, o que resultou em uma proporção superior ao parâmetro mencionado pela OMS. Não foi observada diferença estatística quanto ao teor de EST entre os tratamentos no tempo inicial, o mesmo ocorreu aos 28 dias de estocagem. Porém, houve aumento significativo ($p < 0,05$) neste parâmetro, em cada tratamento aos 28 dias de estocagem. Isto pode ser em decorrência de uma homogeneidade inadequada da amostra. O teor de gordura do leite fermentado apresentou 0% em todos os tratamentos confirmando que o produto foi elaborado a partir do leite em pó desnatado. De acordo com a legislação vigente para leite fermentado, o produto neste estudo enquadrou-se como leite fermentado desnatado por não exceder o teor de 0,5g/100g do leite fermentado (BRASIL, 2007).

De acordo com a Instrução Normativa nº46 (BRASIL, 2007), o teor de proteína para qualquer tipo de leite fermentado deve apresentar no mínimo 2,9g/100g, caso seja inferior indica que o produto recebeu mais de 30% de ingredientes não lácteos. O teor de proteína de todos os tratamentos neste estudo atendeu este requisito para leite fermentado (Tabela 2). Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos EF e LH, porém ambos se apresentaram significativamente ($p < 0,05$) inferiores ao EFLH no tempo inicial de estocagem.

O *Lb. helveticus* é reconhecido pela sua atividade proteolítica, pois pesquisas constataram que esta espécie utiliza a caseína como fonte de carbono. Sendo assim, a proteólise de origem bacteriana degrada a proteína do leite diminuindo sua vida útil (COSTA, 2014). Como a fermentação continuou ao decorrer do período de análise, houve uma alteração na composição do leite com uma diferença significativa no teor de proteína ao longo do tempo de estocagem a 5°C. Estudos embasados nesse assunto afirmam que algumas enzimas originárias de microrganismos podem ocasionar problemas como o aumento de compostos nitrogenados durante seu período de estocagem (PINTO, 2006). Este fenômeno observado pelo pesquisador pode explicar o aumento significativo do teor de proteína do EFLH no tempo inicial deste estudo ou possivelmente houve problema de homogeneidade nas amostras

durante o envase ocorrendo maior concentração do componente nesta amostra analisada.

Por outro lado, houve aumento significativo ($p < 0,05$) do teor de proteína dos tratamentos EF e LH aos 28 dias de estocagem, exceto para o tratamento EFLH que não alterou durante o período em estudo.

A quantificação de cinzas consiste na representação do teor de resíduos minerais presentes nos alimentos. Não foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) nos teores de cinzas entre os tratamentos no tempo inicial de estocagem e tão pouco foi observado aumento da concentração deste componente aos 28 dias de estocagem.

O teor de carboidrato dos tratamentos EF e LH no tempo inicial não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) e estes diferiram ($p < 0,05$) com o tratamento EFLH, o qual apresentou significativamente menor concentração em comparação às demais amostras. Aos 28 dias de estocagem, houve aumento significativo no teor de carboidrato em todos os tratamentos, e também foi observado que todos os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$) no mesmo período de estocagem. A amostra EFLH apresentou maior teor de carboidrato comparado aos demais tratamentos no período final de estocagem em estudo. Esse aumento é dependente das alterações dos demais componentes, pois esse parâmetro foi determinado de forma indireta.

A composição de carboidrato do leite fermentado por *Lactobacillus casei* realizado por Cordeiro (1999), apresentou 12,70%, valor inferior ao obtido neste estudo. Devemos considerar que neste estudo foram adicionados 7% de sacarose e 14% de leite em pó, o que pode ter resultado em um incremento no teor de carboidrato nos leites fermentados, possivelmente pelo incremento do teor de extrato seco total ocorrido durante a estocagem.

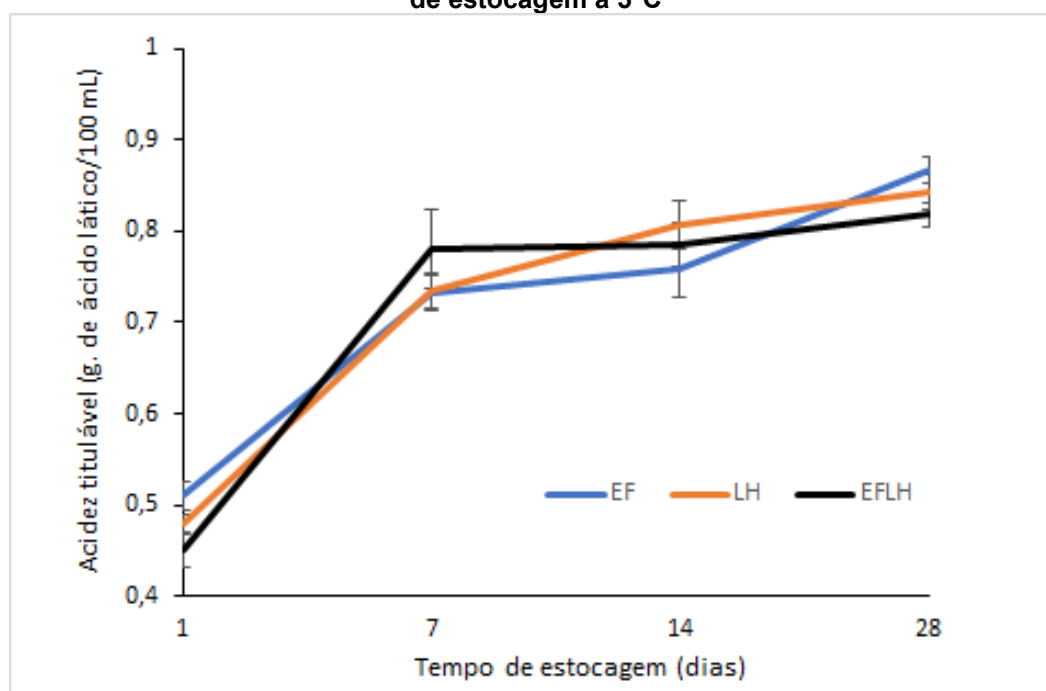
5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados do MAPA (2007), a acidez titulável de um leite fermentado deve estar entre 0,6 e 2,0g de ácido láctico a cada 100g. Neste estudo a acidez titulável de todos os tratamentos no tempo inicial apresentou entre 0,45 a 0,52 g de ácido láctico/ 100g de leite fermentado (Figura 3), limites inferiores ao recomendado pela legislação

vigente, isto se deve ao problema de homogeneidade de fermentação em cada tratamento e lote, obtendo um leite fermentado com baixa acidez.

Segundo El-Garhi *et al.* (2018), há uma relação entre acidez titulável e produção de ácido láctico. Os resultados mostraram que a acidez titulável produzida pela cepa EF no leite fermentado foi significativamente superior ($p < 0,05$) comparado ao LH, e este foi maior que o EFLH no tempo inicial de estocagem. Aos 7 dias, houve aumento significativo ($p < 0,05$) de acidez titulável do tratamento EFLH, enquanto os demais tratamentos não tiveram evolução proporcional no teor de acidez, as quais não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) neste período de estocagem. Somente aos 7 dias de estocagem, todos os tratamentos apresentaram teores de acidez superiores a 0,6g de ácido láctico/100 g conforme preconiza a legislação para esta categoria de produto (BRASIL, 2007).

Figura 3 – Desenvolvimento da acidez titulável dos leites fermentados por *E. faecium* (EF), *Lb. helveticus* (LH) ou mistura de *E. faecium* e *Lb. helveticus* (EFLH) ao longo do tempo de 28 dias de estocagem a 5°C



Fonte: Próprio autor (2021).

Por outro lado, houve aumento significativo nos tratamentos EF e LH aos 14 dias de estocagem, os quais apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre as duas amostras, porém o EFLH não diferiu em relação aos dois tratamentos neste período, permitindo observar que a mistura das duas cepas no leite fermentado

apresentou comportamento intermediário entre os dois tratamentos neste período em estudo. Podemos constatar que as cepas de *E. faecium* tiveram uma atividade fermentativa mais eficaz quando comparadas às cepas de *Lb. helveticus*.

O comportamento do aumento de acidez titulável ao longo da estocagem demonstraram que mesmo sob temperatura de 5°C, ambas as culturas lácticas apresentaram atividade fermentativa, onde o EF apresentou maior capacidade fermentativa durante a estocagem. Isso parece demonstrar que as culturas têm capacidade de se desenvolver durante a estocagem, mesmo sem ocorrer a adaptação da cultura EF ao leite antes de adicionar à calda, pois este foi ativado em meio rico em nutrientes (caldo BHI).

Aos 28 dias de estocagem, o EF apresentou significativamente maior acidez titulável ($p < 0,05$) comparado aos demais tratamentos, e o EFLH apresentou menor acidez entre os demais ($p < 0,05$).

Lembrando que, as cepas utilizadas de *Lb. helveticus* vêm de origem industrial, onde sua atividade ótima situa-se a uma temperatura de 43°C. Isso indica uma possível limitação fermentativa em relação às cepas de *E. faecium*, que são autóctones.

Ao observar o tratamento EFLH, verificou-se que não houve um comportamento simbiótico, pois, as cepas de *E. faecium* parecem ter atividade fermentativa independente do *Lb. helveticus*. A Figura 3 demonstra que a junção das espécies na calda para fermentação não apresentou incremento significativo comparado ao produto fermentado com cepas separadas.

O pH é um importante parâmetro tecnológico resultante da fermentação láctica que, quando baixa, confere espessura ao leite fermentado devido a desestabilização das micelas da caseína e coagulação (MARAFON, 2010). Segundo Van De Water (2003), o pH define a hora desejada de resfriamento do leite com a finalidade de interromper imediatamente a fermentação.

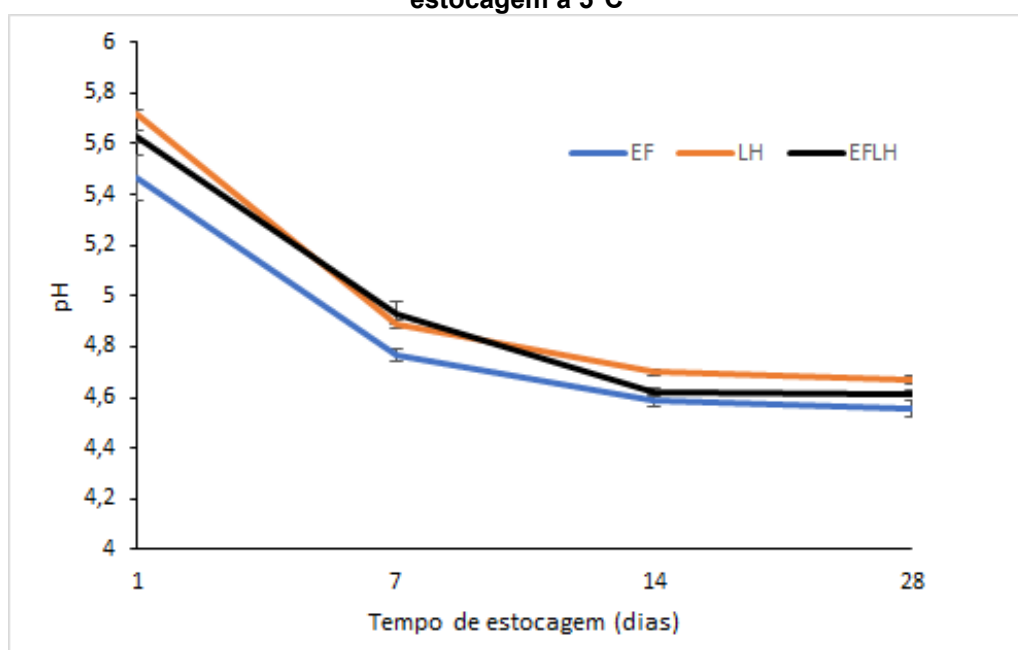
Nos primeiros 7 dias de estocagem houve uma redução significativa do pH de todos os tratamentos (Figura 4), entre os quais o tratamento EF apresentou maior atividade fermentativa com um menor valor de pH ($p < 0,05$).

Até 14 dias houve redução menos íngreme comparado ao período anterior de estocagem, onde EF ainda apresenta a menor acidez comparado aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Até 28 dias, houve redução do pH para os tratamentos EF e

EFLH, embora todos os tratamentos tenham apresentado valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A Figura 4, ilustra o comportamento da queda de pH das cepas de EF, ao qual obteve a maior queda de pH nos tempos entre 1 e 7 dias, se comportando com maior eficiência se tratadas sozinhas. Semelhantemente, pesquisas revelam que a diminuição dos valores de pH implica diretamente na qualidade dos leites fermentados, considerando que não é comum o crescimento de microrganismos patogênicos em meios ácidos (ARAÚJO *et al.*, 2011). Além disso, outro estudo similar aponta que há uma redução significativa do pH nas espécies de EF tratadas na condição de 20°C com o objetivo de simular uma temperatura ambiente (GIAZZI, 2017).

Figura 4 - Desenvolvimento do pH dos leites fermentados por *E. faecium* (EF), *Lb. helveticus* (LH) ou mistura de *E. faecium* e *Lb. helveticus* (EFLH) ao longo do tempo de 28 dias de estocagem a 5°C



Fonte: Próprio autor (2021).

Pesquisadores como Faria *et al.* (2006) observaram que há uma influência por parte do binômio tempo e temperatura em relação a variação de acidez e pH do leite. Tais parâmetros são utilizados para definir valores da atividade metabólica dos microrganismos, onde, cada espécie possui ação enzimática em diferentes tempos e temperaturas (GIRAFFA, 2003).

Já o maior valor de pH foi observado no leite fermentado pela cepa de *Lb. helveticus*. Isso porque o LH depende do auxílio de outra espécie para uma

evolução mais rápida. Apesar disso, há uma autolimitação em seu pH proveniente de sua dificuldade de desdobramento dos carboidratos para a produção de ácidos orgânicos, e do processo de fermentação não estar situada em temperatura ideal para as cepas. Ainda assim, o pH obteve valores finais para EF, LH e EFLH próximos de 4,6, que é o ponto isoelétrico da proteína, resultando na produção de um coágulo consistente característico de leite fermentado (GRANDI, 2001).

6. CONCLUSÃO

O leite fermentado por *E. faecium* não alterou a composição proximal comparado ao *Lb. helveticus*, porém houve aumento de extrato seco total e proteína até 28 dias de estocagem. Enquanto o leite fermentado pela mistura das culturas (EFLH) apresentou aumento significativo no teor de carboidratos aos 28 dias de estocagem.

O *E. faecium* apresentou acidez titulável significativamente superior comparado aos demais tratamentos no tempo inicial da estocagem, e seguiu aumentando gradativamente até os 28 dias de estocagem. Este comportamento também foi observado no pH, o qual o EF reduziu significativamente até o tempo final de estocagem neste estudo.

Este estudo permitiu conferir que o isolado de *E. faecium* originado de queijos artesanais apresentou desempenho tecnológico satisfatório comparado à cepas industriais consolidadas para a produção de leite fermentado, exigindo ajustes na contagem inicial desta cepa como cultura industrial, aumentando para 1×10^8 UFC/mL visando obter acidez inicial superior a 0,60g de ácido láctico/100g conforme os requisitos legais para leite fermentado, o que pode contribuir com a estabilidade físico-química e possivelmente microbiológica em um tempo superior ao período de estocagem observado neste estudado sob refrigeração.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 360, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, 2003.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Probióticos: Construção da Lista de Linhagens Probióticas. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília DF, Poder Executivo, abr. 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Probióticos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília DF, Poder Executivo, p.1. 2018.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 241 DE 26 DE JULHO DE 2018. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, 2018.
- ARAÚJO, Tatiana Ferreira et al. **Avaliação do perfil de conformidade de diferentes leites fermentados com a legislação brasileira de alimentos**. Rev. Inst. Latic. mai. 2011. n. 380, p. 40-45.
- ARTILHA, C. F. et al. Leites fermentados – uma revisão. **Brazilian Journal of Development**. v. 6, nº1. p. 4956 - 4968. Jan. 2020.
- BRANDALIZE, Claudia Carneiro. **Potencial probiótico de E. faecium isolados de queijo**, 2013 70 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013. Disponível em <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/2158>>. Acesso em 22 abr. 2019.
- BRASIL, RDC N° 23, DE 15 DE MARÇO DE 2000. Regulamento que dispõe sobre o Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, 2000.
- BRASIL, RDC N° 2, de 07 DE JANEIRO DE 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 68, DE 12 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, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria N° 46, de 23 DE NOVEMBRO DE 2007: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Substâncias Bioativas e Probióticos: lista de alegação de propriedades funcionais aprovadas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2008.

BRASIL, RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018. Regulamento que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 jul. 2018. Seção 1, p. 97.

BRUNO, Laura Maria. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas. Brasília –DF, 2011. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. 15 p. jun. de 2011.

BURITI, Flávia Carolina; SAAD, Suzana. DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA BIOQUÍMICA-FARMACÊUTICA, FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, USP. **Bactérias do grupo Lactobacillus casei: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana, 2007**. Disponível em <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000400010> Acesso em 26 dez. 2020.

CORDEIRO, A. M. Avaliação físico-química e sensorial de bebida simbiótica fermentada com Lactobacillus casei e suplementada com Bifidobacterium longum e extrato de cenoura (Daucus carota L.). 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DONNELLY, W. J. New functions of dairy products for human health. **CONGRESSO PAN-AMERICANO DO LEITE**, 9. Tendências e avanços do Agronegócio de leite nas américas: mais leite = mais saúde. Ed. Carlos Eugênio Martins et al, Porto Alegre-RS, p.63-68, 2006.

EL, GARHI HOSAM-EDDIN M. et al. Quality improvement of spreadable processed cheese made from ultrafiltered milk retentates using commercial starter cultures. **Food Science and Technology International**. Egypt, 2018. v. 24. n. 6.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: GILMORE, M. S. (Ed.). **The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington: ASM Press, 2002. p. 1-54.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; GUERROUE, J. L. **Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por Lactobacillus casei**. Pesq. Agropec. Bras, v. 41, n. 3, p. 511-516, 2006.

FERNÁNDEZ, L.; BROWMIK, T.; STEELE, J. **Characterization of the Lactobacillus helveticus**. CNRZ32 pepC gene. Appl. Environ. Microbiol. 1994. p. 333-336.

FERREIRA, Célia Lúcia de Luces F. **Produtos Lácteos Fermentados: Aspectos bioquímicos e tecnológicos.** Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais: Imprensa Universitária, 1996.

GALLINA, Darlila A.; Alvesa, Adriana T. S.; Trentoa; Fabiana K. H. S.; Carusia, Juliana. Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. **Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)**, Londrina, v. 13, n.4, p.239244,2011.

GHRAIRI, T. et al. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Elsevier**. v. 19. p. 162-169. fev. 2008.

GIAZZI, Amanda. **Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo Minas artesanais e leite cru.** 2017 47 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

GIRAFFA G.; CARMINATI D.; NEVIANI E. Enterococci Isolated from Dairy Products: A Review of Risks and Potential Technological Use. **Journal of Food Protection**. V. 6. p. 732-738. Jun. 1997.

GRANDI, JOSÉ GLAUCO. Leites fermentados. In: AQUARONE, EUGÊNIO. et al. **Biotecnologia na produção de alimentos.** São Paulo: Editora Edgard Bluncher Ltda, 2001. v.4 p. 228-244. Londrina, 2017.

GRIFFITHS Mansell.W. TELLEZ Angela Maria. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. In: GIRAFFA, Giorgio. **Lactobacillus helveticus: Importance in Food and Health.** Guelph, mar. 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 1ª Ed. digital. São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, 2016.

KATSUDA, M. S.; GIAZZI, A.; PAULA, P. L. M.; TOSONI, N. F.; MORALES, A. T. P.; FURLANETO-MAIA, L. Avaliação do perfil de bactérias autóctones com potencial aplicação em produtos lácteos fermentados. In: NETO, B. R. S. **A produção do conhecimento nas Ciências da Saúde**, v. 4, Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. Capítulo 31.

KIPLI, E. et al. **Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus*.** CNRZ32E. Int. Dairy 2007. p. 976–984.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. **Peptídeos bioativos: produção e funcionalidade.** Int. J. Dairy. Jokioinen, Finlândia. 2006. p. 945–960.

LEITE, Kathlem et al. Elaboração de leite fermentado a partir dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus* adicionado mel de *Apis mellifera*. **Universidade Estadual Paulista**, Dracena, v. 15, p. 431-439, set. 2016.

LEITE, Marcelo Teixeira. **Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus***. 2006. 86 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, 2006.

MAPA. Instrução Normativa nº 46 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**. Brasília, 24 out. 2007. Seção 1, p. 4.

MARAFON, ANA PAULA. **Otimização propriedades reológicas e sensoriais de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MELO, R.T. et al. *Lb. helveticus* e sua importância na indústria de laticínios. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 9, Ed. 156, Art. 1057, 2011.

NASCIMENTO, Liane Caroline Sousa. **Seleção de Novas Linhagens de Bactérias Ácido-Láticas Probióticas e Aplicação de *E. faecium* em Leite**. 2017. 131 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto - SP 2017.

OLIVEIRA, V. C. D. **Alergia à proteína do leite de vaca e intolerância à lactose: abordagem nutricional e percepções dos profissionais da área de saúde**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Milk processing toolkit. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Genebra, may. 2016.

ROBINSON, R.K. **Microbiologia lactologica**: Microbiología de los productos lácteos. 2º ed. Zaragoza: Acribia S. A., 1987. p. 223-251.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

RODRIGUEZ. P.M. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

SANCHÉZ, B.; REYES – GAVILÁN, C. G.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M.; Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p.472-483, 2009.

SILVA. Neusely. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. p. 25-53.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, Oxford, v.17, n.11, p.1262-1277, 2007.

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, **E.R., ed. *Handbook of fermented functional foods***. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.113-144.