UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Curso em Medicina Veterinária

Ana Carolina Nacif Amaral

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Lactococcus lactis* GV 103 ISOLADO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL

Unaí/MG

2023

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Lactococcus lactis* GV 103 ISOLADO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Profª. Drª. Cláudia Braga Pereira Bento

Unaí/MG

2023

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Lactococcus lactis* GV 103 ISOLADO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Braga Pereira Bento

Data de aprovação 21/07/2023.

Profa. Dra. Cláudia Braga Pereira Bento
Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Campus Unaí, UFVJM

Prof. Dra. Marília Cristina Sola
Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Campus Unaí, UFVJM

Prof. Dra. Bruna Maria Salotti de Souza
Escola de Veterinária, UFMG

Unaí/MG

2023

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por não ter me deixado desistir diante todos os obstáculos passados durante a caminhada ao longo desses anos. Todos esses desafios me fizeram crescer como ser-humano e como futura profissional. Como diz o ditado popular "Mar calmo nunca fez bom marinheiro".

À minha amada mãe, Cássia, que sempre salientou a importância dos estudos, que me incentivou a estudar mesmo estando totalmente indecisa e que não mediu esforços para que eu concluísse a graduação. Meu maior exemplo de bondade, doação ao próximo e amor. Muito obrigada por todo apoio emocional e financeiro.

Aos meus amigos e colegas de curso de Unaí: Sem vocês provavelmente não teria conseguido persistir neste caminho árduo que é a vivência dentro de uma universidade. Vocês foram essenciais nessa jornada, me ajudaram a manter o pé no chão nos estudos, e mantiveram momentos agradabilíssimos que foram essenciais para a minha saúde mental e alegria diária.

Aos professores que fizeram parte da minha graduação, muito obrigada por todo conhecimento compartilhado.Vocês cumpriram a sua missão em formar profissionais éticos, capacitados e aptos para o mercado de trabalho. Obrigada por todas as dicas, incentivos e claro, por todas as advertências, pois foram elas que me fizeram ser um ser humano e futura profissional melhor e mais preparada.

Em especial, à minha orientadora Cláudia Braga Pereira Bento por ter aceitado me orientar, por sempre ter demonstrado meu potencial desde quando cursei a disciplina de Microbiologia Geral.

À minha supervisora de estágio e componente da banca, Bruna Maria Salotti de Souza, pelas oportunidades, pelo trabalho proporcionado, que desde o ínicio do estágio obrigatório me abraçou e fez sentir em casa de forma inexplicável. À professora Marília por ter aceitado o convite de participar da minha banca e contribuir com essa importante etapa.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri por ter me permitido crescer, amadurecer, criar responsabilidades, desenvolver habilidades que dificilmente outro local iria me proporcionar. Gratidão por me permitir vivenciar um ensino gratuito de qualidade.

Meu eterno agradecimento por todos momentos vividos, por todas pessoas que conheci, que fiz amizade, por todas as dificuldades e por todos aprendizados que certamente levarei para o resto de minha vida.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a cinética de multiplicação da bactéria ácido láctica, avaliar pH e acidez titulável, além da contagem microbiológica por meio da elaboração de um produto de leite fermentado utilizando cultura comercial de *Streptococcus thermophilus* STI12 em associação com a cultura autóctone de queijo Minas artesanal de *Lactococcus lactis* GV103. O leite fermentado com a cultura comercial de *Streptococcus thermophilus* STI12 e a cultura autóctone de *Lactococcus lactis* GV103 alcançou pH de 4,75 após nove horas de fermentação. A acidez titulável ao final do processo foi de 0,751 g de ácido láctico/100 g e contagem de *Lactococcus lactis* GV103. *e Streptococcus thermophilus* STI12 ao final do processo fermentativo de 8,62 $\log_{10}$ UFC/mL e 8,89 $\log_{10}$ UFC/mL, respectivamente. Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas mostraram-se relevantes e promissores, estando dentro dos parâmetros exigidos pela legislação brasileira.

Palavras-chave: Ácido láctico, bactérias ácido lácticas, leite, probióticos

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the multiplication kinetics of lactic acid bacteria, to evaluate pH and titratable acidity, in addition to the microbiological contagion of *Lactococcus lactis GV103* and *Streptococcus thermophilus* STI12, through the elaboration of a fermented dairy product using commercial culture of *Streptococcus thermophilus* STI12 in association with the indigenous culture of artisanal Minas cheese of *Lactococcus lactis GV103*. The fermented milk with commercial culture of *Streptococcus thermophilus* STI12 and autochthonous culture of *Lactococcus lactis GV103* reached a pH of 4.75 after 09 hours of fermentation. The titrated acidity at the end of the process of 0.751 g of lactic acid/100g and contagion of *Lactococcus lactis GV103* and *Streptococcus thermophilus* STI12 final year of the fermentation process of 8.62 log10 CFU/mL and 8.89 log10 CFU/mL, respectively. The results of physical-chemical and microbiological analyzes were relevant and promising, being within the parameters required by Brazilian legislation.

Keywords: Lactic acid, lactic acid bacteria, milk, probiotics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Contagem de *L. lactis* em placa de Petri através do contador de colônias.....16
Figura 2. Curva de crescimento padrão de células em cultura.....17
Figura 3. Descongelamento de BAL *L. lactis* GV103 (A); Ativação em caldo M17 (B).....19
Figura 4. Cepa comercial de *S. termophilus* STI12.....20
Figura 5. Aferição da temperatura do leite durante processo de pasteurização (A) e Inoculação da cepa de *L. lactis* GV103 no leite (B).....21
Figura 6. Aferição de pH em amostra de leite (A) e Amostra de leite base como parâmetro de cor (B).....22
Figura 7. Amostras de leite contendo água sem gás carbônico e fenolftaleína (A) e Titulação de hidróxido de sódio em amostra de leite (B).....23
Figura 8. *Eppendorf* com as diluições.....23
Figura 9. Mensuração do ph durante o processo de fermentação do leite.....24
Figura 10. Acidez titulável avaliada durante o processo de fermentação do leite.....24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Contagem de *Lactococcus lactis* GV103 e *Streptococcus thermophilus* STI12 durante o processo de fermentação do leite. 25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	Bactérias Ácido Lácticas
DTIPOA	Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal
EV	Escola de Veterinária
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GRAS	Generally Recognised As Safe
log	Logarítimo
QMA	Queijo Minas Artesanal
UFC	Unidade Formadoras de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
%	Percentual
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
g	Gramas
mL	Mililitro
p	Peso
v	Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **11**

2 OBJETIVOS **12**
2.1 Objetivo geral **12**
2.2 Objetivos específicos **12**

3 REVISÃO DE LITERATURA **13**
3.1 Leite como matriz alimentar **13**
3.2 Bactérias ácido lácticas e probióticos **14**
3.3 *Lactococcus lactis* **15**
3.4 Crescimento bacteriano **15**

4 MATERIAL E MÉTODOS **19**
4.1 Bactérias ácido lácticas e meio de culturas **19**
4.2 Preparo do leite fermentado **20**
4.3 Cinética de crescimento **21**

5 RESULTADOS **24**

6 DISCUSSÃO **26**

7 CONCLUSÕES **28**

REFERÊNCIAS **29**

1 INTRODUÇÃO

O leite é uma das matrizes alimentares mais populares e consumidas no Brasil e no mundo. Há inúmeros produtos lácteos advindos dele, como os queijos e o leite fermentado. O leite fermentado é um produto com propriedades sensoriais aceitas pelos consumidores, além de possuir microrganismos probióticos que são benéficos para quem os consome regularmente. Há inúmeros microrganismos probióticos que estão disponíveis para o consumo humano isoladamente, juntamente com prebióticos e/ou simbióticos, dispostos em cápsulas, sachês ou adicionados em produtos como os leites fermentados.

Dentre os microrganismos probióticos, as bactérias ácido lácticas (BAL) são o grupo mais estudado atualmente. É válido ressaltar que nem todo probiótico é uma bactéria ácido láctica, do mesmo modo que nem toda bactéria ácido láctica é um probiótico. As BAL são muito requisitadas em estudos de pesquisa devido aos inúmeros benefícios já comprovados, sendo imprescindível que haja cada vez mais pesquisas sobre esses microrganismos com o intuito de averiguar tanto o potencial probiótico quanto o tecnológico.

Existem várias etapas necessárias para avaliar o potencial tecnológico desses microrganismos, sendo uma delas a cinética de crescimento que tem a finalidade de estudar as influências de possíveis fatores intrínsecos e extrínsecos durante o crescimento bacteriano. Para a efetivação da cinética de crescimento é necessário realizar a fermentação que é uma etapa crucial para poder estudar e realizar a cinética de crescimento dos microrganismos, sendo no caso do presente estudo, o crescimento bacteriano de uma cepa advinda de um trabalho de doutorado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e uma cepa comercial.

Com isso, o presente trabalho objetivou estudar e avaliar a cinética de crescimento de bactéria ácido láctica, a contagem microbiológica, além de algumas análises físico-químicas como o a acidez e pH através da produção de leite fermentado com duas culturas, sendo uma autóctone e outra comercial com o intuito de efetuar um sinergismo e diminuir o tempo de fermentação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a cinética de crescimento da bactéria ácido láctica *Lactococcus lactis* GV 103 isolada de queijo minas artesanal.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar e avaliar o pH, a acidez e a contagem bacteriana durante a produção de leite fermentado utilizando *Lactococcus lactis* GV103 associado a *Streptococcus thermophilus* STI12.
- Avaliar o tempo de fermentação da bactéria autóctone (*Lactococcus lactis* GV103) associada a uma cultura comercial (*Streptococcus thermophilus* STI12).
- Verificar se a contagem de *Lactococcus lactis* GV103 e *Streptococcus thermophilus* STI12 atende aos parâmetros determinados pela legislação.
- Verificar se a acidez final no leite fermentado atende aos parâmetros determinados pela legislação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leite como matriz alimentar

Entende-se por leite, sem outra caracterização, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, sob condições de higiene, de vacas bem alimentadas, descansadas e sadias. O leite das demais espécies animais deve intitular-se de acordo com a espécie de que proceda. É permitida a mistura de leite de espécies animais distintas, com a ressalva de que conste na denominação de venda do produto e que seja informada na rotulagem a porcentagem do leite de cada espécie (BRASIL, 2020).

O leite de vaca possui cerca de 87% de água e 13% de elementos sólidos. Entre os elementos sólidos, há cerca de 5% de carboidratos, 3% a 5% de lipídios, 3% a 4% de proteínas e em menores proporções, as vitaminas e sais minerais. Além desses componentes, o leite possui também imunoglobulinas, citocinas, hormônios, nucleotídeos, peptídeos, fatores de crescimento, poliaminas, enzimas e outros peptídeos bioativos (PEREIRA, 2014; BRITO *et al*, 2021a).

O leite é a principal matéria prima para a obtenção e produção de diversos produtos derivados lácteos com características típicas e singulares, tendo como produtos principais, os diferentes tipos de queijo, iogurte, requeijão, doce de leite, além da manteiga, leite fermentado e vários outros produtos. Dessa maneira é importante que a matriz alimentar escolhida possa favorecer e garantir a manutenção da qualidade até que o produto seja consumido (FREIRIA, 2017; BORGONOVI *et.al*, 2021).

Conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, entende-se por Leites Fermentados os produtos obtidos por meio da coagulação e da diminuição do pH do leite ou do leite reconstituído por meio da fermentação láctica, mediante ação de cultivos de microrganismos específicos, com adição ou não de outros produtos lácteos ou de substâncias alimentícias (BRASIL, 2007).

Os produtos lácteos fermentados em sua maioria, são provenientes de fermentação por bactérias ácido lácticas que são autóctones daquela matriz láctea ou são inseridas. As BAL são empregadas na indústria láctea em forma de fermento lácteo que é constituído por microrganismos selecionados que caracterizam as culturas puras que ao se multiplicarem no leite, conferem aroma, sabor, textura, valor nutricional e conservação do alimento (MELO *et al*., 2020; LOPES; BASTOS; REBELLO, 2023).

3.2 Bactérias ácido lácticas e probióticos

As bactérias ácido lácticas são microrganismos gram-positivos que não produzem esporos, são catalase e oxidase negativos, anaeróbios estritos ou facultativos, não móveis, podendo ser encontradas nas formas de bacilos ou cocos. Possuem um pH ótimo de crescimento entre 4,0 e 4,5 com temperaturas ótimas de crescimento de 30°C para espécies mesófilas e de 42°C para as espécies termófilas (SABO *et al*., 2014; MÖRSCHBÄCHER *et al*., 2018; RIO *et al*., 2019).

Os microrganismos pertencentes ao grupo das BAL são subdivididos de acordo com o metabolismo do carboidrato em homofermentativas e heterofermentativas. O grupo das homofermentativas utilizam a via Embdeb-Meyerhof-Parnas, para transformar carboidratos principalmente em ácido láctico, sendo compostas pelos gêneros *Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus, Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*. As BAL heterofermentativas, utilizam a via fosfoacetolase para produção de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol, acetato e citrato e são gêneros que compõem este grupo *Leuconostoc, Weisella* e alguns *Lactobacillus* (REIS *et al*., 2011; IKEDA *et al*., 2013; ALLOUI *et al*., 2013).

As BAL são consideradas os organismos probióticos com maior representatividade dentre o grupo, as quais possuem papeis importantes durante o processo de fermentação, como a produção de ácido láctico, melhorias nas características tecnológicas (física, química e sensorial), melhoria na segurança dos alimentos e redução do teor de lactose (JERONYMO-CENEVIVA *et al*., 2014).

Esses microrganismos são amplamente utilizados na produção de alimentos como leites fermentados, iogurtes, queijos, bebidas alcoólicas e embutidos cárneos. As BAL contribuem para o aumento da vida útil do alimento mediante a diminuição do pH ou até mesmo pela síntese de peptídeos que atuam de forma antagonista com outras bactérias (FREIRE *et al*., 2021).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), os probióticos são microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, são capazes de oferecer benefícios ao hospedeiro (HILL *et al*., 2014).

Os probióticos podem estimular o sistema imunológico através da produção de imunoglobulinas (anticorpos), da fagocitose contra patógenos intestinais, além da inibição de forma competitiva e produção de compostos antimicrobianos. Podem também promover o estímulo da motilidade intestinal que contribui com o alívio da constipação intestinal,

otimizam a absorção de determinados nutrientes, melhoram a utilização de lactose aliviando os sintomas de intolerância à lactose, além de serem capazes de diminuírem os níveis de colesterol e possuem efeito anticarcinogênico. Quanto à dosagem recomendada, embora não haja uma definição, há autores que recomendam a concentração mínima de > 6 log UFC/g no produto (PUGLIESI, *et al*., 2014; COSTA *et al*., 2019).

3.3 *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis são bactérias mesofílicas, esféricas, gram-positivas, não esporuladas, anaeróbicas facultativas, pertecentes aos membros da família *Streptococcaceae*, que durante a fermentação do leite, convertem a lactose em ácido láctico (SONG *et al*., 2017; GAUDU *et al*., 2019).

As cepas de *L. lactis* são reconhecidas como "Generally Recognised As Safe" (GRAS) que configura ser seguro para consumo humano e animal, as quais são utilizadas como culturas iniciadoras na indústria de alimentos. Ademais, essas bactérias são utilizadas em aplicações de biotecnologia alimentar para a fermentação, assim como bactérias probióticas em animais e seres humanos (LAROUTE *et al*., 2017; HIGDON *et al*., 2020).

L. lactis produzem enzimas e metabólitos que auxiliam a realçar sabores e aromas dos alimentos. Ademais, possuem atividade protetora contra deteriorantes e patogénos em virtude da diminuição do pH e a produção de bacteriocinas (peptídeos) como a nisina que tem papel bactericida e bacteriostático contra microrganismos patogênicos como o *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes* (GHANBARI *et al*., 2013; SONG *et al*., 2017)

Além disso, há outras propriedades conservantes que estão atreladas ao *L. lactis*, como a produção de metabólitos antimicrobianos como o etanol, diacetil, peróxido de hidrogênio e alguns ácidos orgânicos como ácido láctico, acético e propiônico. Estes antimicrobianos além de evitarem a deterioração, também aperfeiçoam aroma, aparência, cor, textura e sabor (KHEMARIYA *et al*., 2017).

3.4 Crescimento bacteriano

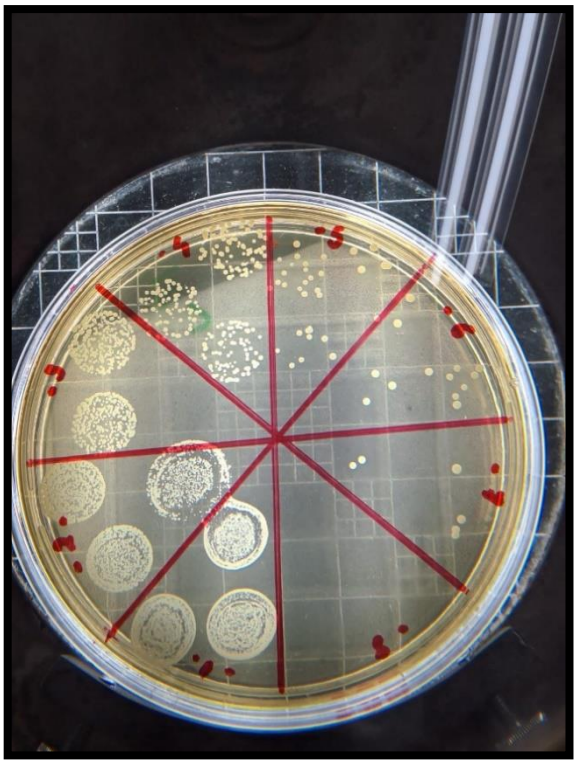
O crescimento de uma população bacteriana tem por definição o aumento do número de células. A taxa de crescimento é equivalente ao aumento do número de células

por unidade de tempo. Existem várias técnicas para quantificar o número de células de uma população bacteriana, como a contagem direta em placa, a contagem manual por contador automático e a técnica do número mais provável de microrganismos (NICOLAU, 2014; SANTANA, 2018).

A técnica de contagem direta de colônias em placas de Petri ainda é o método mais utilizado para medir populações bacterianas. É uma técnica que se destaca, sendo reconhecida como o método de referência, pois possui uma maior precisão do que métodos indiretos de contagem. Possui adicionalmente também como vantagem a possibilidade de contar somente células viáveis além de possibilitar o isolamento de colônias para cultivo em culturas puras (CASSOLI, 2013).

Para a contagem de colônias, pode-se realizar o plaqueamento em meio sólido que consiste em realizar diluições seriadas de uma amostra e em seguida, essas diluições são colocadas em placas de Petri com meios de cultura sólidos e incubadas em temperatura apropriada com o intuito de proporcionar o crescimento bacteriano de colônias isoladas (Figura 1). O plaqueamento em meio sólido pode ser realizado em superfície ou em profundidade, os quais, ambos são métodos que necessitam de tempo de incubação e condições ideais (RABINOVITCH *et al*., 2016).

Figura 1. Contagem de *L. lactis* em placa de Petri através do contador de colônias.

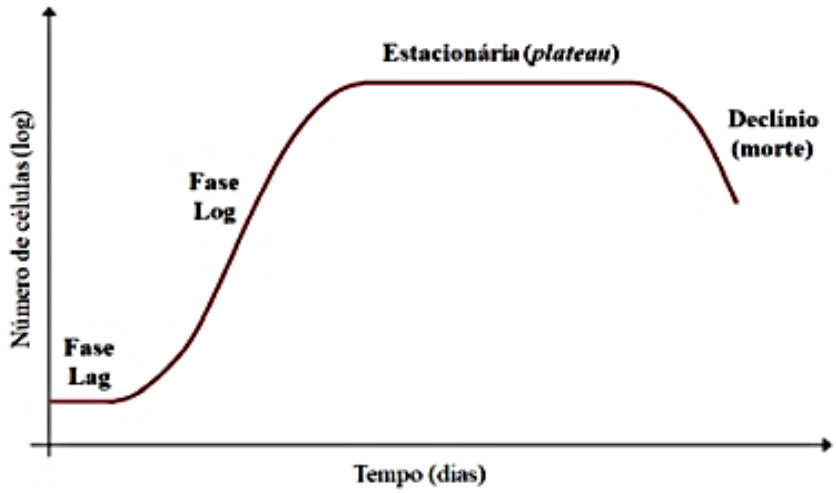


A compreensão do crescimento bacteriano é essencial para avaliar e executar de maneira adequada o processo de tratamento de amostras biológicas. As bactérias se multiplicam de diversas maneiras, sendo a mais comum de forma assexual denominada fissão binária ou cissiparidade durante um intervalo de tempo denominado tempo de geração. O tempo em que as células se multiplicam possui uma variância de acordo com a espécie trabalhada ou a fase de crescimento em que ela se encontra (SANTANA, 2018).

A curva de crescimento bacteriano (Figura 2) possui quatro fases específicas, sendo elas: a fase de latência (fase lag), fase exponencial (fase log), fase estacionária e fase de morte (declínio). Na fase lag os microrganismos estão se adaptando ao meio, não havendo um crescimento populacional. Na fase log, as células já se encontram adaptadas ao meio rico em nutrientes, é a fase onde há a maior atividade metabólica, onde ocorre uma intensa divisão celular alcançando um número constante de células novas resultando no aumento da população. Na fase estacionária, os nutrientes começam a ficar escassos e o crescimento se estabiliza, logo, o número de células que se dividem equivalem aos números de células que morrem. Por fim, na fase de declínio, o número de células mortas ultrapassa o número de células vivas, pois como os nutrientes estão escassos, não há mais crescimento de novas células (LIMA, 2016).

Em vista disso, quando os microrganismos são expostos a um ambiente com condições favoráveis e correspondente às suas especificidades, eles apresentarão crescimento em distintas fases (lag, log ou estacionária). Contudo, quando são submetidos em condições não favoráveis, a população diminui gradativamente (HUANG, 2017).

Figura 2. Curva de crescimento padrão de células em cultura



Fonte: Gonçalves e Sobral (2020).

Inúmeros fatores podem influenciar no crescimento bacteriano, podendo ser dividos em fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos compreendem a atividade de água, pH/acidez, nutrientes que estão disponíveis, disponibilidade de oxigênio, característica da microbiota natural e antimicrobianos naturais. Já os fatores extrínsecos se destacam a temperatura, a umidade relativa, composição atmosférica, e até mesmo a ausência ou presência de luz e a própria embalagem (CRISTIANINI *et al*., 2023).

Dentre os fatores que afetam o crescimento bacteriano, a temperatura é o que mais possui interferência nesse desenvolvimento, pois as bactérias possuem faixas específicas de temperatura ideal para o seu crescimento, sendo que em situações em que elas são submetidas a temperaturas distintas da faixa ideal, elas poderão não crescer ou até mesmo morrerem. Em temperaturas mais baixas que da faixa ideal elas não irão crescer e em temperaturas elevadas, haverá desnaturação de proteínas e enzimas que são essenciais para o metabolismo celular dessas bactérias, tornando o crescimento impossível (SANTOS, 2018; PATEIRO, 2019).

O pH também é um parâmetro importantíssimo que possui influência tanto no crescimento bacteriano, quanto na inibição ou ativação de enzimas, sendo que o ph mais ácido pode beneficiar o crescimento de bactérias que possuem um pH ótimo abaixo da neutralidade e o pH mais básico pode gerar um ambiente desfavorável que tornará impossível o crescimento dessas bactérias, sendo que o inverso também ocorre (NADIA *et al*., 2015; PATEIRO, 2019).

Dessa forma, as pesquisas que envolvem as BAL são essenciais para gerar produtos de qualidade que conferem sabor, aroma e textura incríveis além de possuir efeito benéfico para a saúde de quem consome esses produtos de forma regular como visto no decorrer deste trabalho. Portanto, a cinética de crescimento é um processo importantíssimo para estudarmos e entedermos o crescimento bacteriano frente a diferentes desafios, além de nos auxiliar e possibilitar no entendimento do potencial tecnológico e probiótico desses microrganismos, contribuindo assim com a inovação de novos produtos que poderão futuramente ser comercializados.

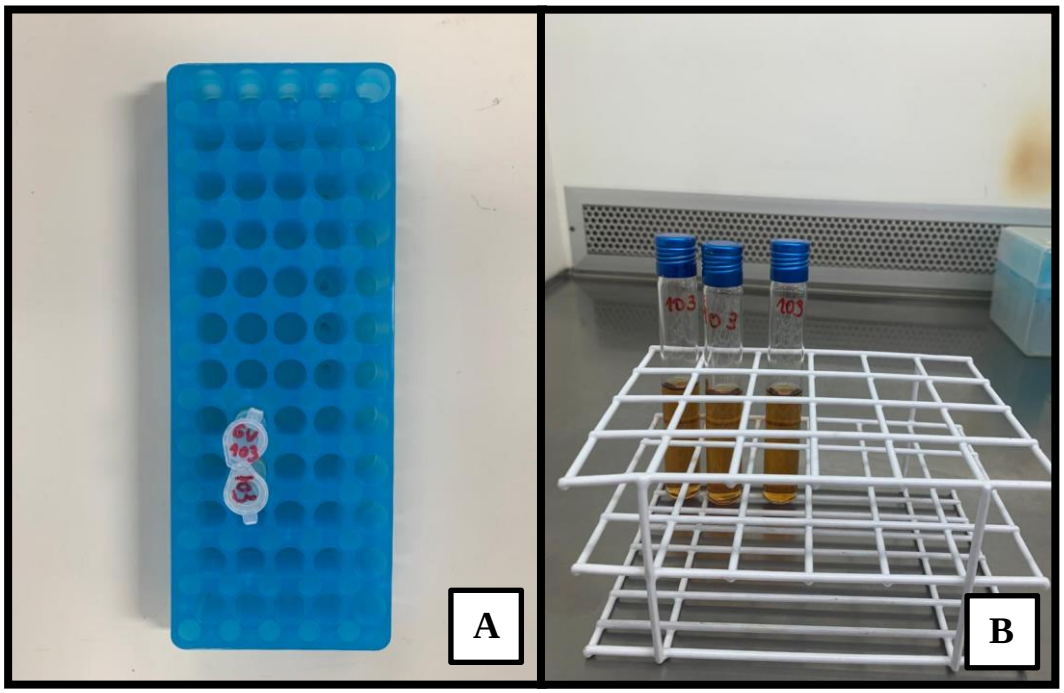
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias ácido lácticas e meio de culturas

Para a efetivação do trabalho, foi utilizada a bactéria ácido láctica (BAL) mesofílica da espécie *Lactococcus lactis* GV103, da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (DTIPOA/EV/UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil. A cepa de BAL utilizada foi previamente isolada do queijo Minas artesanal (QMA) da região de Campos das Vertentes, MG e identificadas por meio da espectrometria de massas MALDI-TOF (VALENTE, 2022).

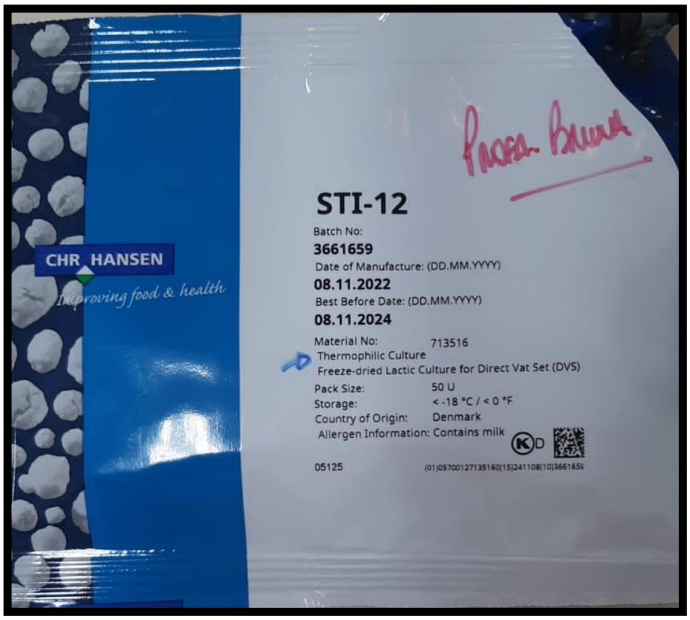
Para o crescimento da bactéria ácido láctica *L. lactis* GV 103 (Figura 3A e 3B) foi utilizado o meio de cultura caldo M17 (Difco ™). O meio de cultura, foi preparado pesando 37,25g de caldo M17 em 950 ml de água destilada. Ao caldo M17 foi adicionado 50 ml de solução de lactose na concentração de 10%. Após o preparo, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Figura 3. Descongelamento de BAL *L. lactis* GV103 (A); Ativação em caldo M17 (B).



Adicionalmente, para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado uma cepa de *Streptococcus termophilus* STI12 comercial (doação Chr-Hansen®) (Figura 4), devido a relação de simbiose entre o *S. termophilus* (STI12) e a cultura de *Lactococcus lactis* (GV103) para a redução do tempo de fermentação.

Figura 4. Cepa comercial de *S. termophilus* STI12.

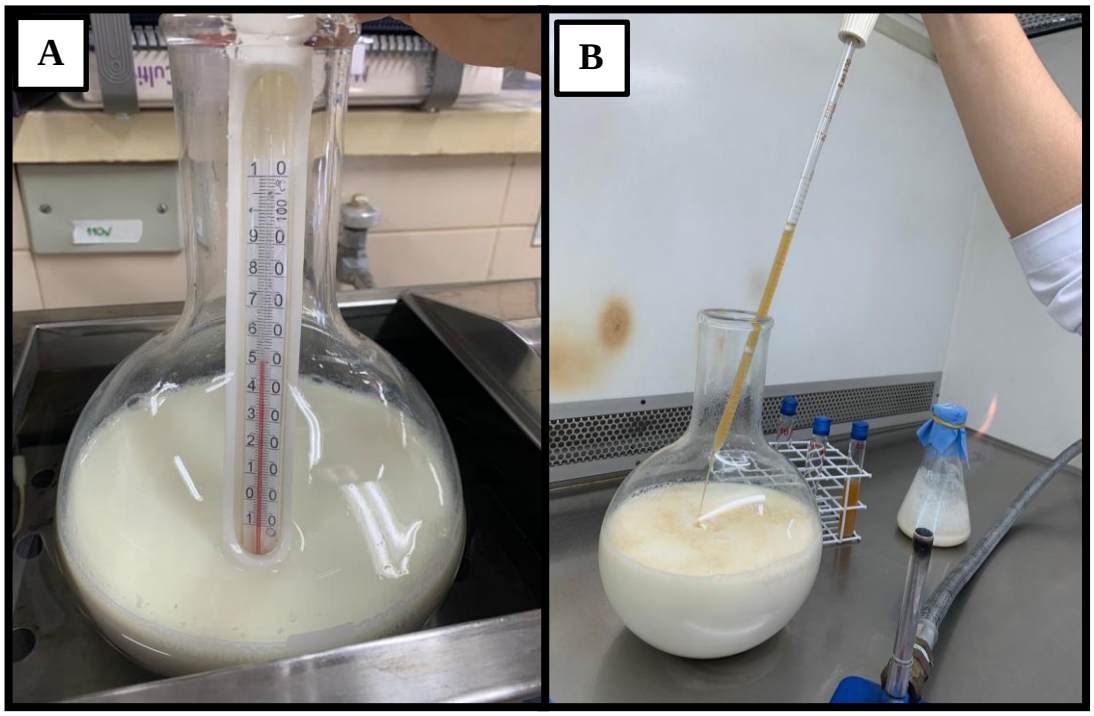


4.2 Preparo do leite fermentado

O leite em pó desnatado da marca Molico (Nestlé®) foi reconstituído em água destilada estéril para atingir 12% de sólidos totais (p/v). À mistura adicionou-se 7% de sacarose. No total foram utilizados 1,2 L de água destilada estéril, 144 g de leite desnatado em pó e 84 g de açúcar cristal branco tipo refinado. Após a homogeneização dos ingredientes, o leite foi submetido a pasteurização, no qual foi tratado termicamente a 90°C por 10 minutos (Figura 5A).

O leite pasteurizado foi dispensado em frasco estéril de 2 L e resfriado a 42 °C em banho de água gelada. Após o resfriamento, o leite foi inoculado com *Lactococcus lactis* GV103 (8 $\log_{10}$ UFC/mL) e *Streptococcus thermophilus* STI12 (8 $\log_{10}$ UFC/mL) (Figura 5B). A fermentação foi realizada em banho-maria (Sl 150 SOLAB) a 42°C até atingir pH de 4,75.

Figura 5. Aferição da temperatura do leite durante processo de pasteurização (A) e Inoculação da cepa de *L. lactis* GV103 no leite (B).



4.3 Cinética de crescimento

Imediatamente após a inoculação das BAL ao leite previamente preparado e pasteurizado foi coletada a primeira amostra para avaliação de pH, acidez titulável e contagem microbiológica. Com o intuito de estimar a taxa de crescimento das BAL, foi realizada a coleta de uma alíquota de aproximadamente 40 mL do produto, a cada 30 minutos para avaliação de pH, acidez titulável e contagem microbiológica. Os dados foram coletados durante a fermentação na qual foi possível obter o pH, a acidez titulável e a contagem do *Lactococcus lactis* GV103 e *Streptococcus thermophilus* STI12 em ágar M17 por meio da técnica de microgotas.

O pH foi obtido através do medidor de pH (pHametro) a cada 30 minutos até o pH de 4,75. Para a mensuração, o eletrodo foi submerso no leite até que houvesse uma estabilização e proporcionasse o resultado final (Figura 6A). Seguidamente, os resultados foram obtidos em triplicatas, ou seja, o pH foi aferido três vezes consecutivas na mesma amostra.

A acidez titulável do leite foi definida por uma titulação ácido-base, através de uma solução padrão de hidróxido de sódio 0,1 N como titulante. Houve mensuração do volume de hidróxido de sódio necessário para neutralização do ácido láctico presente no

leite, sendo o resultado expresso em gramas de ácido láctico/100ml de amostra ou % de ácido láctico (BRASIL, 2006).

No processo da realização da acidez titulável foi necessário utilizar uma amostra de leite base como parâmetro de coloração rósea (Figura 6B) e posteriormente a acidez foi obtida utilizando do aparelho Dornic com corante fenolftaleína 1% (Figura 7).

Para a contagem bacteriana, amostras obtidas a cada 30 minutos foram diluídas até a diluição 10^{-8}. Das diluições, 10 µL foram plaqueados pela técnica de microgota em triplicata em placas de Petri devidamente identificadas para *L. lactis* e *S. thermophilus*. Após 48 horas foi realizada a contagem bacteriana através do contador de colônias e realização dos cálculos de UFC/mL.

É válido ressaltar que para a diferenciação de crescimento em *L. lactis* e *S. thermophilus*, visto que os dois utilizam o mesmo meio de cultura M17, é necessário incubar as placas de Petri em estufas diferentes, pois o *L. Lactis* e *S. thermophilus* apresentam temperatura ótima de crescimento de 30° C e 37°C, respectivamente.

Figura 6. Aferição de pH em amostra de leite (A) e Amostra de leite base como parâmetro de cor (B).

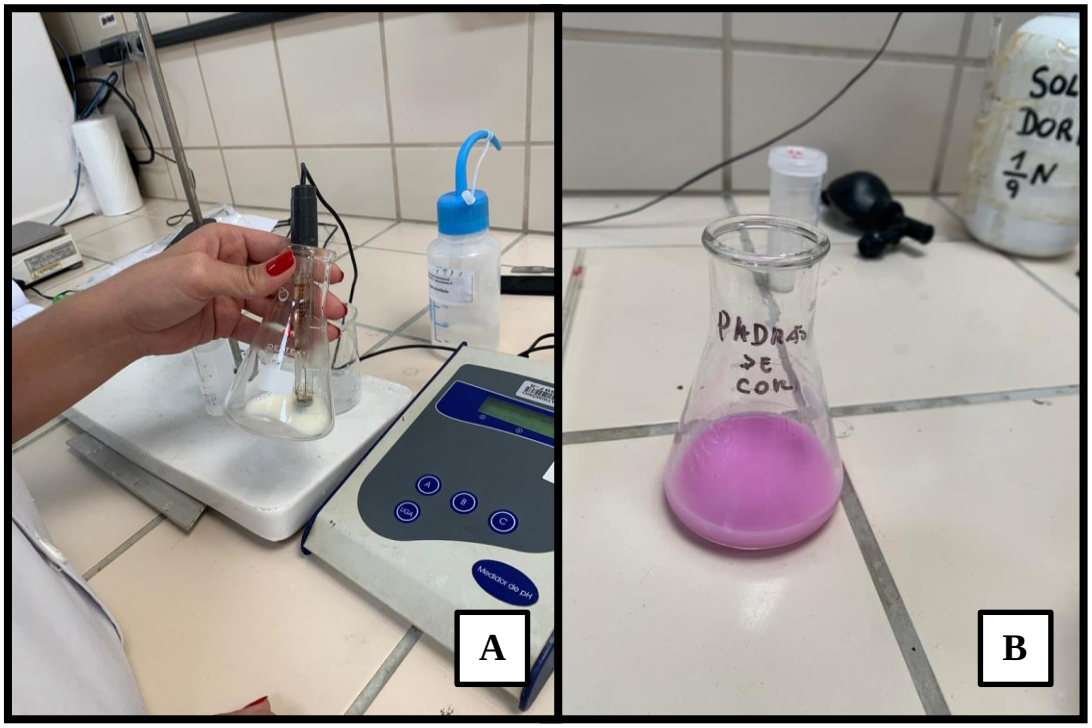


Figura 7. Amostras de leite contendo água sem gás carbônico e fenolftaleína (A) e Titulação de hidróxido de sódio em amostra de leite (B).

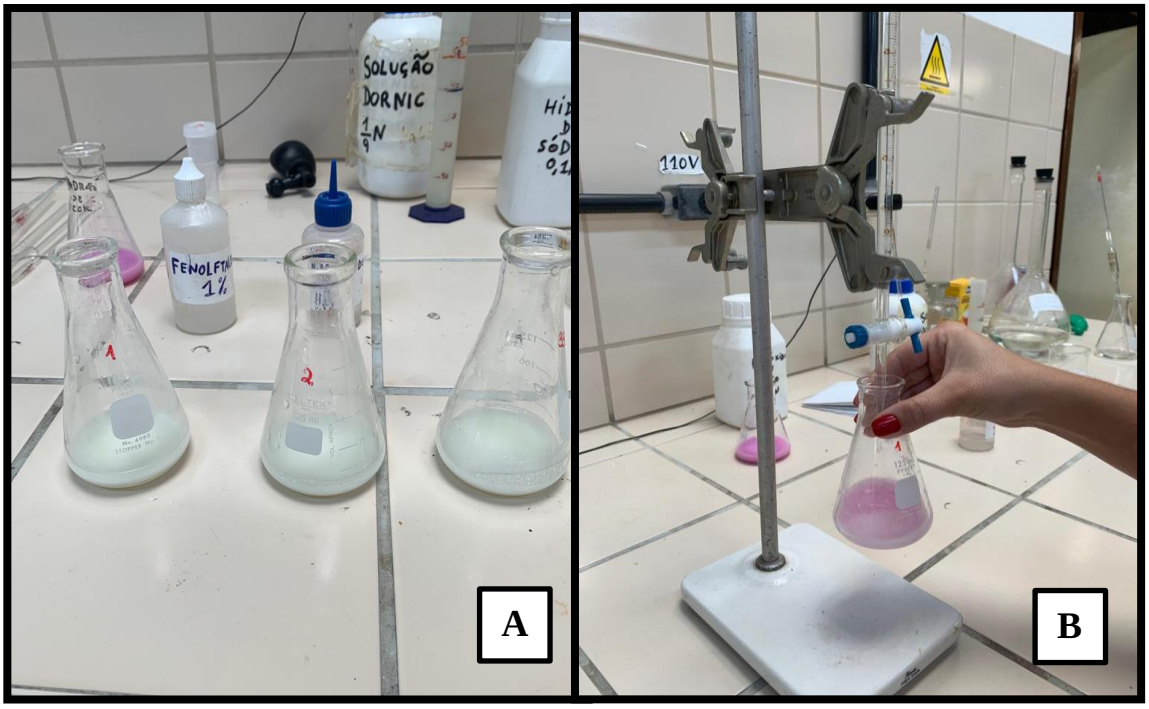
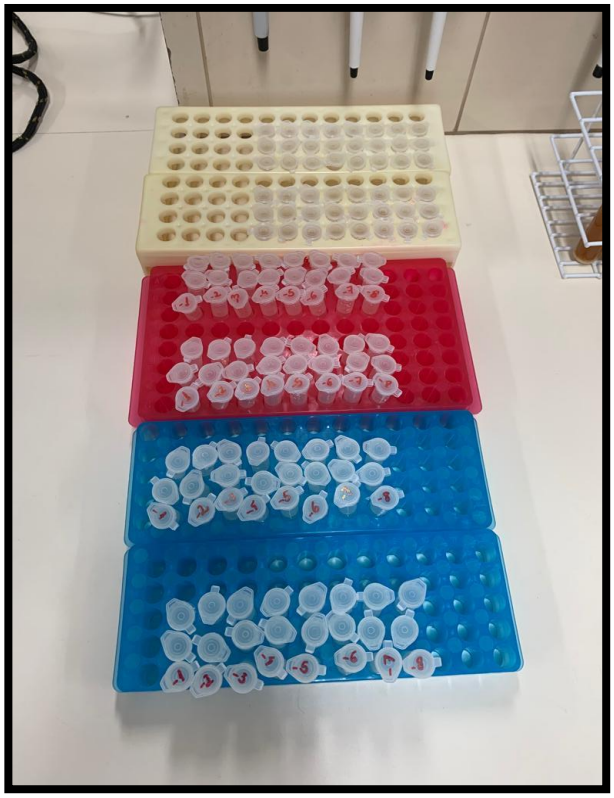


Figura 8. *Eppendorf* com as diluições.



5 RESULTADOS

O leite, logo após inoculação (T0) apresentou pH de 7,06. Durante o processo, foi possível observar o decréscimo do pH que ocorreu gradativamente nas avaliações realizadas durante as 9 horas de fermentação, até que o produto alcançasse o pH de 4,75. Os valores de pH do leite fermentado variaram de 7,06 a 4,75 (Figura 9). A acidez titulável avaliada durante o processo de fermentação demonstrou um comportamento instável, com oscilação nos valores que variaram de 0,223 a 0,751, sendo que em alguns momentos ultrapassou a faixa de 0,800 (Figura 10).

Figura 9. Mensuração do pH durante o processo de fermentação do leite.

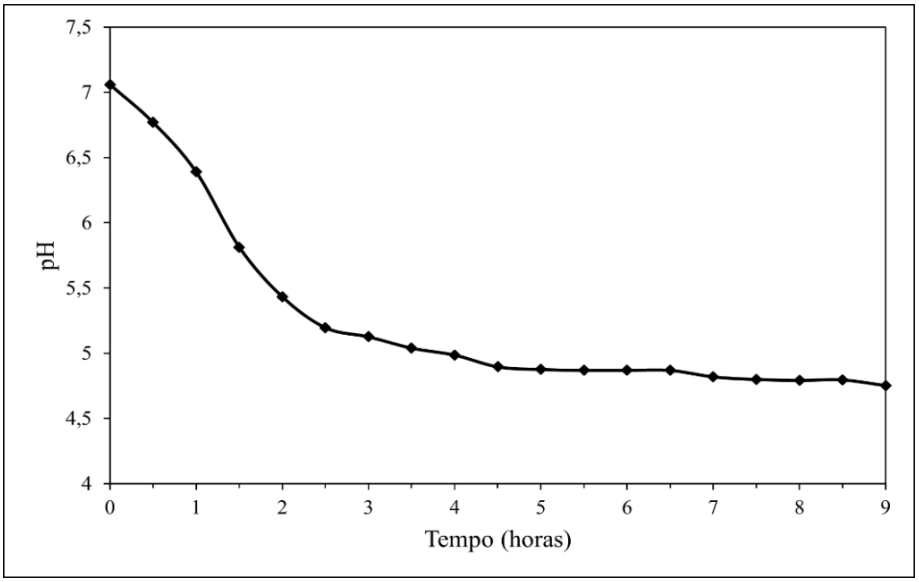
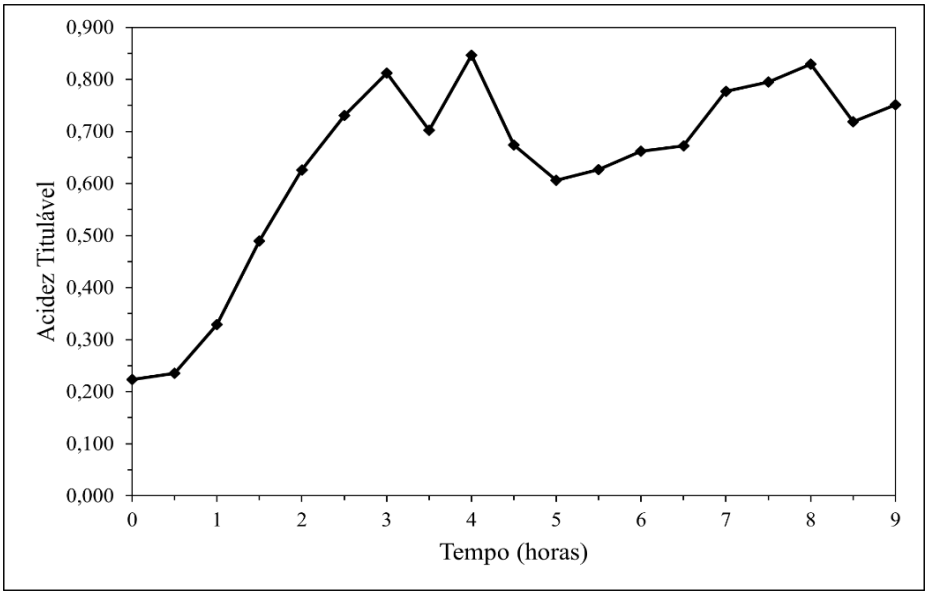


Figura 10. Acidez titulável avaliada durante o processo de fermentação do leite.



O leite fermentado apresentou contagem de *Lactococcus lactis* GV103 e *Streptococcus thermophilus* STI12 ao final do processo fermentativo de 8,62 log_{10} UFC/mL e 8,89 log_{10} UFC/mL, respectivamente.

Tabela 1. Contagem de *Lactococcus lactis* GV103 e *Streptococcus thermophilus* STI12 durante o processo de fermentação do leite.

TEMPO (minutos)	***L. lactis* GV103 (log_{10} UFC/mL)**	***S. thermophilus* STI12 (log_{10} UFC/mL)**
T0 (0 minutos)	6,11	7,32
T1 (30 minutos)	6,79	6,48
T2 (60 minutos)	6,64	7,13
T3 (90 minutos)	7,40	6,98
T4 (120 minutos)	7,58	7,48
T5 (150 minutos)	8,01	9,36
T6 (180 minutos)	8,97	7,46
T7 (210 minutos)	8,44	9,12
T8 (240 minutos)	9,05	9,22
T9 (270 minutos)	9,02	8,97
T10 (300 minutos)	9,22	9,49
T11 (330 minutos)	9,01	9,42
T12 (360 minutos)	7,31	7,91
T13 (390 minutos)	9,03	8,28
T14 (420 minutos)	9,25	9,49
T15 (450 minutos)	8,70	6,95
T16 (480 minutos)	8,48	8,52
T17 (510 minutos)	9,42	9,77
T18 (540 minutos)	8,62	8,89

6 DISCUSSÃO

No processo fermentativo, *Streptococcus thermophilus* é utilizada com o intuito de cultura starter nos fermentados lácteos. Constantemente ocorre a associação de *Streptococcus thermophilus* com uma ou outras espécies dentre as quais se encontra o *Lactococcus lactis.* Sabe-se que essa associação resulta na simbiose entre as culturas, pois *S. thermophilus* apresenta função bioajustadora na fermentação quando estão presentes bactérias probióticas que possuem um crescimento mais lento no processo fermentativo do leite (OLIVEIRA, 2013; SILVA; DIAS, 2021).

No início da fermentação, *S. thermophilus* entra na fase de crescimento exponencial, pois é mais adaptável a um pH neutro favorecendo o seu crescimento, o qual metaboliza a lactose produzindo ácido láctico que beneficia *L. lactis* que é mais adaptável a um ambiente mais ácido. Nessa fase há acúmulo de ácido láctico que favorece o crescimento de *L. lactis* garantindo a fermentação pelo dinamismo de simbiose até que se atinga a acidez esperada (pH 4,5 a 4,7) para assim seguir para etapa de resfriamento (CARNEIRO *et al*., 2015). O tempo de fermentação varia de acordo com a cultura utilizada ou associações simbióticas.

Não há uma legislação que exige um pH específico para leites fermentados, sendo o pH um parâmetro importante para a produção de iogurte, no qual o pH de aproximadamente 4,6 é o esperado como característica tecnológica para fabricação de iogurte, pois esse pH configura o ponto isolétrico da precipitação da caseína, ocorrendo até o final da fermentação a formação do gel característico do iogurte. No presente trabalho, o pH atingiu o valor de 4,75, pH próximo ao valor esperado de 4,6 (CRUZ *et al*., 2017).

A determinação da acidez é de extrema importância pois ela permite mensurar o estado de conservação do leite, considerando que o aumento da acidez é decorrente da produção de ácido láctico produzidos por microrganismos, podendo estar acima do valor exigido pela legislação que configura como seguro para consumo. A acidez também nos fornece uma base para controle de manufaturas de produtos como o queijo e o leite fermentado (BRITO *et al*., 2021b)

A contagem microbiológica é exigida pela legislação, sendo que por definição, o leite fermentado é um produto que possui microrganismos específicos que acidificam o meio através da fermentação láctica, possuindo então uma contagem estabelecida para os mesmos (BRASIL, 2007).

A redução do pH (figura 9) e o aumento da acidez (figura 10) ocorreu devido a capacidade das BAL em produzir ácido láctico. Durante o processo de fermentação ocorre o declínio do pH e a retirada da fonte fermentável que é consumida pelos microrganismos, levando a um ambiente inviável ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (SOUZA, *et al.*, 2022).

A legislação brasileira estabelece que o leite fermentado deverá apresentar acidez de 0,6 a 2,0 g de ácido láctico/100g (BRASIL, 2007). O leite fermentado produzido neste trabalho finalizou sua fermentação com acidez média de 0,751 g de ácido láctico/100 g, estando conforme a legislação.

O Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados, estabelece que a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 6,00 $\log_{10}$ UFC/mL (BRASIL, 2007), sendo que a contagem de *Lactococcus lactis* GV103 e *Streptococcus thermophilus* STI12 ao final do experimento, foi de 8,62 $\log_{10}$ UFC/mL e 8.89 $\log_{10}$ UFC/mL respectivamente, se enquadrando nos parâmetros dispostos pela legislação.

7 CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos pelo presente estudo, pôde-se verificar que *Lactococcus lactis* GV103 apresentou boas características durante o processo fermentativo demonstrando ter um potencial para ser utilizada na produção de leite fermentado, visto que atingiu os parâmentros de acidez e contagem total de bactérias lácticas viáveis exigidos pela legislação brasileira em 9 horas assim como a contagem microbiológica de *L. lactis* GV103 e *S. thermophillus* STI12. Essa contagem adequada possibilita que os microrganismos exerçam seu potencial funcional definido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados.

REFERÊNCIAS

ALLOUI, M. N.; SZCZUREK, W.; ŚWIĄTKIEWICZ, S. The usefulness of prebiotics and probiotics in modern poultry nutrition: review. **Annals of Animal Science**, v. 1, p. 17-32, 2013.

BORGONOVI, T. F.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lacticaseibacillus casei SJRP38 e polpa de buriti aumentaram os compostos bioativos e o potencial probiótico do leite fermentado. **Lwt** ,v. 143, pag. 1, 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAP). Instrução Normativa nº 47, de 23 de Outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 24 de out. 2007, Seção 1, p. 4. Disponível em: https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/ visualiza/index.j sp?data=24/10/2007&jornal=1&pagina=4&totalArquivos=96. Acesso em: 07 de jul. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAP). Instrução Normativa n° 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 8, 14 dez. 2006. Disponível em: https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=14/12/2006&jornal= 1& pa gina=8&totalArquivos=124. Acesso em: 07 jul. 2023.

BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 40, 18 ago. 2020. Disponivel em: https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2020/10/RIISPOA-ALTERADO-E-ATUALIZADO-2020.pdf . Acesso em 07 jul. 2023.

BRITO, M. A., BRITO, J. R., ARCURI, E. F., LANGE, C. C., SILVA, M. R., SOUZA, G. N. **Composição do leite**. Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 8 dez. 2021a. Disponivel em: https: //www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica /criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-eseguranca/qualidade/composicao.Acesso em: Acesso em: 12 mai. 2023.

BRITO, M. A., BRITO, J. R., ARCURI, E. F., LANGE, C. C., SILVA, M. R., SOUZA, G. N. **Acidez Titulável**. Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 8 dez. 2021b. Disponivel em: https: //www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica /criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-eseguranca/qualidade/composicao.Acesso em: Acesso em: 12 mai. 2023.

CASSOLI, L. D. Contagem bacteriana total: Entendendo o processo de análise**. Clínica do Leite– ESALQ/USP**. Piracicaba, SP. 2013. Comunicado N. 013. p. 05-10.

CARNEIRO, C.S. *et al*. Leites fermentados: histórico, composição, características físicoquímicas, tecnologia de processamento e defeitos. **PUBVET**, v. 6, n. 27, p. 21, 2015.

CRISTIANINI, M. *et al*. **Tecnologias emergentes no processamento de alimentos.** São Paulo: BLUCHER, 2023.

COSTA, G.M.; PAULA, M.M.; BARÃO, C.E.; KLOSOSKI, S.J.; BONAFÉ, E.G.; VISENTAINER, J.V.; CRUZ, A.G.; PIMENTEL, T.C. Yoghurt added with Lactobacillus casei and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 139– 148, 2019.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Processamento de Produtos Lácteos - Queijos, Leites Fermentados, Bebidas Lácteas, Sorvete, Manteiga, Creme de Leite, Doce de Leite, Soro em Pó e Lácteos Funcionais**. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2017.

DIAS, S.; CASTANHEIRA, E. M.; FORTES, A. G.; PEREIRA, D. M.; GONÇALVES, M. S. T. Coloring Soy-Based Yogurt Alternative. **Foods**, v. 9, n. 771, p. 1–13, 2020

FREIRE, T. T.; TOLENTINO, A. L.; FERREIRA, B. K. O.; SANTOS, T. M. dos. Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 11, p. 2, 2021.

FREIRIA, E. F. C. **Tecnologia de alimentos**. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2017.

GAUDU, P.; YAMAMOTO, Y.; JENSEN, P.; HAMMER, K.; LECHARDEUR, D.; GRUSS, A. 2019. Genetics of Lactococci. **Microbiol Spectrum.** vol. 8, n. 12, p 1-2.

GHANBARI, M.; JAMI, M.; DOMING, K. J.; KNEIFEL, W. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – a review. **LWT – Food Science and Technology**, v. 54, p. 315-324, 2013.

GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M. V. **Cultivo de células da teoria à bancada**. João Pessoa: Editora UFPB, 2020.

HIGDON, S.; HUANG B.; BENETT, A.; WEIMER.; B. Identification of nitrogen fixation genes in Lactococcus isolated from maize using population genomics and machine learning. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1, 2020.

HILL, C. *et al*. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology &Amp; Hepatology**, v. 11, p. 506, 2014.

HUANG, L. IPMP Global Fit- A one step direct data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 262, n. 4, p. 38-48, 2017.

IKEDA, D. M.; JÚNIOR, E. W.; CHANG, K. C. S.; MCGINN, J. M.; MILLER, S. A.; KELIIHOOMALU, C.; DUPONTE, M.W**.** Natural Farming: Lactic Acid Bacteria. **College of Tropical Agriculture and Human Resources**, p.1-4, 2013.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; PAULA, A. T de.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; PENNA, A. L. B. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo Mozzarella cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, p. 141- 156, 2014.

KELLEHER, P.; MAHONY, J.; BOTTACINI, F.; LUGLI, G. A.; VENTURA, M.;

SINDEREN, D. V. The Lactococcus lactis pan-plasmidome. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 707, 2019.

KHEMARIYA, P.; SINGH, S.; NATH, G.; GULATI, A. K.. Probiotic Lactococcus lactis: A Review. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 5, n. 6, p. 558, 2017.

LAROUTE, V.; TORMO, H.; COURDEC, C.; MERCIER-BONNIN.; BOURGEOIS, P. L.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; DAVERAN-MINGOT, M. L. From Genome to Phenotype : An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of Lactococcus lactis. **Microorgansims**, p. 1–17, 2017.

LIMA, E. B de. **Estudo da cinética de crescimento e resistência de microrganismos S*acharomyces cerevisae e Zymonas mobilis* na presença de cisplatina empregando um sistema fluxo-batelada.** 2016. 65 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

LOPES, D. S.; BASTOS, P. A. M. B.; REBELLO, L. P. G. Avanços da aplicação de bactérias ácido láticas com funções probióticas na produção de fermentados láticos: uma revisão. **Revista Vértices**. v. 25, n. 1, p. 1-19, 2023.

MELO, C. C. S. de.; XAVIER, J. S. da.; SANTOS, B. L. S. dos.; COSTA, C. F. da.; PEREIRA, F. D. S. da.; MENEZES, D. R. **Tecnologias associadas à produção de queijo caprino.** Petrolina: UNIVASF, 2020.

MÖRSCHBÄCHER, A.; DULLIUS, A.; HENRIQUE, C.; BRANDT, C., KUHM, D.; BRIETZKE, D.; MALMANN, F.; PRETTO, H.; ALTMAYER, T.; GONÇALVES, T.; SCHWEIZER, Y.; ORESTE, T.; RIBEIRO, A.; LEHN, D.; VOLKEN, C.; HOEHNE, L. Assessment of selenium bioaccumulation in lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science** , v. 101, n. 12, p. 10626-10635, 2018.

NADIA, O. F.; XIANG, L. Y.; LIE, L. Y.; ANUR, D.C.; AFANDI, M. P. M.; BAHARUDDIN, S. A. Investigation of physico-chemical properties and microbial community during poul try manure co-composting process. **Journal of environmental sciences**, v. 28, p. 81-94, 2015.

NICOLAU, P. B. **Microrganismos e crescimento microbiano.** Portugal: Universidade Aberta, 2020.

OLIVEIRA, M. M. de. Avaliação de leite fermentado probiótico preparado com leite submetido à alta pressão dinâmica. 2013. 123 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

PATEIRO, M.; DOMÍNGUEZ, R.. BERMÚDEZ, R.; MUNEKATA, PE.; ZHANG, W., GAGAOUA, M.; LORENZO, J. M. Antioxidant active packaging systems to extend the shelf life of sliced cooked ham. **Current Research in Food Science**, v. 1, p. 24-30, 2019.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 619-627, 2014.

PUGLIESI, C. F.; SILVA, L. S.; SILVA, R. R. C. da.; OLIVEIRA, R. M. de.; SILVA, R. P. da.; GOMES, T. K. C. de. Probióticos e sua ação na saúde do consumidor. **Revista de Trabalhos Acadêmicos Universo Recife**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2014.

RABINOVITCH, A.; SAREWITZ, S. J.; WOODCOCK, S. M.; ALLINGER, D. B.; AZAR,
M.; DYNEK, D. A.; ROBINOWITZ, M.; SLADE, B. A. Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine, specimens; Approved Guideline. 2.ed. **CLSI GP16 - A2**, vol. 21, n. 19, p. 1- 36. 2016.

REIS, J. A., CASAROTTI, S. N., PAULA, A. T., PENNA, A.L.B. **Probióticos e seus efeitos terapêuticos na saúde humana.** 1 ed. São José do Rio Preto**:** Laboratório Editorial Ibilce, 2011, p.96.

RIO, B.; REDRUELLO, B.; FERNANDEZ, M.; CRUZ.; LADERO, V.; ALVAREZ, M. Lactic acid bactéria as a live delivery system for the in situ production of nanobodies in the human gastrointestinal tract. **Frontiers microbiology**. v. 9, p. 1-16, 2019.

SABO, S. S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J. D. M.; OLIVEIRA, R. P. S. **Food Research International,** v. 64, p. 527-536, 2014.

SANTANA, F. P. **Métodos computacionais para o cálculo na densidade superficial bacteriana em placa de Petri como indicador de infecção urinária**. 2018. 61f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Faculdade Gama, Universidade de Brasília. 2018.

SANTOS, S. P. **Cinética de crescimento de *Salmonella heidelberg* planctônicas e sésseis.** 2018. 54f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo**,** Passo Fundo, 2018**.**

SILVA, C. A. M. da.; DIAS, V. C. **Probióticos e prebióticos: Avaliação do efeito da suplementação com frutooligossacarídeos (FOS) sobre a cinética de fermentação de leite de búfala.** 48 f. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia de alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá – IFAP, Macapá , 2021.

SONG, A. AL., LIONEL, L.A., LIM, S. H. E.; RAHIM, R. A. A review on Lactococcus lactis: from food to factory. **Microb Cell Fact**, v. 16, p. 55, 2017.

SOUZA, P. G., SILVA, R. M. A, G., PONTES, G., MARINHO, H. A. Caracterização físico-química do leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* imobilizados em alginato. **Brazilian Journal of Science**, v.1, p. 30-37, 2022.

VALENTE, G. L.C. **Caracterização microbiológica e físico-química de água, leite cru, soro-fermento, swabs de superfícies e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes ao longo da maturação nas estações de seca e chuva**. 2022. 110f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.