

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

PAULA MIRELLY SAMPAIO OZORIO

**AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM QUEIJO
MATURADO POR *Enterococcus faecium***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**LONDRINA
2021**

PAULA MIRELLY SAMPAIO OZORIO

**AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM QUEIJO
MATURADO POR *Enterococcus faecium***

**Evaluation of proteolysis and antioxidant activity in cheeses ripened by
*Enterococcus faecium***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos do Curso Superior em Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR campus Londrina.

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

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

LONDRINA
2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

PAULA MIRELLY SAMPAIO OZORIO

**AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM QUEIJO
MATURADO POR *Enterococcus faecium***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 14 de junho de 2022.

Marly Sayuri Katsuda - Orientadora
Doutorado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Marianne Ayumi Shirai – Membro avaliador
Doutorado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Mayka Reghiany Pedrão – Membro avaliador
Doutorado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dedico este trabalho a minha mãe,
por todo apoio e pelos momentos
de ausência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, pois sem ele tudo o que realizei durante todos esses anos, não seria possível e Nossa Senhora por sempre interceder por mim.

A professora Dra. Marly Sayuri Katsuda pela paciência, por todo conhecimento transmitido, principalmente, por não ter deixado de me orientar mesmo em momentos tão difíceis e delicados.

A professora Dra. Luciana Furlaneto Maia pela orientação.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo fornecimento dos laboratórios.

Ao PIBIC/CNPq pela oportunidade de desenvolver este trabalho e a aos seus coordenadores, pelo apoio ao projeto “Peptídeos Bioativos Em Queijos Maturados Por Bactérias Ácido Láticas”.

A minha família, principalmente, a minha mãe, Irene, por todo apoio, amor e compreensão em todos esses anos.

Ao meu noivo, por sempre me apoiar nas minhas decisões e pela parceria.

RESUMO

As bactérias ácido lácticas encontram-se em queijos maturados artesanais e contribuem com as modificações desejáveis no sabor e textura dos mesmos. Dentre as espécies deste grupo destaca-se o *Enterococcus faecium*, naturalmente presente no leite. Junto às bactérias ácido lácticas, esses microrganismos adicionados influenciam de forma positiva no processo de maturação, que com a degradação de caseínas do leite, resultam em características únicas geradas nessa etapa. Este trabalho consistiu em avaliar a composição proximal, pH, acidez titulável, atividade proteolítica (Índice de extensão (IEP) e de profundidade de proteólise (IPP)) e DPPH do extrato hidrossolúvel de queijo maturado por *E. faecium* (EFM 55) nos tempos 0 e 60 dias de maturação à temperatura de 14°C. O estudo consistiu em elaborar 3 tratamentos com diferente combinação de fermento láctico: *L. lactis* e *L. cremoris* (T1), *E. faecium* EFM 55 (T2) e as cepas *L. lactis*, *L. cremoris* e *E. faecium* EFM 55 (T3). Os valores de umidade, extrato seco total, proteínas, cinzas e cloretos não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e ao longo dos 60 dias de maturação. O teor de lipídeos diferiu entre os tratamentos após 60 dias de maturação. O pH do T1 apresentou o maior valor comparado aos demais tratamentos e todas as amostras tiveram redução significativa ao longo do tempo de estocagem. A acidez titulável do T1 foi menor em relação aos demais tratamentos e seus valores aumentaram ao longo do tempo de maturação. O IEP do T1 apresentou maior valor entre os demais tratamentos. Por outro lado, o IPP do T1 foi o menor em relação aos demais. O extrato hidrossolúvel do T1 apresentou menor atividade de inibição do radical DPPH, em relação aos demais tratamentos após 60 dias de maturação. Portanto, a cultura *E. faecium* não demonstrou bom desempenho como cultura starter, também não contribuiu na atividade proteolítica, conseqüentemente na atividade antioxidante no extrato hidrossolúvel.

Palavras-chave: Bactéria ácido láctica; composição proximal; extrato hidrossolúvel; DPPH.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are found in artisanal aged cheeses and contribute to desirable changes in flavor and texture. Among the species of this group, *Enterococcus faecium* stands out, naturally present in milk. Together with lactic acid bacteria, these added microorganisms positively influence the maturation process, which with the degradation of milk caseins, results in unique characteristics generated at this stage. This work proposes to evaluate the proteolytic and antioxidant activity of the water-soluble extract of cheese aged by *E. faecium* (EFM 55) for 60 days at 14°C. Will be divided into 3 treatments: *L. lactis* and *L. cremoris* (T1), *E. faecium* EFM 55 (T2), and strains *L. lactis*, *L. cremoris*, and *E. faecium* EFM 55 (T3). With the results obtained, the proximal composition, humidity, dry extract, and proteins showed no significant difference between the treatments at the beginning and the end of the 60 days, only a percentage difference compared to the time 0 and 60 days. The values of moisture, total dry extract, protein, ash and chlorides did not present significant differences among the treatments and throughout the 60 days of maturation. The lipid content differed among treatments after 60 days of maturation. The pH of T1 showed the highest value compared to the other treatments and all samples had a significant reduction over the storage time. The titratable acidity of T1 was lower compared to the other treatments and its values increased along the aging time. The EPI of T1 presented the highest value among the other treatments. On the other hand, the IPP of T1 was the lowest among the other treatments. The water-soluble extract of T1 showed lower activity compared to the other treatments after 60 days of manufacture DPPH radical inhibition activity than the others. Therefore, the *E. faecium* culture didn't show good performance as a starter culture, and neither complemented in proteolytic activity, accordingly in antioxidant activity in the water-soluble extract.

Palavras-chave: lactic acid bacteria; proximal composition; water soluble extract; soft cheese; DPPH.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Processos da maturação do queijo.....	14
Figura 2- Processo de Elaboração dos queijos.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeito da maturação sobre a composição proximal.....	22
Tabela 2 - pH, acidez titulável, Índice de extensão e profundidade de proteólise..	24
Tabela 3 – Análise de DPPH.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 PROTEÓLISE DO QUEIJO MATURADO POR <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	11
3.2 QUEIJO MATURADO.....	11
3.3 CULTURAS LÁTICAS.....	12
3.4 <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i>	13
3.5 PROTEÓLISE E FATORES INFLUENCIADORES NA MATURAÇÃO.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 FERMENTO LÁTICO.....	17
4.2 ELABORAÇÃO DO QUEIJO MEIA CURA.....	17
4.3 EXTRAÇÃO DE PEPTÍDEOS HIDROSSOLÚVEIS.....	19
4.3.1 CAPACIDADE DE SEQUESTRAR RADICAIS (DPPH).....	20
4.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO PROXIMAL.....	20
4.5 ÍNDICE DE EXTENSÃO DE PROTEÓLISE.....	20
4.6 ÍNDICE DE PROFUNDIDADE DE PROTEÓLISE.....	21
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL.....	22
5.2 AVALIAÇÃO DO pH, ACIDEZ TITULÁVEL E EVOLUÇÃO DA PROTEÓLISE..	23
5.3 DPPH.....	26
6. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Dentre os alimentos mais consumidos, derivados de produtos lácteos, o queijo é um produto muito consumido no Brasil que originou como forma de trazer a tradição trazida pelos de imigrantes europeus. Os produtos lácteos fermentados naturalmente contêm alguns microrganismos, especialmente as bactérias ácido lácticas (BALs), as quais possuem propriedades tecnológicas e oferecem efeitos benéficos à saúde. Algumas espécies apresentam propriedades probióticas capazes de prevenir e tratar doenças, atuando de forma positiva na saúde humana e animal. Deste modo, pesquisadores buscam estudar propriedades tecnológicas de BALs probióticas voltadas para aplicação industrial, desde que ofereça representa aptidão tecnológica para a indústria devido à segurança alimentar microbiológica que ela provém (KHALIGHI; AMIR REZA et al., 2016).

Os benefícios do consumo dos probióticos incluem a melhora na intolerância à lactose, constipação, doenças inflamatórias intestinais e gastroenterites agudas, essas melhorias ocorrem pelo equilíbrio da microbiota do intestino devido ao consumo de alimentos característicos contendo BAL (HALÁSZ, 2009; LEÃO E VITAL, 2020).

O gênero *Enterococcus* é frequentemente encontrado em leite e conseqüentemente em queijos, sendo que esta cepa contribui para o desenvolvimento de sabor e biocontrole de microrganismos patogênicos (YERLIKAYA; AKBULUT, 2019). Algumas cepas de enterococos apresentaram efeito anticarcinogênicos, hipocolesterolêmicos e efeito de regulação imune (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006)

Algumas cepas de *E. faecium* apresentaram potencial probiótico e são capazes de produzir bacteriocinas, as quais são peptídeos com caráter antimicrobiano de baixa toxicidade. (OGAKI et al, 2016; FURLANETO MAIA et al, 2017). Certos isolados de enterococos de queijos possuem propriedades proteolíticas e lipolíticas contribuindo com o desenvolvimento de sabor e aroma em queijos.

Com seu caráter fermentativo e enzimas proteolíticas, possui a capacidade de metabolizar peptídeos bioativos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, sendo aplicados aos produtos lácteos fermentados. Logo, algumas linhagens são continuamente usadas nas indústrias alimentícias, por conta da segurança com relação à microrganismos, multiplicação rápida mesmo em condições nutricionais baixas durante o processamento e/ou armazenamento de determinados alimentos (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997).

O *Enterococcus faecium* é normalmente encontrado em queijos artesanais, o qual contribui com o seu sabor e textura. Algumas espécies originadas de queijos apresentam carácter proteolítico contribuindo com as alterações na textura dos mesmos. Esta característica metabólica contribui com a liberação dos peptídeos que podem apresentar carácter antioxidante e antimicrobiana, entre outras funções (PAULA et al,2020). Esses peptídeos são uma combinação oriundas do coalho, do fermento láctico e suas bactérias, de proteinases originárias do leite, que alteram as proteínas do queijo, influenciando nesse sabor e textura, pois agem como substratos para enzimas da microflora, encarregado pela liberação de aminoácidos, conhecidos por contribuir no “flavour” único do queijo. Paula et al (2020) observaram atividade proteolítica de todos os isolados de *E faecium* após 48 h na temperatura de 20oC, demonstrando potencial aplicação na produção de queijos.

Neste contexto, o presente trabalho consistiu em avaliar a atividade proteolítica e antioxidante de queijos maturados por *Enterococcus faecium* (EFM55) ao longo de 60 dias de maturação sob temperatura de 14oC.

2 OBJETIVO

Avaliar a composição e proteólise de queijo elaborado por *E. faecium* e/ou *Lactococcus lactis* e *L. cremoris*, bem como atividade antioxidante dos extratos hidrossolúveis no tempo inicial e 60 dias de maturação sob temperatura de 14oC.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição proximal dos queijos no tempo inicial e final da maturação;
- Avaliar o perfil proteolítico dos queijos maturados nos mesmos tempos;
- Acompanhar a evolução da atividade antioxidante dos extratos hidrossolúveis dos queijos nos mesmos tempos de maturação.

;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROTEÓLISE DO QUEIJO MATURADO POR *E. faecium* E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Ao longo da maturação do queijo, ocorrem diversas reações de degradação, devido às enzimas provenientes do leite, do coalho e de culturas microbianas, tais como o *Enterococcus faecium* e/ou *L. lactis* e *L. cremoris*. Este microrganismo, por meio da proteólise, gera peptídeos bioativos que possuem atividade antioxidante.

3.2 QUEIJO MATURADO

Queijo maturado é obtido por meio da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído ou de soros lácteos coagulados pela utilização do coalho, de enzimas, e de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem a junção de substâncias alimentícias, tais como especiarias, condimentos, aditivos, aromatizantes e matérias corantes (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Queijos curados possuem características próprias, identidade como aroma suave, sabor peculiar, textura diferenciada, e com nenhuma ou poucas olhaduras lisas. O peso dos queijos curados varia de 800g a 1,200kg. No processamento dos curados o leite é aquecido até atingir 35°C, e adiciona-se o cloreto de cálcio a 50% na proporção de 4ml para cada 10L de leite e fermento láctico termófilo, precisamente, *Streptococcus thermophilus* e *Lb bulgaricus*, de acordo com as especificações do fabricante. A pré-maturação do leite ocorre em 10 minutos, sendo nessa etapa o momento dos testes de acidez. Em seguida é adicionado o coalho na proporção de 1:10. Após a adição do coagulante, o leite é mantido em repouso à 35°C até atingir ponto de gel.

Depois de certo tempo realiza-se o teste de corte; se adequado, a próxima etapa consiste em cortar o gel com auxílio de liras horizontais e verticais até a obtenção de cubos de 1,5cm de aresta. Prontamente é realizada a agitação lenta para a etapa de aquecimento. O tratamento da coalhada, se faz através do aquecimento até a 45°C por um período de 30 minutos, logo em seguida, a coalhada deve ser

agitada por mais 10 a 15 minutos. Com maior desprendimento do soro, a massa é levada às formas para dessorar. Permanecem nas formas para fermentação e obtenção do pH desejado, seguindo para a etapa de salga, e maturação por 60 dias (BONFIM, 2019).

3.3 CULTURAS LÁTICAS

As bactérias ácido lácticas englobam diversos tipos de microrganismos que podem ser encontrados em lugares variados na natureza, podendo ser isolados do solo, água, plantas, silagens, no trato intestinal de animais e humanos. São parte de um grupo morfológico e heterogêneo de cocos e bacilos, que podem estar dispostos juntos, em cadeia, ou individual, são Gram positivas, não esporulados, catalase negativas e anaeróbicas facultativas, mesófilas crescendo em temperaturas entre 5 e 45°C. Essas BAL's produzem ácido láctico como resultante da fermentação de açúcares. Também são responsáveis pela acidificação de produtos alimentares. Crescem em pH de 3,8, produzem enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, capazes de transformar nutrientes do leite e queijo em propriedades sensoriais (JAY et al, 2005; SILVA, 2010; GIAZZY, 2017).

Além do ácido láctico, as bactérias ácido lácticas produzem compostos como peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas, enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas que transformam nutrientes caracterizando a formação de textura, redução do pH e retenção de umidade na massa de queijos devido à degradação da caseína pelas proteinases e peptidases (SILVA, 2010; GIAZZI, 2017).

O grupo BALs é constituído de microrganismos dos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacilus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Divididos em homofermentativos, quando produzem ácido láctico e heterofermentativos, quando produzem ácido láctico e outros compostos, como por exemplo dióxido de carbono, ácido acético, e álcool (SILVA et al, 2016).

A espécie *Lactococcus lactis* é a BALs, usada na indústria para inibir ou reduzir a contaminação de microrganismos patogênicos e/ ou deteriorantes, capazes de produzir bacteriocinas. No entanto, também produzem alimentos carregados de

bioativos com sabores desejáveis, que beneficiam a saúde de inúmeras formas (DE DEA LINDNER, 2008; GIAZZI, 2017).

3.4 *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

O gênero *Enterococcus* são bactérias ácido lácticas, de morfologia esférica, Gram positivas, homofermentativas, anaeróbias facultativas, catalase negativas, com capacidade de crescimento a 10°C à 45°C e temperatura ótima de crescimento de 37°C. *E. faecium* é uma BAL, responsável pela produção de ácidos durante o processamento de queijos, favorecendo os curados, e inibindo o crescimento de bactérias não desejados (GASPARIN, 2015).

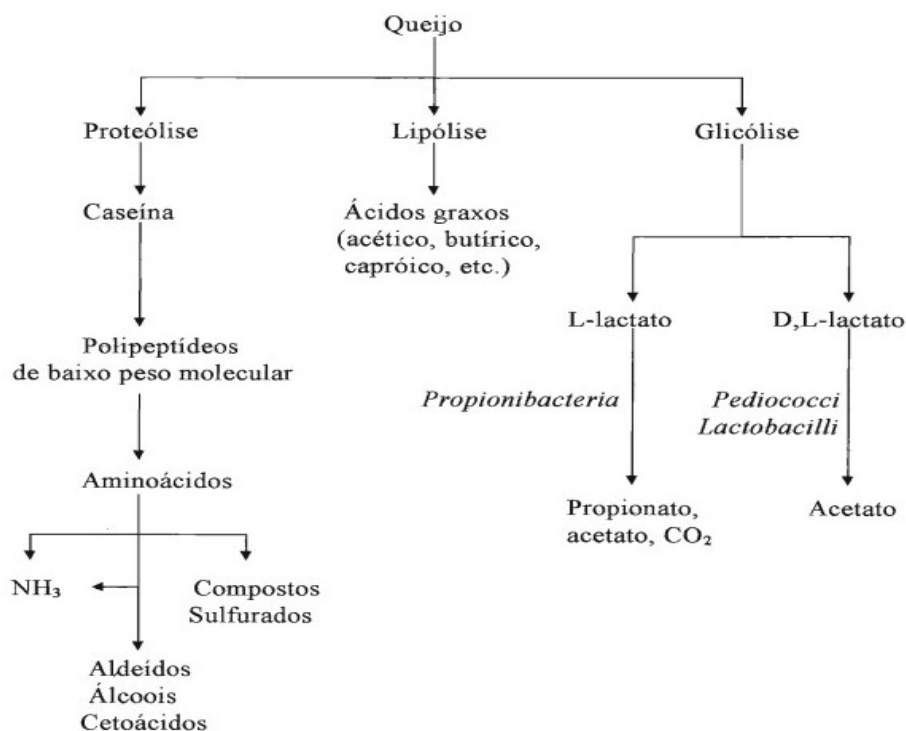
A capacidade de acidificação e a produção de enzimas proteolíticas afetam aspectos sensoriais de forma positiva, conferindo sabor, aroma e textura, justificando o uso dessa bactéria na produção de queijos (FOX et al., 2000, 2004).

Algumas espécies de *Enterococcus* se apresentaram seguras para uso em alimentos ao longo dos anos, tornando-se, portanto, fator de interesse biotecnológico; como é o caso das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, com exceção do *Enterococcus spp*, que são responsáveis por diversos casos de infecção gastrointestinal, urinário, etc. No entanto, *E. faecium*, após pesquisas, mostrou-se com capacidade de sobreviver a meios extremamente ácidos, no caso, ao estômago (pH 3,0), e a pancreatina, resistindo a 3-4 horas de exposição (BRANDALIZE, 2013).

3.5 PROTEÓLISE E FATORES INFLUENCIADORES NA MATURAÇÃO

Processos bioquímicos, físicos e químicos acontecem durante a maturação dos queijos, influenciando diretamente em transformações com relação a proteólise, lipólise e glicólise (FIALHO, 2015). Pois são esses processos exercem sobre os aspectos tecnológicos e sensoriais do produto. A proteólise, sendo o fator de interesse, ocorre como expresso na Figura 1.

Figura 1. Processos da maturação do queijo



Fonte: BALDINI, 1998.

A atividade proteolítica de ordem primária sendo representada quantitativamente, ela é resultante da quebra da caseína em peptídeos maiores favorecidos por agentes coagulantes sobre α s1-caseína e a β -caseína, para medir tal quebra e expressa-la é utilizado o índice de extensão de proteólise. Enquanto a proteólise secundária, é obtida por índice de profundidade, resultado da sua atuação das culturas lácticas sobre as frações protéicas. Este índice quantifica peptídeos que contém tamanhos inferiores a 7 aminoácidos (FOX, 2004). Todo esse processo depende de fatores como: pH, tipos de enzimas naturais e adicionadas, fermento, teor de sal, umidade, tempo de maturação e temperatura.

Segundo Ong e Shah (2008) realizaram análises com queijo Cheddar com adição de cultura probiótica, maturado por 24 semanas, e notaram maior intensidade na proteólise em comparação aos queijos sem cultura probiótica, logo, apresentaram nível mais elevado de peptídeos.

Outro estudo realizado por Gomez-Ruiz et al. (2002) avaliaram o comportamento dos peptídeos anti-hipertensivos em Machejo (queijo espanhol) à base de leite de ovelha, onde relatam a pouca atividade anti-hipertensiva em quatro

meses de maturação. Depois desses meses, a atividade foi aumentada, alcançando o ponto máximo em oito meses, e queda após 12 meses. Esses pesquisadores observaram que no período de maturação, os peptídeos bioativos foram quebrados, se tornando menores ou ainda aminoácidos livres, conseqüentemente perdendo a atividade bioativa.

A proteólise, logo, é a degradação das proteínas resultantes das ações enzimáticas, produzem peptídeos de alta, média, e baixa massa molecular como demonstrado anteriormente. Tais enzimas responsáveis pela maturação, são divididas em 5 classificações (FOX et. al, 1993):

- 1) Enzimas naturais do leite;
- 2) Enzimas do coalho;
- 3) Enzimas de bactérias “starter”;
- 4) Enzimas de bactérias “starter” secundárias;
- 5) Enzimas de bactérias não “starter” secundárias;

A quimosina, enzima extraída de animais utilizada como coalho, é a agente responsável pelas atividades, de hidrólise da k-caseína na ligação Phe105-Met106 gerando os segmentos 1-105 (para-k-caseína) e 106-169 (caseínomacropéptido) e pela proteólise, atuante sobre as proteínas, principalmente durante a maturação dos queijos (ECK, 1987; SILVA et al., 1995).

As culturas “starters”, ou iniciadoras, presentes nos fermentos, tem a finalidade de fermentar os queijos, abaixam o pH devido a produção de ácido láctico. Essas bactérias produtoras do ácido láctico, liberam as enzimas endopeptidases ou proteases, causador da hidrólise das proteínas, conseqüentemente, a liberação de peptídeos e as exopeptidases autores da quebra dos peptídeos em aminoácidos. As culturas não “starters”, secundárias ou cultura adjunta, também tem seu papel na maturação em queijos, pois estes são provenientes do leite contribuindo com a identidade dos queijos regionais, devido às características intrínsecas das cepas ocasionando modificações na textura e sabor dos queijos. E as bactérias não “starters” pertencem ao grupo *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*, naturais do leite cru (FOX et. al, 1993; FIALHO, 2015).

Quanto à atividade antioxidante, que está diretamente ligada a proteína de leite, um dos estudos feitos sobre o assunto, Fialho (2015), relata em sua tese o processo do queijo tipo Burgo, feito usando vários tipos de coalho (vegetal, animal e

microbiano), onde há peptídeos com ação antioxidante. Tais peptídeos têm papel importante nos alimentos, pois auxiliam na defesa do organismo humano, além de atuarem como antimicrobianos. Além da ação antioxidante, há anos atrás foi comprovado a atuação das proteínas do leite devido aos peptídeos com ação antimicrobiana, que favorece as defesas do organismo combatendo microrganismos patogênicos em potencial (SILVA et al., 1995).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia consistiu em uma pesquisa experimental, com dados quantitativos. Foram analisadas amostras de queijos maturados por EFM55, dados observados no tempo 0, e 60 dias com a finalidade de determinar o perfil proteolítico dos queijos maturados e a atividade antioxidante dos extratos hidrossolúveis.

Esta pesquisa foi realizada no último trimestre de 2021. As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Laticínios e Multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Londrina.

4.1 FERMENTO LÁTICO

As amostras de queijos maturados por *E. faecium* EFM 55 foram elaboradas em agosto e setembro de 2019 e congeladas a -18°C por um período de 12 meses. O isolado em estudo *E. faecium* EFM 55 foi proveniente da 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. A cultura lática composta por *L. lactis* e *L. cremoris* (R704) foi gentilmente cedida pela empresa CHR-Hansen.

4.2 ELABORAÇÃO DO QUEIJO MEIA CURA

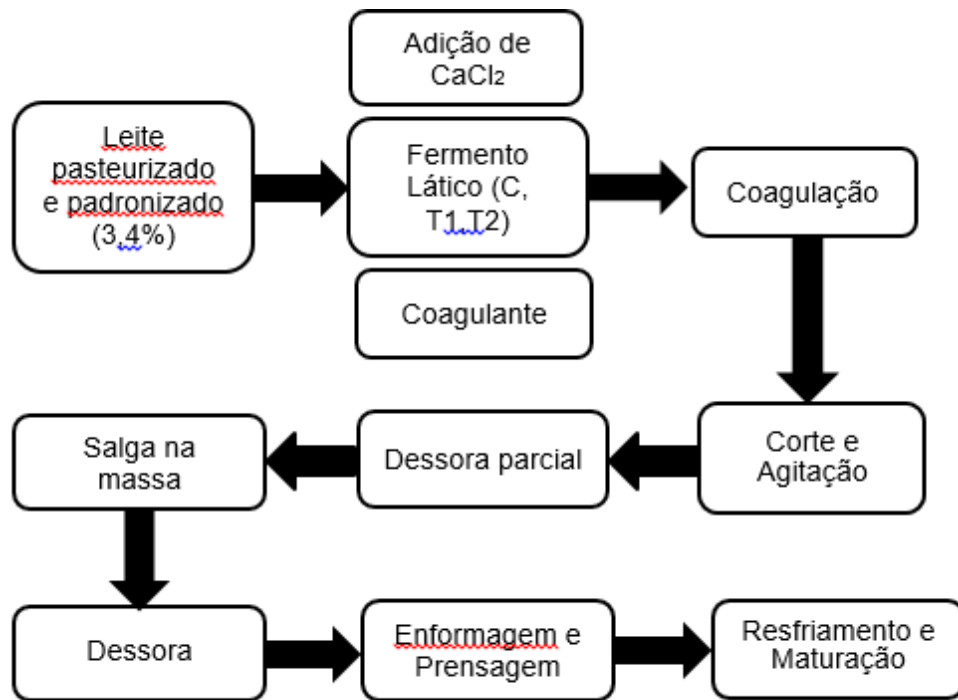
Os queijos foram elaborados com base no procedimento descrito por Furtado (2009). O processo de produção ocorreu no Laboratório de Laticínios da UTFPR Campus Londrina, atual Laboratório Multiusuário. Antes do início da produção o leite foi pasteurizado e depois padronizado com teor de gordura a 3,4% para a produção do queijo. Em seguida o leite foi aquecido a 35°C em um tanque de coagulação, com adição de 0,04% (v/v) de cloreto de cálcio a 50% (m/v), em sequência, foi adicionado os fermentos lácticos (Figura 2), o controle constituído por *L. lactis* e *L. cremoris*, tratamento 1 (T1) por *Enterococcus faecium* e tratamento 2 (T2) composto por cepas de *L. Lactis*, *L. cremoris* e *Enterococcus faecium*. A quantidade utilizada de fermento foi de acordo com as especificações do fabricante, enquanto o *E. faecium* foi replicado em concentrações de 10^8 células/mL, após a sua ativação, para cada 100mL de leite.

Partindo para a adição do coagulante a 0,08% v/v, após 10 minutos de pré maturação, foi adicionado o coagulante uniformemente com leve agitação para distribuição por igual em todo o leite, deixando em repouso por 50 minutos para formação do gel e realização do teste de corte.

Assim que houve indícios que o gel atingiu o ponto de corte, realizou-se os cortes com auxílio de liras verticais e horizontais, até se obter cubos de 1,0 cm. Foi deixado em repouso por 5 minutos e iniciou-se a agitação da coalhada por um período de 30 minutos. Em sequência, o processo de aquecimento da coalhada de 1°C a cada 3 minutos até aferir a temperatura de 38°C, com agitação por mais 5 minutos após a aferição. Após interromper a agitação, a coalhada foi mantida em repouso para decantar, o soro ficou suspenso e foi retirado $\frac{1}{3}$ do seu volume, seguido da adição de 1% de sal (m/v).

Nas etapas finais, a coalhada foi disposta em formas cilíndricas com dessoradores (500 g). Depois foram prensados com pressão equivalente a 10 vezes ao peso do queijo por 30 minutos, sendo virados a cada 1 hora até chegarem a 3 horas de viragens. Foram desenformados e acondicionados na geladeira a 10°C por 24 horas, posteriormente, foram maturados em estufa incubadora de temperatura de 14°C por 7 dias, vindo a ser envasados em embalagens poliméricas à vácuo, e em seguida, prontamente transferidos para câmara de maturação a 14°C por período de 60 dias.

Figura 2. Processo de Elaboração dos queijos



Fonte: Autoria própria, 2022.

4.3. EXTRAÇÃO DE PEPTÍDEOS HIDROSSOLÚVEIS

Para extração de peptídeos solúveis foi usada a metodologia de Kuchroo e Fox (1982). As amostras de queijo pesadas 20 g das amostras foram trituradas e homogeneizadas com 60mL de água ultrapura, sonicadas em ultrassom (Qsonica Q500). Depois, levados para o resfriamento a 4°C e centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Os sobrenadantes foram retirados por filtração em Whatman n.1 e dos conteúdos filtrados, foi realizado a correção do pH para 4,7. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Os extratos hidrossolúveis dos peptídeos foram congelados e liofilizados seguidos de armazenamento em freezer.

Estes extratos hidrossolúveis foram avaliados quanto à atividade antioxidante DPPH.

4.3.1 CAPACIDADE DE SEQUESTRAR RADICAIS DPPH – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A análise de DPPH foi realizada ajustando os procedimentos descritos por, Brand-Willians et al.(1995) e Rufino et al. (2007) com modificações. Portanto, adicionou-se em tubos de ensaio 0,1 mL do extrato de queijo, em conjunto com 3,9 mL de solução DPPH 0,06 mM, foram homogeneizados em seguida, e encaminhados para leitura após 30 minutos de reação, medida por absorbância em espectrofotômetro UV-VIS a 515nm. A leitura decorreu em 40 minutos.

4.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO PROXIMAL E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A determinação da composição proximal dos queijos foi realizada no período em que foram elaborados. As amostras foram caracterizadas quanto ao teor de umidade, extrato seco total, proteína, lipídios, cinzas e cloretos. Os componentes foram determinados de acordo com os procedimentos descritos por Adolfo Lutz (2008). O teor de carboidratos foi determinado pela diferença dos demais componentes.

A caracterização físico-química consistiu na determinação da acidez titulável e pH. As análises foram realizadas conforme os procedimentos descritos pela AOAC (2003).

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5 ÍNDICE DE EXTENSÃO DE PROTEÓLISE

Segundo Fialho (2015), o índice de extensão de proteólise (IEP) ou maturação será definido de acordo com a razão entre a porcentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e a porcentagem de nitrogênio total, multiplicado por 100. Dessa forma, a seguinte equação:

$$\text{IEP (\%)} = \frac{\% \text{nitrogênio solúvel em pH}4,6 \times 100 \%}{\text{nitrogênio total}}$$

4.6 ÍNDICE DE PROFUNDIDADE DE PROTEÓLISE

Fialho (2015) descreve o índice de profundidade de proteólise (IPP) ou maturação como a razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em TCA 12% e a percentagem de nitrogênio total, também multiplicado por 100. Segue abaixo a equação:

$$\text{IPP (\%)} = \frac{\% \text{nitrogênio solúvel em TCA} \times 100 \%}{\text{nitrogênio total}}$$

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da composição proximal e análises físico-química foram tratados por análise de variância (anova) e a comparação de médias foram realizadas pelo teste tukey no nível de significância de 5%. a análise estatística foi realizada através do software R

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar o entendimento e melhor apresentação de resultados, separou-se em tópicos de análise por composição centesimal, avaliação do pH, acidez titulável e evolução da proteólise, e capacidade de sequestrar radicais (DPPH).

5.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

Todos os componentes não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos no tempo inicial do estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito da maturação sobre a composição proximal dos queijos maturados por *L. lactis* e *L. cremoris* (C), *E. faecium* (T1) ou a combinação de *L. Lactis*, *L. cremoris* e *E. faecium* (T2) ao longo dos 60 dias de maturação a 14°C

Componentes	Tempo (dias)	Tratamentos		
		C	T1	T2
Umidade (%)	0	53,06 ± 2,03 ^{aA}	53,74 ± 2,02 ^{aA}	52,13 ± 2,08 ^{aA}
	60	37,90 ± 4,34 ^{aB}	39,87 ± 3,14 ^{aB}	35,91 ± 6,65 ^{aB}
Extrato Seco Total (%)	0	46,94 ± 2,03 ^{aB}	46,26 ± 2,02 ^{aB}	47,87 ± 2,08 ^{aB}
	60	62,10 ± 4,34 ^{aA}	60,13 ± 3,14 ^{aA}	64,09 ± 6,65 ^{aA}
Lipídeos (%)	0	23,67 ± 1,15 ^{aB}	24,11 ± 0,96 ^{aB}	24,33 ± 0,00 ^{aB}
	60	29,94 ± 1,36 ^{abA}	27,17 ± 0,76 ^{bA}	32,33 ± 1,45 ^{aA}
Proteína (%)	0	16,56 ± 0,47 ^{aB}	15,82 ± 0,56 ^{aB}	17,54 ± 0,18 ^{aB}
	60	21,58 ± 0,84 ^{aA}	22,18 ± 1,49 ^{aA}	22,14 ± 1,36 ^{aA}
Cinzas (%)	0	2,81 ± 0,03 ^{aA}	2,85 ± 0,09 ^{aB}	2,86 ± 0,03 ^{aA}
	60	3,46 ± 0,29 ^{aA}	4,06 ± 0,74 ^{aA}	3,51 ± 0,36 ^{aA}
Cloretos (%)	0	0,84 ± 0,02 ^{aA}	0,91 ± 0,07 ^{aA}	0,79 ± 0,06 ^{aA}
	60	0,93 ± 0,13 ^{aA}	1,04 ± 0,03 ^{aA}	1,00 ± 0,16 ^{aA}

A,B – Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística no nível de 5% ao longo do tempo de maturação.

a,b – Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística no nível de 5% entre os tratamentos.

Fonte: Autoria própria

Após 60 dias de maturação somente o teor de lipídeos apresentou diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os demais componentes não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si.

O teor de umidade reduziu significativamente ($p < 0,05$) após 60 dias de maturação. Todos os tratamentos nos tempos iniciais se enquadraram como queijo de alta umidade com base no regulamento vigente relativo à qualidade de queijos (BRASIL, 1996). Após 60 dias apresentou dentro da classe de queijos de média umidade, cujo a concentração se aproxima ao queijo tipo meia cura (FURTADO, 2005). Isso ocorreu, pois o queijo foi inicialmente maturado sem embalagem durante

7 dias, estes foram virados diariamente, o que contribuiu com a secagem da casca do queijo. Isto colaborou com a redução do teor de umidade de todos os tratamentos.

O tempo de maturação contribuiu no aumento significativo ($p < 0,05$) nos teores de extrato seco total e proteína.

O teor de lipídeos do T2 apresentou significativamente superior ao T1. Ao efetuar a correção do teor de gordura com base em extrato seco, os queijos no tempo inicial apresentaram valor médio de 50%, classificando-os em queijos gordos de acordo com a legislação relativo a identidade e qualidade dos queijos. Após 60 dias estes ainda se enquadram como gordo variando entre 48 e 50% (BRASIL, 1996).

O teor de cloretos dos queijos após 60 dias de maturação apresentou inferior ao mencionado por Furtado (2005) para queijos meia-cura produzido em Minas Gerais, ou seja, 1,5%. Mas, o teor de cloretos apresentou dentro dos limites desejável de sal adicionado à massa na produção, onde todos os tratamentos apresentaram em torno de 1%.

5.2 AVALIAÇÃO DO pH, ACIDEZ TITULÁVEL E EVOLUÇÃO DA PROTEÓLISE

O valor do pH do C no tempo inicial de maturação apresentou significativamente menor ($p < 0,05$) em comparação aos demais tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 – Acidez titulável, Índice de extensão (IEP) e profundidade de proteólise (IPP) dos queijos maturados por *L. lactis* e *L. cremoris* (C), *E. faecium* (T1) ou a combinação de *L. Lactis*, *L. cremoris* e *E. faecium* (T2) nos tempos 0 e 60 dias de maturação a 14°C

Parâmetro	Tempo (dias)	Tratamento		
		C	T1	T2
pH	0	5,12±0,05 ^{aA}	6,26±0,12 ^{bA}	6,29±0,49 ^{aA}
	60	4,98±0,03 ^{bA}	5,28±0,01 ^{aB}	5,08±0,006 ^{abB}
Acidez titulável (% g de ácido lático/100g)	0	0,38±0,02 ^{aB}	0,09±0,01 ^{cB}	0,23±0,02 ^{bbB}
	60	0,68±0,007 ^{aA}	0,42±0,03 ^{bA}	0,61±0,01 ^{aA}
IEP (%)	0	4,53±0,42 ^{aA}	3,85±0,82 ^{aA}	3,47±0,06 ^{aA}
	60	14,13±0,60 ^{aB}	16,69±0,44 ^{bC}	13,94±0,92 ^{aB}

IPP (%)	0	1.35±0,07 ^{aA}	1.40±0,01 ^{aA}	1.26±0,20 ^{aA}
	60	13.10±0,47 ^{aB}	7.6±0,62 ^{cC}	11.18±1,10 ^{bB}

A,B – Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística no nível de 5% ao longo do tempo de maturação

a,b – Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística no nível de 5% entre os tratamentos.

Fonte: Autoria própria

Aos 60 dias de maturação, o pH do T1 apresentou maior valor em relação aos demais tratamentos, demonstrando que o *E. faecium* fermentou o queijo ao longo deste período, mas apresentou menos ácido comparado aos tratamentos que receberam *L. lactis* e *L. cremoris*. Embora Furtado (2005), mencione que o queijo meia cura, maturado com culturas lácticas compostas por *L. lactis* e *L. cremoris* em um período de 30 dias, apresenta o valor de pH entre 5,2 e 5,3. Portanto, com base neste parâmetro físico-químico, *E. faecium* parece ter potencial aplicação na produção de queijo.

O teor de acidez titulável do T1 apresentou significativamente menor comparado ao T2 e este inferior ao C ($p < 0,05$) no tempo inicial de maturação. Houve aumento significativo ao longo da maturação, porém o T1 ainda apresentou estatisticamente inferior comparado aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Estes resultados demonstram que o *E. faecium* parece não ter demonstrado boa atividade fermentativa no tempo inicial na produção deste tipo de queijo. Paula et al (2020) avaliou o desempenho do isolado EFM 55 sob temperatura de 20°C e este demonstrou um desenvolvimento de acidez titulável significativo a partir de 48 h, ou seja, esta cepa necessita de tempo para fermentar. Esta cepa EFM55 foi escolhida neste trabalho, pois apresentou um amplo espectro de ação antagônica frente aos patógenos em queijos e atividade proteolítica. Embora, a acidez titulável não quantifique apenas ácidos orgânicos produzidos pela atividade fermentativa das culturas lácticas, mas também de compostos ácidos resultante da proteólise, lipólise, entre outras atividades metabólicas durante o período de maturação do queijo. Portanto, o aumento da acidez titulável auxilia no monitoramento das atividades de transformação durante o período de maturação, resultando em alteração na textura, desenvolvimento de sabor e aroma dos queijos (FOX, 2004).

Deste modo, para produzir queijos que dependem de uma acidez elevada em tempo inferior a 24 horas, recomenda-se associar o *E. faecium* com culturas lácticas iniciadoras.

No tempo inicial do Índice de Extensão de Proteólise, não foi identificado diferença entre os tratamentos. Aos 60 dias, o T1 apresentou maior valor comparado aos demais tratamentos, ou seja, o *E. faecium* parece ter colaborado com a ação desses agentes sobre as caseínas. Os valores de IEP para esses queijos foram similares aos obtidos em queijo minas padrão maturado por *L. lactis* e *L. cremoris* aos 40 dias de maturação (KATSUDA et al, 2020).

De acordo com os dados obtidos demonstrados na tabela acima, o T1 não alcançou índice de profundidade de proteólise significativo, ao contrário do T2 e C, desse modo conclui-se que o *E. faecium* sozinho não contribuiu com a atividade proteolítica até 60 dias de maturação. Este resultado permitiu observar que essa cepa apresentou um perfil de cultura adjuvante, pois necessita associá-lo a culturas iniciadoras, como *L. lactis* e *L. cremoris*. Esta análise pode ser comprovada ao observarmos o valor obtido para T2, o qual apresentou o mesmo índice do controle.

Ambos os índices foram influenciados pela temperatura, vale ressaltar que os processos produtivos seguiram as mesmas condições de temperatura e ambiente, portanto, a diferença significativa se deve aos microrganismos empregados em cada tratamento (Fialho, 2015).

5.3 DPPH

Na presença de um componente com atividade antioxidante, este doa um átomo de hidrogênio promovendo a redução do radical livre do 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) para a DPPH-H, o qual, diminui a absorbância. Na abaixo (Tabela 3) estão os resultados obtidos dessa análise:

Tabela 3 - Análise de DPPH expressa em equivalente de uM Trolox por g amostra e o desvio padrão dos tratamentos de queijo no tempo 0 e 60 dias de maturação sob temperatura de 14oC

μM trolox por g de amostra
Treatamento

Tempo (dias)	C	T1	T2
0	390,14±73,93 ^{ba}	611,77±94,93 ^{aA}	193,20±49,57 ^{cA}
60	173,14±73,72 ^{bB}	67,85±86,69 ^{aB}	112,04±51,64 ^{cB}

A,B – Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística no nível de 5% ao longo do tempo de maturação

a,b – Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística no nível de 5% entre os tratamentos.

Fonte: Autoria própria

Os valores decaíram ao final da análise, fato que não era esperado, deveria ocorrer o aumento do percentual de inibição resultante da atividade antioxidante durante o período de maturação gerada por microrganismos presentes no alimento (LIMA, 2014).

No tempo inicial de maturação T1, apresentou maior capacidade de redução de radical DPPH, seguido pelo C e depois T2. A inibição elevada no tempo inicial do T1, deve-se a formação de bacteriocinas com capacidade antioxidante como demonstrado por Paula et al. (2020), em conjunto com as frações proteicas do leite que possuem capacidade sequestrante.

Aos 60 dias de maturação, o T1, sofreu uma redução significativa da capacidade antioxidante comparada ao tempo inicial. E esse mesmo tratamento demonstrou a menor atividade em comparação ao tratamento C e T2. A redução de inibição de radical DPPH observado no T1 pode estar relacionada à perda de peptídeos resultante da interação com peróxidos lipídicos, associado a capacidade de quelar íons metálicos reduzindo a propriedade antioxidante (STOBIECKA, KRÓI e BRODZIAK, 2022). Por outro lado, um estudo de Vázquez-García et. al. (2021) avaliou tal atividade em queijo de cabra, constatando que há atividade de inibição correlacionada aos peptídeos presentes no queijo ou por ação de uma cultura starter o efeito antioxidante é demonstrado pela descoloração, portanto, se houver maior descoloração indica maior atividade antioxidante quando expresso em porcentagem de inibição, o contrário é considerado em análises por μM de Trolox por g de amostra.

A família *Enterococcus* demonstrou ser um beneficiador de atividade antioxidante, em virtude da produção bacteriocinas com tal caráter. No entanto, com os dados apresentados na Tabela 3, constatou-se que não houve redução relevante

do radical livre, salientando ineficiência do EFM 55 em fomentar a redução de radicais livres considerando que de extrato inibiu apenas 67,85 uM Trolox por g amostra e seu desvio padrão é maior que o valor de equivalência.

6. CONCLUSÃO

Não foi observado diferença significativa na composição proximal de todos os tratamentos no tempo inicial de maturação. Aos 60 dias, o teor de lipídeos do T1 apresentou abaixo dos demais tratamentos. O teor de umidade diminuiu enquanto o teor de extrato seco total, lipídeos, proteínas e cloretos aumentaram aos 60 dias de maturação.

O T1 apresentou maior pH e menor acidez titulável ao longo do tempo de maturação.

O IEP do T1 foi maior comparado aos demais tratamentos aos 60 dias de maturação. Por outro lado, o IPP deste mesmo tratamento foi significativamente menor.

O extrato hidrossolúvel do T1 inicialmente apresentou maior inibição ao radical DPPH, porém aos 60 dias de maturação, o C apresentou maior atividade antioxidante.

Este estudo permitiu concluir que o *E. faecium* tem baixa atividade fermentativa, necessitando associá-lo às culturas iniciadoras para promover a fermentação dos queijos. Esta cepa não contribuiu com a proteólise no queijo apesar de apresentar consistência macia. Em queijos frescos, esta cultura apresentou maior atividade antioxidante comparado aos fermentos industriais.

REFERÊNCIAS

AOAC. (2003) Official Methods of Analysis. Vol.I.17th ed. Association of Analytical Washington, DC, USA.

BALDINI, Vera Lúcia Signoreli. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação**. 1998. 208 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BONFIM, Renata M. **Estudo da proteólise de queijo maturado por *Enterococcus faecium***.2019. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Departamento Acadêmico de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2019.

BRANDALIZE, C.C. **Potencial probiótico de *Enterococcus faecium* isolados de queijo**. 2013. 70 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

DE DEA LINDNER, J. **Traditional and innovative approaches to evaluate microbial contribution in long ripened fermented foods: the case of Parmigiano Reggiano cheese**. Dissertation (Ph. D. in Food Science and Technology) - Università degli Studi di Parma, p.128. 2008.

ECK, A. **O queijo**. Coleção Euroagro, [S.1]: Europa-América, v. 1, 336 p, 1987.

FIALHO, Tatiana Lopes. **Identificação e ação antimicrobiana de peptídeos de queijo Minas artesanal da Canastra**. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physic and microbiology: general aspects**. London: Chapman e Hall, v. 1, 1993.

_____. **Cheese: chemistry, physic and microbiology**. London: Elsevier Academic Press, v. 2, 2004.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg Maryland: Aspen Publishers: Inc. Gaithersburg, Maryland, p. 544, 2000.

LUCIANA, Furlaneto Maia et al. Isolation and characterization of potential probiotic enterococci strains from soft cheese flora. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 12, p. 482-487, 2017.

FURTADO, M. M; PAULA, Junio C. J. de; CARVALHO, Antonio F. de. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. Juiz de Fora: **Revista Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**. n. 367/368, p. 19-25, 2009.

FURTADO, M.M. **Quesos tipicos de latinoamerica**. São Paulo: Fonte

Comunicações e Editora, 192 p., 2005.

GASPARIN, Katri. **Desenvolvimento de queijo minas curado com adição de enterococcus faecium ef 1, lactobacillus helveticus lh 13 e extrato de cúrcuma (curcuma longa l.)**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em CieCiência em Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015. p. 39.

GIAZZI, Amanda. **Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo minas artesanais e leite cru**. 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação 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. 60, p. 732-738. 1997.

J. A. GÓMEZ-RUIZ et al. Identification of ACE Inhibitory Peptides in Different Spanish Cheeses by Tandem Mass Spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 5, p. 595-601, 2006.

JAY, J. M. et al. Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts. **Int. J. Dairy Tech.**, v. 58, n.1, p. 30-38, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1 ed digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

KATSUDA et al. Caracterização físico-química, aceitação sensorial e perfil proteolítico de queijo hipossódico maturado por cultura adjunta. Capítulo 17, p. 415-430 In: Oliveira, A.F. e Shirai, M. S. Tópicos em ciências e tecnologia de alimentos: resultados de pesquisas acadêmicas, São Paulo : Blucher, volume 5, 2020.

KHALIGHI, Amirreza & Behdani, Reza & Kouhestani, Shabnam. (2016). Probiotics: A Comprehensive Review of Their Classification, Mode of Action and Role in Human Nutrition. 10.5772/63646.

LEÃO, Q; VITAL, D. (2020). A Importância dos probióticos no tratamento da intolerância à lactose. *Revista Brasileira de Ciências Biomédicas*. 1. 35. 10.46675/rbcbm.v1i1.6.

OLIVEIRA, Francisco Brisolla de. **Efeito da adição de Enterococcus faecium em queijos de média maturação**. Londrina: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2020.

OGAKI, Mayara Baptistucci et al. Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in Enterococcus species. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1026-1034, 2016.

ONG L, SHAH NP. Influence of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. helveticus* on proteolysis, organic acid profiles, and ACE-inhibitory activity of cheddar cheeses ripened at 4, 8, and 12 degrees C. **J Food Sci.** v. 73, n. 3, p. 111-20, 2008.

PAULA, Priscila Lima Magarotto de. **Caracterização tecnológica de *Enterococcus faecium* isolados de queijos artesanais.** 2019. 63 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos , Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2019.

DE PAULA, Priscila Lima Magarotto et al. *Enterococcus faecium* in artisanal ripening cheese: Technological and safety aspects. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e299119452-e299119452, 2020.

RUFINO, Maria et al. (2007). Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical ABTS+. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico. 127.

SILVA, J.G. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo minas artesanal de Araxá, Minas Gerais.** 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Tecnologia e Inspeção de Origem Animal. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte-MG. 2016.

SILVA, L. F. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de búfala.** Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2010.

SILVA, P. H. F. et al. **Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos.** Revista Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, Juiz de Fora, v. 50, p. 15-29, 1995.

STOBIECKA, M.; KRÓL, J.; BRODZIAK, A. **Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products.** *Animals* 2022, 12, 245. <https://doi.org/10.3390/ani12030245>

VÁZQUEZ-GARCÍA, Rosa et al. Preliminary Study of Extended Ripening Effects on Peptides Evolution and DPPH Radical Scavenging Activity in Mexican Goat Cheese. **Catalysts**, v. 11, n. 8, p. 967, 2021.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

YERLIKAYA, Oktay; AKBULUT, Necati. Potential use of probiotic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains in Izmir Tulum cheese as adjunct culture. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 4, p. 2175-2185, 2019.