



CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ANDERSON LUNARDI

**BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NÃO INICIADORAS(*NON STARTER LACTIC ACID*
BACTERIA – NSLAB): UM DESAFIO PARA AS INDÚSTRIAS DE QUEIJO**

Ji-Paraná – RO

2020

ANDERSON LUNARDI

**BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NÃO INICIADORAS(*NON STARTER LACTIC ACID*
BACTERIA – NSLAB): UM DESAFIO PARA AS INDÚSTRIAS DE QUEIJO**

Monografia apresentada à Banca Examinadora do Centro Universitário São Lucas, como requisito de aprovação para obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.

.....
Orientador: Prof. Mse. Paulo Henrique Gasparotto.

Ji-Paraná – RO

2020

L961b

Lunardi, Anderson

Bactérias ácido lácticas não iniciadoras (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* – NSLAB): um desafio para as indústrias de queijo / Anderson Lunardi. Ji-Paraná: Centro Universitário São Lucas, 2020.

87 p. il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Centro Universitário São Lucas, Curso Bacharelado em Medicina Veterinária, Ji-Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Ms. Paulo Henrique Gilio Gasparotto

1. Microbiota. 2. Cultura. 3. Fabricação. 4. Fermentação. I. Gasparotto, Paulo Henrique Gilio. II. Bactérias ácido lácticas não iniciadoras (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* – NSLAB): um desafio para as indústrias de queijo. III. Centro Universitário São Lucas.

CDU 637.3

Ficha catalográfica elaborada pelo bibliotecário:
José Fernando S Magalhães - CRB 11/1091

ANDERSON LUNARDI

BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NÃO INICIADORAS (NON STARTER LACTIC ACID BACTERIA – NSLAB): UM DESAFIO PARA AS INDÚSTRIAS DE QUEIJO

Monografia apresentada à Banca Examinadora do Centro Universitário São Lucas, como requisito de aprovação para obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.

.....
Orientador: Prof. Mse. Paulo Henrique Gasparotto.

Ji-Paraná, 29 de Junho de 2020

Avaliação/Nota:

BANCA EXAMINADORA

.....
Orientador: Prof. Mse. Paulo Henrique Gilio Gasparotto.
Centro Universitário São Lucas

.....
Jerônimo Vieira Dantas Filho
Doutorando do Programa de Pós-graduação em Sanidade e
Produção Animal (UFAC)

.....
Prof. Cristiano Costenaro Ferreira
Centro Universitário São Lucas

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus primeiramente, pela vida, saúde e coragem para chegar até aqui. Mesmo com tantas dificuldades pelo caminho, Ele nunca me deixou desistir. Foram inúmeros quilômetros rodados em cima de uma moto para alcançar um objetivo, sol, chuva, buracos, dores no corpo, sustos na estrada, cansaço, tudo superado pela graça de Deus.

Aos meus pais, Antonio Lunardi (in memoriam) e Delurde Adelia Lunardi pelo amor incondicional e apoio. Ao meu pai, que foi meu exemplo de superação, simplicidade e luta que mesmo sem ter muito estudo me ensinou a ser uma pessoa íntegra e de princípios. A minha mãe que sempre esteve do meu lado me ajudando, me apoiando e a cada dia que eu pegava a estrada ela rezava por mim, quando eu pensava em desistir, ela me sustentava.

A minha esposa Nilza que colocou o joelho no chão inúmeras vezes rezando por mim, pedindo que Deus me protegesse e cuidasse de mim nas estradas.

Aos meus irmãos, pelo apoio, pela ajuda que sempre me deram quando precisei.

Ao meu orientador Prof. Paulo Henrique Gasparotto, pela prestatividade, competência e paciência durante todo o período de realização desse trabalho e de vida acadêmica. Terei seu exemplo de profissional e ser humano por toda vida, lembrando sempre de sua humildade.

A todos os meus colegas de turma, que compartilharam comigo as horas de estudo e de conhecimento, sempre me ajudando no que fosse preciso, fazendo com que os dias de estudo se tornassem mais leves.

RESUMO

A microbiota do queijo é composta por bactérias do ácido láctico, que são adicionadas como iniciadores (*starter lactic acid bacteria* – BAL) e culturas adjuntas ou não iniciadoras (*non starter lactic acid bacteria* –NSLAB). Após a fermentação e a prensagem da coalhada, as bactérias iniciadoras atingem altos números, mas sua viabilidade diminui devido à depleção de lactose, adição de sal e baixo pH e temperatura. A autólise inicial libera o conteúdo celular, incluindo nutrientes e enzimas, na matriz de queijo. Durante a maturação, a NSLAB pode atingir densidades celulares de 10^7 – 10^8 UFC/g ao final de vários meses de maturação. O leite cru é a principal fonte do NSLAB, mas também outras fontes, como outros ingredientes para fabricação de queijos e utilização de equipamentos de plantas com biofilmes persistentes, contribuem para a composição do NSLAB. Dependendo da espécie e linhagem, sua atividade metabólica pode contribuir para defeitos ou inconsistência na qualidade do queijo e para o desenvolvimento do sabor típico do queijo. Apesar de exercer uma enorme influência na maturação de alguns tipos de queijos, acredita-se que em torno de 80% dos defeitos de queijos estejam de alguma forma associado às NSLAB, seja por meio da proteólise (descaracterização da textura e *off flavours*), da produção de gás e também a racemização do L-Lactato em D-Lactato, com isso ocorre dificuldade na abertura de olhaduras em alguns queijos com bactérias propiônicas ou mesmo levando a formação de cristais de lactato na superfície dos queijos (pó branco). O objetivo deste estudo foi investigar o impacto causado pelas bactérias NSLAB na produção de queijos. Foram realizadas buscas sistemáticas em bases de dados eletrônicas nacionais e internacionais alcançando inúmeros artigos relacionados, alguns artigos avaliados apresentaram resultados satisfatórios demonstrando o potencial das bactérias NSLAB em causar prejuízos na fabricação do queijo. O presente trabalho visou identificar as bactérias NSLAB e apresentar seus efeitos benéficos na indústria láctea, principalmente contra a presença de patógenos no queijo, graças ao aumento da competição (exclusão competitiva) e também a produção de bacteriocinas, o que pode levar a uma extensão da validade comercial do produto. Em um segundo momento visou apresentar os problemas causados pela bactéria NSLAB na produção do queijo quando não se segue medidas preventivas para o controle da população e da espécie da NSLAB, bem como informar a importância de conhecer a microbiota presente no leite para a fabricação de queijos.

Palavras-Chave: Microbiota. Cultura. Fabricação. Fermentação.

ABSTRAT

The cheese microbiota is composed of lactic acid bacteria, which are added as starters (*starter lactic acid bacteria* - *BAL*) and adjunct or non-starter cultures (*non starter lactic acid bacteria* - *NSLAB*). After fermentation and pressing the curds, the initiating bacteria reach high numbers, but their viability decreases due to lactose depletion, addition of salt and low pH and temperature. Initial autolysis releases cellular content, including nutrients and enzymes, into the cheese matrix. During maturation, NSLAB can reach cell densities of 10^7 – 10^8 CFU / g after several months of maturation. Raw milk is the main source of NSLAB, but also other sources, such as other ingredients for making cheese and using plant equipment with persistent biofilms, contribute to the composition of NSLAB. Depending on the species and lineage, its metabolic activity can contribute to defects or inconsistency in the quality of the cheese and to the development of the typical cheese flavor. Despite having an enormous influence on the maturation of some types of cheeses, it is believed that around 80% of cheese defects are somehow associated with NSLAB, either through proteolysis (de-characterization of texture and off flavors), from gas production and also the racemization of the L-Lactate in D-Lactate, with this there is difficulty in opening glances in some cheeses with propionic bacteria or even leading to the formation of lactate crystals on the surface of the cheeses (white powder) . The aim of this study was to investigate the impact of NSLAB bacteria on cheese production. Systematic searches were carried out in national and international electronic databases, reaching numerous related articles, some articles evaluated showed satisfactory results showing the potential of NSLAB bacteria to cause losses in cheese production. The present work aimed to identify NSLAB bacteria and present their beneficial effects in the dairy industry, mainly against the presence of pathogens in cheese, thanks to increased competition (competitive exclusion) and also the production of bacteriocins, which can lead to an extension of commercial validity of the product. In a second step, it aimed to present the problems caused by the NSLAB bacteria in cheese production when preventive measures for the control of the NSLAB population and species are not followed, as well as informing the importance of knowing the microbiota present in milk for the manufacture of cheese.

Keywords: Microbiota. Culture. Manufacturing. Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre as produções inspecionadas dos principais grupos de queijos produzidos no País em 2013.....	18
Figura 2- Grupos bacterianos predominantes encontrados no Brasil em amostras de leite cru após armazenamento sob refrigeração.....	20
Figura 3: Queijo com produção de gás e rancemização do lactato.....	40
Figura 4: Queijos com defeito de amolecimento e com off flavours.....	40

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2.3	DELIMITAÇÃO.....	13
2.4	RELEVÂNCIA.....	14
2.5	METODOLOGIA.....	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	QUEIJO.....	16
3.1.1	EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO E DA QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL.....	16
3.1.2	PRODUÇÃO.....	17
3.1.3	PRINCIPAIS QUEIJOS PRODUZIDOS NO BRASIL.....	19
3.2	MICROBIOTA DO LEITE CRU.....	19
3.3	MICROBIOTA DO QUEIJO.....	22
3.4	BACTÉRIAS ACIDO LÁTICAS (BAL).....	23
3.4.1	Bactérias que fazem parte do grupo das BAL.....	25
3.4.2	<i>Lactobacillus ssp.</i>	25
3.4.3	Isolamento e Identificação das BAL.....	26
3.4.4	Presença das BAL na Fabricação de Queijos.....	27
3.5	PROTEÓLISE, LIPÓLISE E GLICÓLISE.....	28
3.6	CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO (BAL).....	29
3.6.1	Bactérias Ácido-Láticas Starter (<i>starter lactic acid bacteria</i> - SLAB).....	30
3.6.2	Bactérias do Ácido Lático não starter (<i>Non Starter Lactic Acid Bacteria</i> - NSLAB).....	31
3.6.3	Risco relacionado à contaminação de queijos pelo uso de bactérias do ácido lático (BAL)	31

3.6.4 Processo Fermentativo das bactérias do ácido láctico (BAL)	33
3.6.5 Resistência da BAL a Antibióticos.....	34
3.7 CONVERSÃO DO LEITE EM QUEIJO PELA AÇÃO DAS BACTÉRIAS SLAB E NSLAB	35
3.8 IMPORTÂNCIA DAS NSLAB NA MATURAÇÃO DE QUEIJOS	36
3.8.1 Impacto das NSLAB na qualidade dos Queijos	37
3.8.2 Defeitos em Queijos	39
3.8.3 Estudos do Impacto da NSLAB na Indústria Láctea	40
4. CONCLUSÃO.....	42
5. REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE A	55

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro é dividido em vários setores, o de laticínios tem imenso destaque, tendo por base o valor bruto de produção (VBP) que é originado do setor pecuário, a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil aponta que o setor lácteo nacional representa 24% desse valor, perdendo apenas para o setor de carne bovina e sendo superior, por exemplo, ao setor de produção de carne suína, frangos e ovos (CNA, 2017). A indústria de laticínio possui vários segmentos, dentre eles o setor queijeiro está entre os de maior expressão econômica e comercial. Segundo levantamento realizado pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, a produção de leite no país em 2015 foi em torno de 34 bilhões de litros, dos quais 46% foram destinados à produção de queijos (ABIQ, 2016).

Na fabricação de queijos, as características do produto final são determinadas pelas propriedades físico-químicas e microbiológicas do leite utilizado e pelas etapas envolvidas no processo de fabricação conforme relatado por Dadalt, (2019). As intervenções tecnológicas podem influenciar nos aspectos físico-químicos, definindo o padrão de qualidade do produto maturado (DADALT, 2019).

No Brasil o mercado de queijos possui características específicas quando se refere às definições que são adotadas para que se possa diferenciar queijos comuns, queijos finos (ou especiais) e queijos artesanais conforme descrito por Perry, (2004). Queijos comuns tem fabricação padronizada, não apresentam sabor, aroma e textura destacáveis, como os produzidos pela indústria láctea, incluindo aqueles que possuem denominações regionais, mantidos tradicionalmente pela produção artesanal. No entanto queijos finos ou especiais tem sua produção em curta escala pela indústria, visando atender a uma estratégia comercial, objetivando manutenção de preços elevados e de diferenciação apenas de tamanho, forma e rotulagens. Essa porção do mercado de queijos finos no Brasil possui forte influência da oscilação dos queijos industriais importados que possuam o mesmo nome. (CHALITA et al., 2010).

Com a evolução da produção e comercialização observa-se que ao longo dos anos gerou uma transformação do mercado lácteo brasileiro. Uma dessas transformações está ligada à abertura comercial e a integração econômica, a valorização cambial e também a profissionalização da produção dos produtos lácteos, sendo a mais importante, relacionada à mudança nos padrões de consumo de lácteos da população brasileira, associado a isso, está à

transformação do produto em commodity e a constituição de grandes estruturas industriais (CORREA, 2014).

As bactérias lácticas (BAL) são grupos que tem como principal característica a produção de ácido láctico pela fermentação de carboidratos. São Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidases negativas e anaeróbias facultativas (SILVA et al., 2017). Essas bactérias são muito utilizadas como fermento láctico durante o processo de fabricação de queijos, por conferir características organolépticas como sabor, aroma e textura, agregando valor ao produto final (HUERTAS 2010). As bactérias ácido láctica (BAL) estão sendo encontradas em várias fontes alimentares e também em diversos produtos fermentados como produtos lácteos, carne, bebidas, vegetais entre outros. Essas bactérias estão distribuídas naturalmente pela natureza e podem ser isolados da água, solos, silagens, plantas e também do trato intestinal dos animais e humanos (FONSECA; SANTOS, 2007). Esse grupo de bactérias é caracterizado, portanto, por possuir um metabolismo fermentativo de açúcares no qual o ácido láctico apresenta-se como seu principal produto. As bactérias ácido lácticas (BAL) são associadas a estes produtos lácteos e fermentados de maneira intencional, podem ser adicionadas ou não no início da produção de queijo; quando não adicionadas utiliza-se somente aquelas que já ocorrem naturalmente no leite, levando a uma fermentação espontânea. Certas bactérias do ácido láctico (BAL) são também utilizadas como probióticos sendo adicionadas para conferir benefícios de saúde para os consumidores (FONSECA; SANTOS, 2007).

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Diante da influência das bactérias do ácido láctico não iniciadoras (*non starter lactic acid bacteria* – NSLAB) na qualidade dos queijos, verificou-se que é comum sua presença em indústrias de laticínios principalmente em tubulações e equipamentos por onde circula o leite e setores que compõem o processo de fabricação. Podem também chegar ao queijo através de recontaminação do leite, pois estas bactérias também estão presentes no ambiente da fábrica.

Outro ponto observado é o período em que o leite permanece parado para a pré maturação, seja pela característica do cultivo ou mesmo por questões operacionais. Deve-se evitar esta operação tratando-se de fabricação de queijos, já que isso acaba auxiliando o crescimento das bactérias NSLAB.

Principais defeitos encontrados em queijos relacionados às NSLAB, (descaracterização de textura e *off flavours*), produção de gás, abertura de olhaduras em queijos com bactérias propiônicas ou mesmo formando cristais de lactato na superfície dos queijos (pó branco).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar como a presença das NSLAB impacta na qualidade do queijo, nas indústrias lácteas e na saúde humana, observando os desafios encontrados pela indústria de laticínios para manter um produto inócuo e objetivando atingir a segurança alimentar desejada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o que são bactérias NSLAB e quais são seus impactos na cadeia láctea.
- Identificar como métodos de controle preventivo podem se tornar um diferencial tanto na qualidade do produto, quanto na lucratividade da indústria através da bibliografia.
- Identificar as formas que o controle preventivo pode atuar dentro da indústria através da bibliografia.

2.3 DELIMITAÇÃO

Este projeto de pesquisa delimitou-se em obter informação sobre como as NSLAB (*Non Starter Lactic Acid Bacteria*), podem impactar na qualidade físico-química do queijo, podendo influenciar de forma negativa na produção das indústrias e a produção de um produto de baixa qualidade. Neste contexto, o projeto científico visa apresentar informações para decisões de manutenção e/ou alteração das Boas Práticas de Fabricação (BPF). Este projeto teve como referência pesquisa bibliográfica por meio da busca manual visitando sites e/ou anais de conferências e periódicos em busca dos artigos sobre o tópico pesquisado a também busca automática visitando bibliotecas digitais para buscar artigos de acordo com uma determinada palavra-chave ou conjunto delas.

2.4 RELEVÂNCIA

A escolha do presente tema teve como objetivo abordar um assunto atual e de relevância social, pois aborda uma questão de segurança alimentar e impactos econômicos com base em pesquisa bibliográfica como sites e/ou anais de conferências e periódicos em busca dos artigos sobre o tópico pesquisado. A busca por alimentos de qualidade é crescente entre a população e vem de encontro do que nos é garantido por lei “Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006, por Segurança Alimentar e Nutricional – SAN entende-se a realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras de saúde que respeitem a diversidade cultural e que seja ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentável”.

Estima-se em torno de 50 a 80% dos defeitos encontrados nos queijos estejam relacionados às NSLAB e sua presença em queijos fabricado com leite cru ou pasteurizado tem sido motivo de muitos debates, sabe-se que alterações indesejáveis nas características sensoriais de alguns queijos podem ocorrer. Em muitos alimentos tradicionais (alimentos fermentados), por exemplo, iogurte, queijo, chucrute e outros vegetais fermentados, e azeitonas, as bactérias ácido lácticas desempenham um papel importante na prevenção da deterioração e do crescimento de microrganismos patogênicos (SANDERS et al., 2010). Apesar das LAB e NSLAB serem seguras e benéficas ao homem, a preocupação em relação à algumas cepas apresentarem fatores de virulência resistente a antibióticos é grande, e que esses genes possam ser transmitidos para bactérias patogênicas, mas isso ainda é considerado controverso (ADIMPONG et al., 2012; GIRAFFA, 2012).

Com isso a inclusão de medidas para evitar a contaminação do leite cru por microrganismos, das pessoas envolvidas no processo de produção queijo, limpeza e sanitização das instalações e equipamentos, utilização de água de qualidade e limpeza de tubulação são de extrema importância para produzir um produto de qualidade para o consumidor e evitar prejuízos para a indústria. O uso de Boas Práticas de Fabricação do queijo é recomendado para prevenir esses defeitos tais como: amolecimento, sabor e odor estranho, olhaduras, manchas com um pó branco na casca do queijo, etc. Vale ressaltar que as medidas preventivas precisam ser diárias e em todos os setores, objetivando o máximo de segurança no alimento produzido (MOURA, 2017).

2.5 METODOLOGIA

Esse trabalho é uma pesquisa bibliográfica realizada por meio de consulta na base de dados periódicos capes, repositórios institucionais e relatórios técnicos, acerca da NSLAB (*non starter lactic acid bacteria*), relacionado a defeitos encontrados nos queijos. As pesquisas e coletas de dados foram realizadas no período de fevereiro a junho do ano de dois mil e vinte, a partir de questões levantadas sobre o tema, foram consultadas cerca de 133 obras por meio de revisões bibliográficas, tendo sido empregados artigos científicos, livros e referências em bancos de dados eletrônicos e nas bases bibliográficas: Google acadêmico, Scielo, BDTD, ScienceDirect e o período de consulta foi de 2010 a 2019. Para coleta das informações, foram buscados os seguintes descritores (BAL, NSLAB, bactérias do ácido láctico, maturação dos queijos, microbiota dos queijos, características físico química dos queijos).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 QUEIJO

3.1.1 EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO E DA QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL

No Brasil a pecuária surgiu em 1532 com a chegada de Martim Afonso de Souza que ancorou em São Vicente e desembarcou os primeiros 32 bovinos europeus. João Castanho Dias ilustra em *As raízes leiteiras do Brasil que a primeira ordenha realizada uma vaca*, ocorreu em 1641 numa fazenda nas proximidades de Recife, como sendo o primeiro registro da atividade no País (DIAS, 2012).

Começava aí a atividade mais representativa da economia nacional. O gado da época não era adaptado e não tinha nenhum tipo de especialização. Não havia nenhum tipo de tecnificação, e esse cenário perduraria até o início dos anos 1950, quando o governo federal instituiu normas de inspeção sanitária de produtos de origem animal no Brasil. (JOSAHKIAN, 2018).

A produção leiteira iniciou sua organização a partir de 1952, quando Getúlio Vargas assinou decreto que aprovava o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), tornando obrigatória a pasteurização do leite, bem como a inspeção e o carimbo do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Com o decreto de 1952, foi introduzida a classificação dos leites em tipos A, B e C conforme as condições sanitárias da ordenha, processamento, comercialização e contagem microbiana. A principal diferença entre os tipos de leite era basicamente a contagem bacteriana total (CBT). Esse decreto balizou a busca pela qualidade da produção de leite e permaneceu em vigor até o fim da década de 1990, quando a Portaria 56/1999 do MAPA, que regulamenta a qualidade do leite e dá outras orientações, criou o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) (DURR, 2004).

O programa tinha como alicerce três pilares, entre eles os novos parâmetros regulatórios da qualidade do leite nacional, base da Instrução Normativa 51, vigente de 2002 até 2011 e substituída pela IN 62 (BRASIL, 2011).

Atualmente rege a IN 76 referente à aprovação de regulamentos técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite tipo A e a IN 77 traz os critérios e os procedimentos para produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru, incluindo a organização da propriedade, suas instalações e equipamentos, a capacitação de funcionários e o controle sanitário sistemático (EMBRAPA, 2019).

Estima-se que em 2025 o Brasil produzirá 47,5 milhões de toneladas de leite (VILELA, 2015), volume semelhante ao previsto na literatura para cenários favoráveis (FAO, 2013; VILELA; RESENDE, 2014; BRASIL, 2015;). Já o outlook 2015–2026 da Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (2016) projeta para 2026 uma produção de 44,4 milhões de toneladas, crescimento médio de 2,4% ao ano (FIESP, 2016).

As projeções da Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD) em seu outlook 2016–2025 são menos otimistas – produção de 39 milhões de toneladas em 2025 –, confirmando um cenário de desaceleração da demanda e da oferta mundial por produtos agropecuários na próxima década, com relativa estabilização das cotações internacionais das commodities agrícolas no período (OECD, 2016).

3.1.2 PRODUÇÃO

O início da fabricação do queijo no Brasil, de acordo com o livro do inglês Robert Southey, se deu em 1581, ano em que os Padres Jesuítas montaram um colégio, na cidade de Salvador, a primeira queijaria do País, que utilizava os três ingredientes básicos do queijo: leite, sal e coalho (DIAS, 2016). O leite utilizado para fabricação dos queijos vinha das vacas que os padres trouxeram de Cabo Verde e o sal vinha das minas lusas de Setúbal, considerada as melhores da Europa. No Brasil havia salinas, mas sua exploração era vetada por Portugal para não atrapalhar um negócio de grandes lucros. A obtenção do coalho era muito complicada, já que era derivada de vísceras de tatus, antas, finalidade esta, que esses animais eram abatidos (DIAS, 2016).

Uma questão curiosa seria por que logo os padres fundariam a queijaria? Existiam dois motivos: um deles por apreciarem queijos, o segundo para atrair curiosos índios para a religião, oferecendo-lhe um alimento desconhecido, o que faz dos jesuítas os pioneiros do marketing no Brasil e também foram eles os responsáveis pela cultura da uva e do trigo para terem o pão e o

vinho nas missas (DIAS, 2016). Os Padres Jesuítas tiveram 1.600 queijos desapropriados pelo marquês de Pombal quando este os expulsou do Brasil em 1760, medida esta que inclui várias fazendas e 670 colégios que os jesuítas administravam em quase todas as capitâneas da colônia. O queijo na capitânia de Pernambuco era importado da Holanda por Mauricio de Nassau para alimentar seu exército de mercenários sitiados no Recife e também para o povo da cidade (DIAS, 2016). Curiosamente, Mauricio de Nassau trouxe gatos da Europa para caçar ratos nos depósitos de comida. Nos engenhos de açúcar havia também queijarias que eram tocadas pela dona da casa que se via com dificuldade para obter leite devido à alta mortalidade das vacas pela escassez de chuvas, ataques de morcegos, onças e buracos de tatus (DIAS, 2016).

O primeiro aumento das queijarias no País se deu no ciclo do ouro em Minas Gerais, quando para lá se conduziram inúmeros aventureiros de todo o Brasil e da Europa que almejavam o sonho de ficar ricos da noite para o dia e pagavam valores absurdos pela comida em arraiais desertos de lavouras (DIAS, 2016). Estimasse que um queijo mineiro chegasse custar 800 reais, convertido em moeda de hoje. Dessa forma as queijarias de Minas, pegando uma carona no primeiro surto industrial do Brasil modernizaram-se com a iniciativa do médico Carlos Sá Fortes que montou uma queijaria com máquinas e técnicos trazidos da Europa e fez o primeiro registro, em 1888, de um rótulo de queijo no Arquivo Nacional (DIAS, 2016).

O queijo é conhecido como um concentrado proteico gorduroso, proveniente do coágulo produzido a partir do leite. Apresentado em diversas formas, sabores e aromas, o queijo é proveniente de várias técnicas diferenciadas ou tradicionais, que influenciam de modo direto nas características finais do produto (MELLO; ARMACHUK, 2013).

É possível conseguir a produção de uma grande diversidade de queijos por meio de alterações nos ingredientes, na tecnologia de fabricação, no tipo de leite (bovino, cabra, ovelha, entre outros), no formato e tamanho, no local de fabricação, na adição de condimentos ou corantes tornando o queijo com características peculiares e qualificação própria. Entre os vários tipos de queijo existentes, podem-se citar os queijos que possuem longa maturação, de três meses a um ano, tais como o Parmesão, Cheddar, Provolone e o Grana Padano (CRUZ, 2017).

Os queijos que tem média maturação, de vinte e cinco dias a três meses, são o Muçarela, Minas Padrão, o Canastra, o Coalho, o Colonial e o Serrano, e os de baixa maturação com até 15 dias ou nenhuma maturação o Requeijão e o Minas Frescal (CRUZ, 2017).

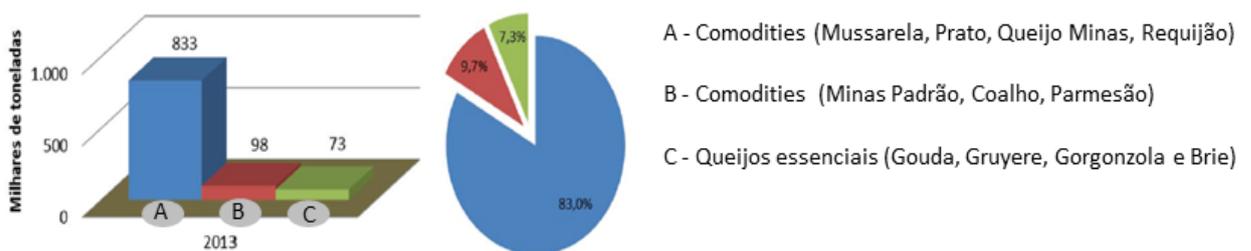
3.1.3 Principais Queijos Produzidos no Brasil

Os principais queijos produzidos no Brasil são: Parmesão, Meia-cura, Muçarela, Mozzarella de búfala, Minas Frescal, Prato, Ricota, Requeijão, Requeijão de corte, Queijo de coalho, Requeijão culinário (Catupiry) (JOLY, 2018).

O queijo Muçarela e o queijo Prato representam cerca de 60% dos queijos vendidos no Brasil e são os produtos mais populares entre os consumidores de baixa renda. O requeijão, por sua vez, é muito consumido pela população de uma forma geral. No entanto as famílias com poder aquisitivo maior, existe grande preferência pelos queijos provolone, parmesão e brie (RABELO, 2015). As variedades com baixa quantidade de gorduras, como é o caso da ricota e do queijo Minas Frescal, agradam a um segmento de mercado em expansão, composto de consumidores adeptos de um estilo de vida mais saudável (RABELO, 2015).

A Figura 1 mostra uma comparação entre a produção inspecionada desses quatro queijos e de outros dois grupos formados pelas *commodities* secundárias (queijos Minas Padrão, coalho e parmesão) e os queijos especiais (gouda, gruyère, gorgonzola e brie), de acordo com levantamento realizado pela ABIQ (PITHAN-SILVA et al., 2016).

Figura 1: Comparação entre as produções inspecionadas dos principais grupos de queijos produzidos no País em 2013.



Fonte: ABIQ (PITHAN-SILVA et al., 2016).

3.2 MICROBIOTA DO LEITE CRU

Devido à sua composição nutricional, o leite é considerado um alimento de imensa importância na nutrição humana. Possui elevado valor nutritivo, é fonte de proteínas, vitaminas

e carboidratos. Essa variedade de nutrientes favorece um ambiente propício ao crescimento de microrganismos desejáveis e indesejáveis na microbiota do leite cru (MENEZES, et al., 2014).

A microbiota que predomina no leite cru é semelhante à encontrada no úbere e na pele dos animais, bem como nos objetos e equipamentos utilizados na ordenha, tendo o predomínio dos micro-organismos gram-positivos (NUNES, 2017). A forma em que ocorre a composição da microbiota do leite é fortemente influenciada pela microbiota existente no ambiente, das técnicas de manejo e instalações das propriedades leiteiras. Essa realidade torna difícil o rastreamento e a identificação das espécies que compõem a microbiota do leite (MONTEL et al. 2014). Segundo Verdier-Metz et al. (2009) e Mallet et al. (2012) as principais práticas que interferem diretamente na composição desta microbiota são a higiene da ordenha, a água utilizada na propriedade e a assepsia realizada nos equipamentos de ordenha e de armazenamento do leite. Associado a estes fatores, também existem algumas espécies de micro-organismos presentes no leite que possuem a capacidade de formar biofilmes nas superfícies dos equipamentos utilizados (MACHADO et al., 2017). Havendo o contato do leite com estes biofilmes, aumenta sua carga microbiana, que pode incluir espécies patogênicas e toxigênicas de micro-organismos (TEH et al., 2012). A comunidade microbiana presente nos biofilmes apresenta maior resistência a agentes sanitizantes devido à dificuldade que estes agentes possuem de penetrar na matriz polimérica que compõe os biofilmes (MARCHAND et al. 2012).

A presença de algumas bactérias psicrotróficas proteolíticas no leite tem a capacidade de formar biofilmes nas superfícies dos equipamentos e utensílios industriais em várias temperaturas (VIANA et al., 2009; NÖRNBERG et al., 2011; CLETO et al., 2012; PONCE et al., 2012; TEH et al., 2012). Desta forma, estes micro-organismos possuem uma maior resistência à ação dos agentes químicos e físicos utilizados na sanitização por produzirem enorme quantidade de substâncias poliméricas extracelulares representando uma barreira de proteção (TEH et al., 2012; 2014). Isolados bacterianos de superfícies internas dos tanques de leite cru demonstraram capacidade de produzir proteases quando estiverem presentes em biofilmes de cultura pura ou em cocultura (TEH et al., 2012; 2014).

O leite cru refrigerado possui uma população de psicrotróficos que inclui bactérias gram-positiva, gram-negativas e compreende principalmente, representantes dos gêneros *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* e *Micrococcus* (MACHADO et al., 2015; PINTO et al., 2015).

Alguns exemplos de espécies de bactérias identificadas em amostras de leite cru no Brasil após armazenamento sob refrigeração estão demonstrados na Figura 2 (MACHADO et al., 2017).

Figura 2- Grupos bacterianos predominantes encontrados no Brasil em amostras de leite cru após armazenamento sob refrigeração:

Grupos Predominantes	Condições de armazenamento	Referências
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Pseudomonas putida</i>		
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		
<i>Serratia liquefaciens</i>		
<i>Serratia odorífera</i>		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	4 C por 2 dias	Pinto et al.
<i>Bacillus sp.</i>		(2015)
<i>Paenibacillus alvei</i>		
<i>Paenibacillus macerans</i>		
<i>Lactococcus lactis subsp. Cremoris</i>		
<i>Lactococcus sp.</i>		
<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>Enterococcus faecium</i>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Acinetobacter spp.</i>	NI	Arcuri et al.
<i>Aeromonas hydrophila</i>		(2008)

NI – A condição de armazenamento não foi informada

Fonte: Adaptado de Machado et al. (2017).

A ocorrência de contaminação do leite por bactérias psicrotóxicas é um ponto que leva preocupação para a indústria de laticínios, pelo fato de muitos produtos lácteos serem armazenados e distribuídos a temperaturas que favorecem o crescimento destes microrganismos. Além de que, uma grande parte desses microrganismos psicrotóxicos que são encontrados no leite são produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas (JONGHE et al.,

2011). Esses tipos de enzimas extracelulares são causadores de deterioração do leite e de produtos lácteos, levando a enormes perdas econômicas (JONGHE et al., 2011).

3.3 MICROBIOTA DO QUEIJO

Os queijos de forma geral podem conter microrganismos desejáveis e indesejáveis. Os microrganismos desejáveis irão contribuir para imprimir características ao produto, como aroma e sabor a determinado tipo de queijo e pertence ao grupo de microrganismos iniciadores, composto por Bactérias ácido-lácticas (LAB) dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, e *Leuconostoc*, e o grupo de microrganismos secundários (RESENDE, 2010). Ainda de acordo com o autor, a microbiota secundária, apesar de não contribuir para a acidez, normalmente desempenha um papel significativo no período de maturação de queijos, influenciando as características sensoriais do produto final. Este grupo de microrganismos inclui as LAB não iniciadoras, como as espécies mesofílicas dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, e outros microrganismos a exemplo de *Brevibacterium*, *Micrococcus*, bactérias corineformes, bactérias propiônicas, bolores e leveduras (RESENDE, 2010).

Segundo descrito por Hayaloglu e McSweeney (2014), pode ser definido como processo de maturação do queijo um conjunto complexo de eventos bioquímicos que envolvem alguns mecanismos de modificação dos compostos orgânicos presentes nos queijos. Estes mecanismos são a lipólise, proteólise, metabolismo da lactose, ácido cítrico e aminoácidos, que podem originar centenas de metabólitos. Segundo os autores, o processo é influenciado por fatores dentre os quais se destacam a composição da microbiota formada durante o processamento. Um dos parâmetros importantíssimos é a acidez por influenciar o crescimento de microrganismos e também a atividade enzimática ao longo da maturação (LAVASANI et al., 2011).

É indispensável uma regularidade nas características do leite cru e correta adoção e manutenção das boas práticas, propõe-se que alterações advindas da maturação de queijos artesanais promovam sanitização e redução na densidade populacional de microrganismos indesejados (GALÁN et al., 2012; WILLIAMS e WITHERS, 2010).

3.4 BACTÉRIAS ACIDO LÁTICAS (BAL)

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grande grupo de microrganismos, normalmente associado a laticínios, devido ao seu uso em alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas, como queijo, leite, carne, frutas e também são encontrados em grande quantidade na natureza. São utilizadas em grande escala na indústria de alimentos em processos de fermentação, e ocorre em algumas situações, que as bactérias ácido lácticas (BAL) podem se tornar desejáveis ou indesejáveis, pois podem contribuir para a formação de sabores, aromas, textura e odor, de forma positiva ou negativa causando uma alteração no alimento (EMBRAPA, 2011).

As BAL são grupos de bactérias que tem como principal característica a produção de ácido láctico pela fermentação de carboidratos. São Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidases negativas e anaeróbias facultativas (SILVA et al., 2017). Essas bactérias também são definidas como microrganismos desprovidos de citocromo e ácidos tolerantes. Dependendo da temperatura ótima de crescimento, essas bactérias podem ter sua classificação em mesofílicas 20-30 °C ou termofílicas 35-45 °C (REIS et al., 2012; GIRAFFA, 2012; ZHANG et al., 2013).

Desempenham um papel multifuncional em aplicações alimentares, agrícolas e clínicas (BINTSIS 2018). O uso de BAL na fermentação de alimentos é uma das antigas técnicas conhecidas de preservação de alimentos. Produtos lácteos fermentados, como iogurte e queijo, apareceram na dieta humana cerca de 8.000 a 10.000 anos atrás. Até o século 20, a fermentação de alimentos permaneceu num processo não regulamentado e, a descoberta e caracterização das LAB mudaram os pontos de vista sobre a fermentação de alimentos (HAYEK; IBRAHIM, 2013). O método tradicional para a fabricação de produtos alimentícios fermentados era a "inoculação" dos alimentos com uma amostra de um produto do dia anterior. Este método tem algumas desvantagens, principalmente uma grande flutuação na qualidade do produto, mas ainda é usado para alguns produtos caseiros. A substituição do *back-slopping* por uma cultura de partida selecionada foi percebida muito cedo como uma necessidade. Atualmente, como a produção de alimentos fermentados é automatizada e produzida em grandes quantidades, com controle total do processo, o uso de culturas iniciadoras comerciais é parte integrante de uma produção bem-sucedida de qualquer produto fermentado (BINTSIS; ATHANASOULAS; 2015).

As BAL são responsáveis por causar transformações na matéria-prima, colaborando para o sabor e textura de produtos fermentados e inibindo a deterioração de alimentos que é causada por outros microrganismos. Diante disso, é considerado o principal grupo de bactérias utilizado na fermentação de alimentos (IKEDA, 2013). Devido às suas propriedades metabólicas, as BAL manifestam significativo efeito inibitório sobre a produção e o crescimento de toxinas de muitas outras espécies de bactérias (DA COSTA et al., 2016).

Além disso, as bactérias ácido lácticas contribuem para a produção ou degradação de exopolissacarídeos, lipídios e proteínas, produção de componentes nutricionais como vitaminas, e utilizadas como culturas funcionais e promoção de efeitos terapêuticos (WEDAJO, 2015; BINTSIS; 2018, PICON, 2018).

Propriedades como adaptações nutricionais, ambientais e de adesão proporcionaram as BAL a capacidade de se adaptar e se apresentar em diferentes ambientes, desde matrizes alimentares como laticínios, carnes, vegetais e pão de fermento. Além disso, as BAL são habitantes comuns das superfícies mucosas humanas, como cavidade oral, vagina e trato gastrointestinal (HAYEK; IBRAHIM, 2013).

As BAL são muito exigentes em relação das suas condições de crescimento, tendo necessidade de fontes de nitrogênio, vitaminas e sais minerais. O metabolismo dessas bactérias pode apresentar duas rotas principais, a homo fermentativa, que tem produção de ácido láctico e a heterofermentativa, com a formação de ácido láctico, gás carbônico, etanol e compostos de flavor (LI et al., 2010).

As Bactérias do ácido láctico homofermentativas mais utilizadas na produção de alimentos são as do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus*, pois o ácido láctico produzido por elas pode ser utilizado em indústrias de alimentos como flavorizante, acidulante, tamponante e inibidor de bactérias deteriorantes em alimentos processados como os produtos de panificação, produtos lácteos, bebidas, cerveja dentre outros (CAPELLARI, 2010; FORSYTHE, 2013). As BAL heterofermentativas principais são *Weisella* spp. e *Leuconostoc* spp., assim como alguns lactobacilos. A produção de ácido por elas assume um papel de aromatizantes nos alimentos em que se encontram, sendo, por este motivo, também empregados em larga escala em indústrias de laticínios (CAPELLARI, 2010; FORSYTHE, 2013).

3.4.1 Bactérias que fazem parte do grupo das BAL

As bactérias que fazem parte do grupo das BAL são dos gêneros *Alloiococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* e *Vagococcus* (CROWLEY et al., 2013). Segundo Sabo et al., (2014) e Loureiro, (2015), as bactérias ácido lácticas de maior importância para a indústria de alimentos destacam-se aquelas pertencentes a onze gêneros: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Bifidobacterium*, *Vagococcus* e *Weissella*, sendo o *Lactobacillus plantarum*, encontrado em uma imensa variedade de alimentos, podendo ser isolado de produtos lácteos, assim como, em produtos fermentados cárneos como salames, salsichas, entre outros alimentos de origem vegetal, como chucrute e vinhos.

Esse grupo de bactérias expressa atividade antagonista contra microrganismos patogênicos e deteriorantes muito importantes em alimentos (BELLO et al., 2010). Alguns estudos identificaram o *Lactobacillus* spp., como sendo o principal gênero de LAB inibidor de microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* (DUARTE et al., 2016; NETO et al., 2013).

3.4.2 *Lactobacillus* ssp.

Entre as espécies de bactérias ácido lácticas, os *Lactobacillus* são os microrganismos de maior expressão, pertencem à lista “Generally Recognized as Safe” (GRAS) do “Codex Alimentarius” e tem sido muito utilizado como probióticos (KEMPKA, 2008). Algumas cepas de *Lactobacillus acidophilus* estão sendo utilizadas na fabricação de queijos e iogurtes com funcionalidade probiótica (XING et al., 2014) e o *Lactobacillus rhamnosus* é a espécie desse gênero com maior comercialização no mundo para emprego em produtos probióticos (RASINKANGAS et al., 2014).

O gênero possui mais de 100 espécies que são classificadas em três grupos, os quais são classificados de acordo com o produto final da sua fermentação em: *Lactobacillus* termofílicos homofermentativos obrigatórios, que fermentam apenas hexoses e ácido láctico; *Lactobacillus*

mesofílicos heterofermentativos facultativos, que são capazes de fermentar outras fontes de carbono além das hexoses, produzindo ácidos orgânicos, ácido lático, gás carbônico, etanol e peróxido de hidrogênio e *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos obrigatórios, que utilizam obrigatoriamente hexoses e pentoses como fonte de carbono, fermentando hexose a ácido lático, ácido acético, etanol e gás carbônico (LAHTINEN et al., 2012).

3.4.3 Isolamento e Identificação das BAL

A forma de identificação da BAL pode ser realizada através de seu crescimento em meios de cultura seletivos, seja em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) ou M17, testes bioquímicos e fisiológicos, pode ser usado também coloração de Gram e as provas de catalase e urease, e moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (RESENDE et al., 2011; SILVA, 2016). Para isolamento destas bactérias os meios mais utilizados estão o ágar M17, mais seletivo para bactérias com morfologia de cocos, o ágar Rogosa acidificado ou ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe), para bactérias com morfologia de bacilos (CARVALHO, 2007; SILVA, 2016).

A identificação do fenótipo das BAL é realizada através de meios de cultura seletivos, através da técnica de coloração de Gram e posteriormente a bacterioscopia, que permite a verificação das características morfológicas, ou seja, se são cocos ou bacilos, permitindo uma identificação presuntiva de triagem ou confirmatório (PEREIRA, 2017). O teste de catalase também é de extrema importância na triagem das BAL, pois são catalase negativa. Apesar de ser um método relativamente sensível, pode ter suas limitações devido à dificuldade de discriminar algumas espécies e cepas. Dessa forma, é necessária a utilização de outros testes para classificar em gênero e espécie, como a PCR espécie-específica, esta técnica tem sido a mais empregada para confirmar a identificação bioquímica de microrganismos (EMBRAPA, 2011).

Vários métodos moleculares têm sido aplicados na identificação e caracterização de microrganismos. Dentre essas, a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) se destaca, pois tem sido bastante utilizada para confirmação e identificação de LAB (GANDRA et al., 2008, PERIN, 2016).

3.4.4 Presença das BAL na Fabricação de Queijos

No processo final da produção dos queijos, as culturas iniciadoras (starter) estão presentes de forma frequente em quantidades superiores a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de queijo durante a fase de maturação, as Bactérias Acido Láticas dominam a microbiota presente (STEELE et al., 2013). A presença dessas bactérias, embora possuam como principal função a produção de ácido lático no decorrer do processo fermentativo, tem uma atuação muito importante na maturação dos queijos, visto que suas enzimas estão envolvidas de modo direto nos processos de proteólise, lipólise e conversão de aminoácidos em compostos aromáticos (SLATTERY et al., 2010). A primeira fonte de enzimas do queijo é sua microbiota que influencia no desenvolvimento do aroma (STEELE et al., 2013). Hayaloglu e McSweeney (2014) relatam que o processo de maturação de queijos pode ser descrito como um conjunto complexo de eventos bioquímicos que envolvem em torno de três mecanismos de modificação dos compostos orgânicos presentes nos queijos. Estes mecanismos são a proteólise, lipólise e o metabolismo da lactose, ácido cítrico e aminoácidos, que podem originar centenas de metabólitos. Os autores descrevem que o processo é influenciado por fatores dentre os quais se destaca a composição da microbiota formada durante o processamento do queijo.

As bactérias lácticas (BAL) que são utilizadas na produção de queijos podem ser mesofílicas ou termofílicas. Culturas mesofílicas são basicamente compostas por *Lactococcus lactis*, que produzem ácido lático em temperaturas que variam de 38°C a 40°C (BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

A atuação dessas bactérias é importante para controlar a acidificação da massa até a formação da coalhada. Desta forma a diminuição do pH apenas pela ação do coagulante levaria à retenção deste coagulante na coalhada, e as reações que ocorrem pela proteólise continuariam durante o processo de maturação do queijo, o que desencadearia quebra gradual da estrutura do queijo e defeitos de sabor (BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

Para as indústrias produtoras de queijo, os microrganismos exercem funções importantes que contribuem para a maturação do queijo e contribuem na textura, sabor e no aroma do produto; e podem ser divididos em culturas iniciadoras (starter) ou culturas adjuntas, também denominadas de culturas secundárias (TAMANINI et al., 2012).

Um efeito benéfico das BAL é a sua capacidade de auxiliar na garantia de inocuidade de produtos alimentares. Alguns estudos já mostraram que as BAL desempenham atividade inibitória considerável sobre microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes nos

alimentos (NERO et al., 2008; DAL BELLO et al., 2010; MORAES et al., 2012; PERIN et al., 2012).

3.5 PROTEÓLISE, LIPÓLISE E GLICÓLISE

Ao longo do processo de maturação dos queijos, acontecem processos bioquímicos, químicos e físicos, que irão acrescentar transformações correspondentes à proteólise, lipólise e glicólise, que deverão desempenhar grande influência sobre o sabor, aroma, textura dos queijos e outros fatores que afetam diretamente a composição do produto final (FIALHO, 2015).

Dentre as alterações acontecidas na maturação à proteólise o principal fenômeno que ocorre na fabricação de queijos, uma vez que, a produção de aminoácidos e peptídeos irá propiciar aroma e sabor ao alimento. No decorrer do fenômeno da proteólise, também ocorrerá mudanças no pH em função da formação de amônia, alterações na textura em função da quebra de proteínas e maior ligação de água pelos grupos formados, amino e carboxílicos (FOX et al., 2000; SANTIS, 2016).

O fenômeno da proteólise leva a mudanças na textura do queijo por meio da hidrólise da matriz proteica, gerando aumento da capacidade de retenção de água resultante da quebra das ligações peptídicas e consequente liberação de grupos carboxílico e amino e o aumento do pH devido a liberação de amônia (UPADHYAY et al., 2004).

O desenvolvimento da textura do queijo pode ocorrer através da matriz de proteínas, diminuição do a_w ou, então, indiretamente por um aumento do pH causado pela liberação de amônia dos aminoácidos produzidos por proteólise. A formação do aroma e do sabor pode dar-se de forma direta através da produção de pequenos peptídeos e aminoácidos ou, indiretamente, pela liberação de aminoácidos que agem como substratos de diversas reações catabólicas (COSTA 2012). A reação da proteólise na fabricação dos queijos pode ser catalisada por proteinases e peptidases, e pode possuir origens diferentes, como pela flora adventícia do leite, o coagulante ou pela microflora secundária (COSTA 2012).

As bactérias ácido lácticas (BAL) presentes na flora adventícia do leite contam com uma proteinase que colabora para a cura do queijo através da hidrólise de peptídeos de pequena e média dimensão produzidos a partir da caseína pela ação de coagulantes como a quimosina ou a plasmina. As BAL associadas à flora adventícia do queijo desenvolvem-se ao longo da

maturação. As proteinases e as peptidases destas bactérias são normalmente semelhantes às da flora adventícia e colaboram para a cura de um modo semelhante. Em algumas variedades de queijo é motivado o desenvolvimento de microflora secundária, a qual, por vezes, é deliberadamente adicionada. A grande maioria destes microrganismos contém uma atividade enzimática forte, incluindo proteinases e peptidases que contribuem substancialmente para a proteólise nestes casos (COSTA 2012).

Na fabricação de queijos a lipólise, que hidrolisa a gordura a glicerol e ácidos graxos, influencia predominantemente no sabor e no aroma final do produto (ROBINSON et al., 2010).

As enzimas lipolíticas podem ser classificadas como esterases e lipases, sendo que as lipases no queijo podem ter seis diferentes origens: o leite, o coagulante, as bactérias de arranque (starter), os microrganismos secundários bactérias lácticas “NSLAB” e preparações de lipases exógenas (COSTA 2012).

A glicólise tem atuação mais discreta que a proteólise, porém, não menos importante na fabricação do queijo, atua em conjunto com as bactérias lácticas, degradando os açúcares, principalmente a lactose, em ácido láctico, acidificando o meio, influenciando na textura e acidez do queijo (ROBINSON; WILBEY, 2010).

3.6 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO (BAL)

A classificação das culturas lácticas é dividida em bactérias ácido-lácticas starter (*Starter Lactic Acid Bacteria* - SLAB) ou iniciadoras, por terem a capacidade de metabolizar a lactose e, as culturas non starter (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* - NSLAB) ou não iniciadoras ou adjuntas, se evidenciando durante o processo de fabricação e período de maturação dos queijos (LINDNER, 2008).

As espécies de SLAB utilizadas na fabricação de queijos podem ser mesofílicas ou termofílico. As espécies mesofílicas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris* são utilizadas para a produção de queijo. Essas espécies mesofílicas podem ser suplementadas com citrato *Lactococcus lactis* fermentando e várias espécies de *Leuconostoc* para a produção de queijos especiais. Além do SLAB mesofílico, o SLAB termofílico, como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus helveticus* são utilizados para a produção de queijos de massa filata e do tipo suíço. Frequentemente, *S. termófilos* e / ou *Lactobacillus helveticus* podem ser adicionadas às culturas mesofílicas usadas

para produzir queijos com uma mistura meso-térmica. As misturas proporcionam maior robustez do fago e maiores propriedades de sabor (MCSWEENEY, 2017; YVON et al., 1997). Segundo os autores além da fermentação de lactose, as SLAB também são importantes para a degradação da caseína em peptídeos e aminoácidos livres e na biotransformação desses aminoácidos livres em uma diversidade muito grande de compostos aromáticos. (MCSWEENEY, 2017; YVON et al., 1997). As SLAB são responsáveis pela produção de ácido e estão envolvidos no endurecimento durante o processo de fabricação do queijo. (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

3.6.1 Bactérias Ácido-Láticas Starter (*starter lactic acid bacteria* - SLAB)

As bactérias do ácido láctico starter (*Starter Lactic Acid Bacteria* - SLAB) são usadas como culturas de arranque para o processo de fabricação do queijo, podendo ser adicionadas inicialmente ou fazerem parte da microflora natural do leite (WOUTERS et al., 2002). As culturas de arranque ou bactérias starter têm como função acidificar o leite e como consequência dessa acidificação, inibir o crescimento de outras bactérias (WOUTERS et al., 2002; CARMINATI et al., 2010).

As culturas iniciais também podem ser divididas em mesofílicas iniciantes, com uma temperatura ideal de crescimento de 25 a 30 ° C e entradas termofílicas, que crescem melhor entre 40 e 45 ° C. Os iniciantes mesofílicos podem conter apenas estirpes acidificantes ou uma mistura de acidificantes e BAL de fermentação de citrato. A BAL utilizada com mais frequência em culturas iniciantes mesofílicas são *Lactococcus lactis*, incluindo a subespécie *L. lactis ssp. lactis* e *L. lactis ssp. cremoris*, mas entradas indefinidas também podem conter estirpes de *Leuconostoc spp.*, para fermentação de citrato (GATTI et al., 2014).

As culturas iniciadoras termofílicas geralmente incluem cepas de *Streptococcus thermophilus*, normalmente usados para a produção de queijos semiduros e duros. A BAL usa a lactose como fonte de carbono, resultando na produção de altas concentrações de ácido láctico e o crescimento de BAL no leite durante o estágio inicial da produção de queijo (GATTI et al., 2014).

As densidades de células iniciais na maioria das variedades de queijo são aproximadamente 10^8 a 10^9 ufc/g durante o processo de fabricação dos queijos (PARENTE et al., 2017). Durante os primeiros passos do amadurecimento, uma redução substancial na

população SLAB pode ocorrer acompanhada de autólise celular e liberação de enzimas intracelulares, dependendo das características das estirpes utilizadas (STEELE et al., 2013).

3.6.2 Bactérias do Ácido Lático não starter (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* - NSLAB)

A NSLAB provém geralmente do leite sem nenhum processamento, ou seja, in-natura e da fabricação de queijos, e pode variar significativamente de uma fábrica de laticínios para outra (BANKS; WILLIAMS, 2004; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010; SGARBI et al., 2013).

Por outro lado, a bactéria NSLAB, também caracterizado como 'não iniciadora', é encontrada naturalmente no leite cru ou derivam de outras fontes, contaminações em propriedades ou plantas leiteiras e geralmente crescem com atraso durante a maturação do queijo (BERESFORD et al., 2001; KAGKLI et al., 2007). Esse crescimento ocorre à custa de substratos do leite que não são metabolizados pela SLAB ou subprodutos catabólicos de SLAB ou intracelulares nutrientes liberados pelas células SLAB após a autólise (SGARBI et al., 2013; GOBBETTI et al., 2015).

O grupo das NSLAB possui uma grande diversificação. A mais frequente e tecnologicamente NSLAB importante nas fermentações tradicionais de queijo é o genômico grupos de *Lactobacillus*, são heterofermentativo facultativo e mesofílico, fazem parte desse grupo: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum*, vários heterofermentativos obrigatórios *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *E. faecium*, *E. faecalis* *E. durans* (BERESFORD et al., 2001; MONTEL et al., 2014; GOBBETTI et al., 2015).

3.6.3 Risco relacionado à contaminação de queijos pelo uso de bactérias do ácido láctico (BAL)

Apesar das bactérias ácido lácticas (BAL) serem consideradas seguras e que trazem benefícios ao homem, vem aumentando a preocupação com relação aos seus aspectos de segurança, sendo que algumas cepas de gêneros diferentes exibiram a presença de fatores de

virulência, apresentaram também resistência a antibióticos ou tiveram alguma associação relacionada ao desenvolvimento de doenças (ADIMPONG et al., 2012; GIRAFFA, 2012).

Diante da aparente necessidade de desenvolver mecanismos para a definição de prioridades associados com o risco de usar essas bactérias na produção de alimentos, a (European Food Safety Authority (EFSA)) tem considerado que é preciso realizar uma avaliação formal da segurança, assim, um sistema foi proposto para fazer uma avaliação de segurança pré-comercialização de alguns grupos selecionados de microrganismos, levando a concessão de uma "Presunção de Segurança Qualificada" (QPS) (EFSA, 2007)..

Desta forma, a EFSA propôs que a avaliação da segurança de um grupo taxonômico definido, tal como um gênero ou um grupo de espécies relacionadas poderá ser feito com base na confirmação da identidade, possível patogenicidade e uso final (EFSA, 2007). Um dos grandes problemas na abordagem da QPS é a dificuldade de aplicar uma abordagem de estirpe para estirpe de culturas microbianas indefinidas, como são encontradas em diversos alimentos fermentados, como queijos e salames; onde a fermentação é baseada no uso dessas culturas indefinidas e/ou na reutilização de uma porção da produção anterior (ROSSETTI *et al.*, 2009).

Segundo Rossetti *et al.*, (2009), investigações sistemáticas raramente têm sido realizadas, não há base de conhecimento disponível para estes microrganismos, entretanto, em muitos casos, existe uma longa e documentada história de uso seguro de BAL em alimentos.

Um fator de imensa relevância para garantir a segurança da cultura láctica utilizada é a verificação da presença dos genes que compõem a produção das aminas biogênicas. As aminas são bases orgânicas que possuem baixo peso molecular e de atividade biológica, podendo apresentar efeitos tóxicos se forem ingeridas em altas concentrações ou quando a desintoxicação natural do organismo for inibida pela ação de algum medicamento ou por alguma característica genética (GARAI et al., 2007; CALZADA, 2013).

Na formação das aminas biogênicas à necessidade que se tenha a presença de microrganismos que são descarboxilase positiva, característica esta que é observada em muitos gêneros de BAL. Microrganismos que conseguem produzir quantidades consideráveis de aminas biogênicas em condições de processamento não devem ser utilizados como culturas iniciadoras (starter) em alimentos fermentados (LORENCOVÁ et al., 2012).

3.6.4 Processo Fermentativo das bactérias do ácido láctico (BAL)

As bactérias do ácido láctico (BAL) são um dos grupos mais importantes de microrganismos usados na indústria de alimentos, pois possuem o status de (Generally A Asised As Safe (GRAS)) e são usados na fermentação de produtos de consumo comum, como iogurte, queijo e salsichas (PEREIRA et al., 2017). A fermentação com ácido láctico produz ácido láctico e outros metabólitos responsáveis pelas características alteradas e potencialmente pelas atividades biológicas aprimoradas dos produtos obtidos na fermentação (CAGNO et al., 2011; PEREIRA et al., 2017). A definição do fermento láctico compreende em uma preparação microbiana contendo números elevados de células de um ou mais gêneros, espécies e cepas de LAB (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Na elaboração de queijos, sua função está relacionada à produção de ácido láctico, que facilita a ação do coalho e auxilia na expulsão do soro, além do desenvolvimento das características sensoriais do queijo e o controle do crescimento de patógenos (TODESCATTO, 2014). Algumas culturas lácticas autóctones, compostas por bactérias “*starter*” e adjuntas, tem sido selecionada do leite e queijos artesanais a fim de obter um fermento láctico para a produção de queijo fabricado com leite pasteurizado (GONZÁLEZ et al., 2010).

Algumas cepas microbianas específicas têm sido isoladas a partir do leite e adicionadas como culturas *starter* ou adjuntas durante o processo de fabricação dos produtos, a fim de conferir as características sensoriais desejáveis (QUIGLEY et al., 2013). A utilização de culturas lácticas, que apresentam comprovada atividade antimicrobiana, na produção de alimentos fermentados torna esses produtos mais seguros ao consumidor, bem como aumentam a sua vida de prateleira, uma vez que inibem o crescimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos (COSTA et al., 2012).

A produção do ácido láctico ocorre a partir da utilização da principal fonte de nutrientes dessas bactérias que geralmente são os carboidratos, como a glicose (IKEDA et al., 2013).

Segundo Ikeda et al., (2013) as BAL têm grande capacidade de degradar diferentes carboidratos, resultando predominantemente em ácido láctico. Aproximadamente 50% de todo o carboidrato consumido por essas bactérias seja convertido em ácido láctico. Essa conversão ocorre por duas vias metabólicas conhecidas como homo e heterofermentativas. Na via homofementativa, também conhecida como *Embden-Meyerhof-Parnas* ou glicolítica, ocorre a produção quase que exclusiva de ácido láctico.

Nessa via ocorre à formação da frutose-1-6-difosfato que é clivada, por uma aldeose, em di-hidroacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP). Tanto o GAP quanto o DHAP (oriunda do GAP) são convertidos em piruvato que, em condições normais (excesso de carboidratos e pouco oxigênio), é reduzido a ácido láctico. Contudo na via heterofermentativa, que também é conhecida como 6-fosfogluconato/fosfocetolase ou via das pentoses fosfatos, ocorre uma desidrogenação inicial que resulta na formação de 6-fosfogluconato, seguida de uma descarboxilação. A pentose remanescente é clivada em GAP e acetil fosfato. O GAP é metabolizado resultando na formação de ácido láctico enquanto que o acetil é reduzido a etanol por intermédio de reduções de acetil-CoA e acetoaldeído (IKEDA et al., 2013).

3.6.5 Resistência da BAL a Antibióticos

Existe uma grande preocupação com relação à resistência das bactérias ácido lácticas (BAL) a antibióticos, decorrente ao risco de que estes microrganismos transferiram seus genes resistentes à outras bactérias, incluindo as bactérias patogênicas, que por consequência, não terão eficácia nos tratamentos realizados com os antibióticos que primeiramente eram eficaz (ADIMPONG et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Existem dois tipos de resistência das bactérias aos antibióticos: resistência intrínseca e a adquirida. A resistência intrínseca também é conhecida como resistência natural, encontra-se presente em todas as cepas que fazem parte de um determinado gênero ou espécie (COURVALIN, 2006). Essa resistência determina os limites da ação de um antibiótico; essa resistência é cromossômica e não pode ser transferível às outras espécies de bactérias. Entretanto, a resistência adquirida pode acontecer por meio de dois meios diferentes: a mutação ou a aquisição de um gene resistente de outra bactéria por transferência lateral. Na resistência intrínseca ou natural, a resistência é não transferível, já na resistência adquirida, aquele gene adquirido pode ser re-transferido para outra bactéria, tornando-a resistente (COURVALIN, 2006).

As Bactérias lácticas são consideradas prováveis fontes de genes que podem ocasionar resistência a antibióticos. Contudo, o gênero *Lactobacillus* é o que apresenta a maior resistência natural aos antibióticos: gentamicina, bacitracina, ciprofloxacina, cefoxitina, ácido fusídico, metronidazol, canamicina, estreptomicina, sulfadiazina, ácido nalidixico e vancomicina. A resistência apresentada por muitas espécies de lactobacilos aos glicopeptídeos é de forma geral

considerada intrínseca, exceto para o *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. Johnsonii* e *Lb. crispatus* (BERNARDEAU et al., 2008; SHARMA et al., 2014).

Drago et al., (2013) relatam que 17 de 26 cepas probióticas que foram analisadas apresentaram genes de resistência à gentamicina. Entretanto, a maior parte das cepas fazem parte do gênero *Lactobacillus* que apresentou resistência intrínseca a essa classe de antibióticos. Para que ocorra seleção de novas cepas de LAB que possam ser usadas como culturas iniciadoras (starter) ou culturas probióticas em produtos de origem láctea, a verificação de susceptibilidade a antibióticos tornou-se imprescindível e necessária para que se possa garantir a saúde do consumidor (BERNARDEAU et al., 2008).

3.7 CONVERSÃO DO LEITE EM QUEIJO PELA AÇÃO DAS BACTÉRIAS SLAB E NSLAB

A conversão de leite em queijo ocorre por um processo de duas etapas. Na primeira etapa, o leite é convertido em coalhada fresca, já na segunda etapa a coalhada fresca é convertida em queijo amadurecido. Na primeira etapa, a bactéria (*Starter Lactic Acid Bacteria* – SLAB) cresce rapidamente no leite devido à grande quantidade de substrato disponível (lactose) e após aproximadamente 24 horas atingem níveis de 10^9 ufc g⁻¹ em a coalhada fresca. Nenhum crescimento adicional de SLAB ocorre na coalhada fresca devido à hostilidade do ambiente encontrado (ausência de carboidrato fermentável, alta concentração de sal e pH baixo). Contudo, na segunda etapa, que ocorre ao longo de vários meses, os números da bactéria SLAB entram em declínio, enquanto os números da bactéria (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* – NSLAB) começam a aumentar. No início da maturação, a bactéria NSLAB começa em níveis bastante baixos de 10^1 - 10^3 ufc g⁻¹ e pode ser de fato indetectável usando técnicas convencionais de revestimento. À medida que a maturação progride, seu número aumenta para aproximadamente 10^7 - 10^8 ufc g⁻¹ (FITZSIMONS, COGAN, CONDON, & BERESFORD, 2001; DE DEA LINDNER et al., 2008; GATTI et al., 2008; MCMAHON et al., 2014).

A bactérias ácido lácticas SLAB e a NSLAB se desenvolvem como colônias imobilizadas no queijo durante a maturação, tornando-as dependentes da difusão de metabólitos na matriz de queijo. A distribuição das células bacterianas imobilizadas na matriz de queijos é aleatória e, entretanto, foi evidenciado que a distância média entre as colônias é fortemente afetada pelos níveis iniciais de inoculação (JEANSON et al., 2011).

3.8 IMPORTÂNCIA DAS NSLAB NA MATURAÇÃO DE QUEIJOS

O processo de maturação dos queijos é um conjunto de reações lentas e delicadas que influenciam de modo direto nas características organolépticas finais do queijo. A mesma ocorre em câmaras frigoríficas com temperatura e umidade controlada, normalmente em temperaturas entre 5°C e 10°C e umidade relativa do ar entre 84 e 90% (MELLO; ARMACHUK, 2013). Tais condições favorecem que as atividades microbiológicas e enzimáticas desejáveis ocorram da mesma forma, impedem o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Ao longo do processo de maturação, ocorrem processos físicos, bioquímicos e microbiológicos, que resultam na produção de inúmeras substâncias que se acumulam colaborando para o sabor e aroma (cetonas, aldeídos, peptídeos, ácidos graxos livres entre outros) (MELLO; ARMACHUK, 2013).

O desenvolvimento da bactéria (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* – NSLAB) durante o amadurecimento do queijo pode ser atribuído parcialmente à sua capacidade de usar as fontes alternativas de nutrientes disponíveis (LAZZI et al., 2014). Como a lactose no queijo é metabolizada nas primeiras semanas de amadurecimento, o NSLAB pode derivar energia de compostos como ácido láctico, ácido cítrico, ribose, ácidos graxos, glicol e AA (BROADBENT et al., 2003). O potencial redox afeta a produção de compostos aromatizantes através do metabolismo microbiano e reações químicas. Vários equilíbrios influenciam as mudanças no potencial de redução da oxidação (MCSWEENEY et al., 2010).

As NSLAB são bactérias adventícias que desempenham um papel importante durante o amadurecimento, melhorando o desenvolvimento do sabor (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

Segundo Settanni e Moschetti, (2010) a bactéria NSLAB pode estar presente em baixas concentrações após fabricação do queijo (10^2 a 10^3 ufc / g), porém, suas populações tendem a aumentar lentamente em torno de 4 a 6 (log ufc/g) nos primeiros meses de maturação.

Alternativamente, algumas espécies heterofermentativas podem utilizar pentoses como ribose e desoxirribose, liberadas após a lise de células de SLAB, o que normalmente ocorre durante o processo de maturação (SETTANI; MOSCHETTI 2010). No entanto, neste contexto, os autores destacam que as glicoproteínas, proteínas, peptídeos, glicopeptídeos e aminoácidos, presentes em altas concentrações, são os principais substratos para as bactérias NSLAB durante o processo de maturação. As NSLAB desempenham um papel essencial na degradação das caseínas e peptídeos, e por meio destes processos, contribuem significativamente para a

liberação de aminoácidos livres e peptídeos de baixa massa molecular (SETTANI; MOSCHETTI 2010). Os autores descrevem que a intensidade da proteólise, que resulta na liberação de aminoácidos livres, contribui diretamente para o sabor do queijo e indiretamente para a formação de aromas, uma vez que os aminoácidos liberados são metabolizados pela microbiota do queijo dando origem a diversos compostos voláteis como diacetil, 2,3-butanodiol e acetoína (SETTANI; MOSCHETTI 2010).

Os gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* compreendem várias espécies (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroide*), com capacidade de inibir a proliferação de bactérias indesejáveis em alimentos em virtude de sua eficácia na produção de várias substâncias antimicrobianas, que incluem ácidos orgânicos, diacetil, bactericidas, peróxido de hidrogênio, antibióticos de baixa massa molecular (reuterina e reuteriцина) e entre outros, (GALVEZ et al., 2008; SETTANNI et al., 2011; KUMARI et al., 2012; DIGAITIENE et al., 2012; REIS et al., 2012; YANG et al., 2012; RATHER et al., 2014).

A biopreservação constitui uma poderosa ferramenta para se estender o *shelf-life* e aumentar a segurança de alimentos por meio da aplicação de microrganismos naturalmente presentes nos mesmos, sem a necessidade da utilização de aditivos artificiais na produção do queijo (REIS et al. 2012). Seguindo essa mesma linha de raciocínio, Settani et al. (2011) descreveram que o efeito da adição de NSLAB sobre a vida de prateleira do queijo fresco. Neste estudo, constataram que a adição em conjunto de *L. paracasei* NdP78 e *Streptococcus macedonicus* NdP1 como adjuntos foi capaz de estender a vida de prateleira do produto, da mesma forma melhorar a qualidade microbiológica no que se refere às concentrações de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus sp.* e à atividade antilisteria, caracterizando também uma influência positiva sobre as características sensoriais do produto.

3.8.1 Impacto das NSLAB na qualidade dos Queijos

As bactérias (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* - NSLAB) são comumente encontradas no leite cru e também dentro da indústria láctea, dentro das tubulações e dos equipamentos de produção por onde circula o leite pasteurizado, bem como em equipamentos e utensílios

utilizados na fabricação de queijos. Há também possibilidade de serem encontradas no ar ambiente da indústria (MOURA, 2017).

As NSLAB devem atender a vários critérios, elas têm que acidificar para atingir e manter altas densidades celulares no leite para evitar defeitos no queijo, e afetar negativamente a qualidade geral do queijo (CROW et al., 2001; DI-CAGNO et al., 2011; GOBBETTI et al., 2015).

Bokulich and Mills (2013) relataram a existência nas instalações de “casas” nos equipamentos, uma microbiota específica e sugeriu que essa microbiota tem papel potencial na formação de características específicas do produto final.

O processo de pasteurização convencional do leite utilizado na fabricação de queijos consegue eliminar a totalidade das bactérias patogênicas. No entanto, de alguma forma uma pequena parte destas bactérias que estavam presente no leite cru consegue sobreviver e permanece no leite pasteurizado (HANSEN, 2017). O resfriamento do leite que é uma prática comum seja ele com temperatura de coagulação ou de estocagem, contribui para que o leite pasteurizado e armazenado por longos períodos beneficie o crescimento dessas bactérias na superfície destes equipamentos, com isso acaba desfavorecendo os processos frequentes de limpeza, pois muitas vezes acabam ultrapassando o tempo recomendado para realização da limpeza CIP no circuito (HANSEN, 2017).

Desta maneira à medida que o equipamento fica por muito tempo sem a realização da limpeza, amplia-se a possibilidade de um aumento na carga das bactérias NSLAB no leite pasteurizado. Outro ponto que merece atenção dentro na produção é o tempo em que o leite se mantém parado para a pré-maturação do queijo, seja pela característica da cultura ou mesmo por questões operacionais da indústria (HANSEN, 2017). Precisa-se cuidado redobrado para evitar esta operação tratando-se da fabricação de queijos, já que isso acaba contribuindo para o crescimento das bactérias NSLAB. Na maior parte dos queijos a contagem das bactérias NSLAB nos primeiros dias de fabricação é baixa, ao mesmo tempo em que a contagem das bactérias iniciadoras (starter) é alta. Conforme o tempo em que o queijo permanece estocado, as bactérias iniciadoras do fermento diminuem sua população dando lugar ao crescimento das bactérias NSLAB, dinâmica está fortemente influenciada pela quantidade residual de açúcares pós salga existente e pela temperatura de estocagem do queijo (HANSEN, 2017). Para que se possa ter uma ideia do grau de interferência da temperatura de estocagem dos queijos no crescimento destas bactérias é possível ter uma redução de até três ordens logarítmicas à medida que a temperatura cai de 08 para 03°C. (HANSEN, 2017).

3.8.2 Defeitos em Queijos

Apesar de que exerça influência no processo maturação de alguns queijos, estima-se que em torno de 80% dos defeitos encontrados nos queijos estejam relacionados às bactérias NSLAB, seja pelo evento da proteólise (descaracterização da textura e off flavours), e/ou pela produção de gás e racemização do L-Lactato em D-Lactato dificultando assim a abertura de olhaduras em alguns tipos de queijos com bactérias propiônicas ou mesmo na formação de cristais de lactato na superfície dos queijos (pó branco) (HANSEN, 2017).

As NSLAB são consideradas um grupo de bactérias bastante grande que pode variar de uma região para outra, ocorrendo em muitos casos resistência à pasteurização. As NSLAB influenciam principalmente na maturação de queijos alterando sua textura e flavor. Novamente é importante destacar a importância da baixa CBT no leite, que de forma direta, está associada à menor presença de NSLAB (SACCO, 2013).

A produção de gás pelos lactobacilos heterofermentativos, que no caso de alguns tipos de queijos são desejáveis, em outros são classificados como defeitos que podem ser de textura e sabor. Inicialmente essas bactérias podem ser encontradas em pequenas quantidades no leite, e podem atingir mais de 10^7 UFC.g⁻¹ dentro de 4 a 6 semanas, podendo produzir quantidades excessivas de CO₂, contribuindo para o início da formação olhaduras ou rachaduras dependendo do tipo de consistência do queijo e de sabor não característico do queijo (FURTADO, 2017).

Alguns tipos de acidificação são confundidos com a de um cultivo mais lento, no entanto, trata-se de uma fermentação realizada pelas bactérias NSLAB. É comum nestes casos ocorrer a diminuição da dose do fermento utilizado à medida que o pasteurizador fica sem a realização da limpeza CIP, ou a limpeza ocorre em um longo espaço de tempo o que torna a fermentação quase que exclusiva pelas bactérias NSLAB (HANSEN, 2017). Esta operação acarreta em consequências muito graves para a produção dos queijos, porque leva ao aparecimento de alterações como, sabores indefinidos aos queijos (muitas vezes amargo), amolecimento (queijo mussarela) e off flavours e abertura de massa (Queijo Prato) devido à intensa proteólise e em alguns casos ocorre a abertura da massa devido à produção de gás (HANSEN, 2017).

3.8.3 Estudos do Impacto da NSLAB na Indústria Láctea

Em estudo publicado por Başar, (2019), foram coletadas 144 amostras de três laticínios durante o período de maturação do queijo Ezine, na região de Çanakkale, região montanhosa de Ida, na Turquia. A composição físico-química e as análises de identificação do NSLAB foram realizadas usando métodos convencionais e moleculares. Os resultados indicam que o NSLAB contribui para a estabilidade microbiológica do queijo Ezine ao longo de 12 meses de maturação. O isolamento do NSLAB com atividade antimicrobiana, potenciais produtores de bacteriocina, produziu coleções definidas de isolados naturais de NSLAB do queijo Ezine. O estudo também relatou que após o processo de pasteurização, algumas cepas NSLAB resistentes ao calor permanecem, recuperando e proliferando durante o período de maturação. Além disso, a capacidade de algumas LAB mesofílico de formar biofilmes serve como fonte para as NSLAB através da contaminação pós-pasteurização (BAŞAR, 2019).

Em matéria publicada por Moura, (2017) mais da metade dos problemas de queijos estão relacionados às NSLAB. Problemas causados por proteólise (amolecimento, sabor e odor estranho); produção de gás e rancemização do lactato, causando problema em queijos como olhaduras, bem como aparecimento de manchas como pó um branco na casca dos queijos, devido à formação de cristais de lactato na superfície dos mesmos (MOURA, 2017).

Figura 3: Queijo com produção de gás e rancemização do



Fonte: (MOURA, 2017)

Corroborando da mesma descrição, a revista Laticínios publicou em seu caderno Técnico que mesmo exercendo uma enorme influência na fase de maturação de alguns tipos de queijos, estima-se que 80% dos defeitos encontrados nos queijos possam estar relacionados às bactérias NSLAB, esses defeitos podem ser por proteólise (descaracterização de textura e *off flavours*), pela produção de gás e racemização do L-Lactato em D-Lactato (HANSEN, 2017).

Figura 4: Queijos com defeito de amolecimento e com off flavours



Fonte: (HANSEN, 2017).

Segundo a EPAMIG ILCT, que desenvolve estudos e pesquisas com queijos artesanais de leite cru, relata que algumas bactérias lácticas selvagens presentes no leite cru, chamadas bactérias lácticas não adicionadas (NSLAB), também podem produzir gases e conseqüentemente olhadura, que não necessariamente seria considerada estufamento, ou seja, o queijo possui algumas olhaduras, mas seu sabor e odor são agradáveis, diferente do queijo estufado (EPAMIG, 2019).

4. CONCLUSÃO

As *Non-Starter Latic Acid Bacteria* (NSLAB), fazem parte da flora de bactérias secundária que se desenvolve espontaneamente nos queijos e alimentos fermentados durante a maturação.

O presente trabalho reitera que os cuidados com as BPF podem evitar esses defeitos, tais como: Cumprimento da IN 76, que trata das características e da qualidade do produto na indústria e da IN 77, que define critérios para obtenção de leite de qualidade e seguro ao consumidor. Monitoramento por meio de análises microbiológicas de todos os processos de limpeza CIP, tanques de transporte rodoviário, tanques de estocagem e análise microbiológica de todos os utensílios utilizados na fabricação do queijo. Monitorar as contagens de CBT no leite cru bem como a contagem de NSLAB no leite pasteurizado. Evitar cultivos com fase Lag extensa ou períodos largos de pré-maturação do leite. Adotar temperatura de estocagem dos queijos o mais próximo de 4 °C e nos casos de queijos maturados, evitar temperaturas muito altas de maturação. Utilizar combinação de cultivos que minimize a quantidade de açúcares residuais pós salga. Diminuir a dependência da fermentação das NSLAB respeitando a dose correta do fermento. Sob aspectos futuros é importante a realização de novas pesquisas buscando aprofundar os conhecimentos a respeito da ação das NSLAB como agentes envolvidos na maturação dos queijos para preencher lacunas ainda existentes.

5. REFERÊNCIAS

- ADIMPONG, D. B. et al. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 75, p. 1-12, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2180-12-75>. Acesso: 05 mai. 2020.
- ABIQ, Associação Brasileira de Indústrias de Queijo. **Mercado nacional de lácteos 2016**. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/noticias_interna.asp?codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6>. Acesso em: 05 mai. 2020.
- BANKS, J. M., Williams, A. G. The role of the nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, 57, 145–152 (2004).
- BAŞAR U. Physicochemical and Microbiological Characterization of Protected Designation of Origin Ezine Cheese: Assessment of Non-starter Lactic Acid Bacterial Diversity with Antimicrobial Activity. **Food Science of Animal Resources**. DOI <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e71>. Çanakkale, Turkey, 2019.
- BELLO, B. D., RANTSIOU, K., BELLIO, A., ZEPPA, G., AMBROSOLI, R., CIVERA, T., COCOLIN, L., 2010. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology** v.43, p. 1151-1159, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810001040>. Acesso: 20 de mai. 2020.
- BERESFORD, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M.,. Recent advances in cheese microbiology. **Int. Dairy J.** 11, 259–274, 2001.
- BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In Fox, P. F. McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M, Guinee, T. P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 3 ed. Amsterdam. Elsevier, p. 287-318, 2004.
- BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278-285, 2008.
- BINTSIS, T.; ATHANASOULAS, A.; (2015) Dairy starter cultures, In: Papademas P, Editor, **Dairy Microbiology, A Practical Approach**, Boca Raton: CRC Press, 114–154, 2015.
- BINTSIS T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. **J Bacteriol Mycol** 5: 1065, 2018.
- BOKULICH, N. A.; D. Mills. Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. **Appl. Environ. Microbiol.** 79:5214–5223, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de

leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2014/2015 a 2024/2025**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 133 p. 2015.

BROADBENT, J. R.; Houck K., M.; Johnson; C. Oberg. 2003. Influence of adjunct use and cheese microenvironment on nonstarter bacteria in reduced-fat Cheddar-type cheese. **J. Dairy Sci.** 86:2773–2782, 2003.

BROOME, M. C.; LIMSOWTIN, G. K. Y. Starter Cultures: General Aspects. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences** 2 ed. Londres: Elsevier, 2011. p. 552 a 558. 2 v.

CAGNO, R. DI., Minervini, G., Rizzello, CG, De Angelis, M. e Gobbetti, M. (2011). **Efeito da fermentação do ácido láctico nas propriedades antioxidantes, textura, cor e sensoriais dos smoothies vermelhos e verdes**. Microbiologia de Alimentos, 28 (5), 1062-1071.

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

CAPELLARI, J. B. **Biossíntese de ácido láctico por Lactobacillus amylovorus a partir de resíduos agroindustriais**. 71f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville. Joinville, 2010.

CARMINATI, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., Reinheimer, J., Advances and Trends in Starter Cultures for Dairy Fermentations. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. Blackwell Publishing, USA, pp. 177-192, 2010.

CARVALHO, J.D.G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, D.; PETTI, R. H. V. e SILVA, R. de O. P. “**Análise sócio-cultural do consumo de queijos e sua relação com a alimentação: diálogos entre classes sociais, estilos de vida e mercados de qualidade**”. XLVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER), Campo Grande/MS, julho. *Anais...*2010.

CLETO, S., MATOS, S., KLUSKENS, L., & VIEIRA, M. J. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e40189, 2012.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Boletim VBP 2017**. Disponível em: <<http://cnabrazil.org.br/boletim/2017/10/30/vbp-29a-edicao/>>. Acesso em: 05 mai. 2020.

CORRÊA, N. M.. **Análise de eficiência sobre a bovinocultura de leite, em bases microrregionais, do estado do Rio Grande do Sul.** Monografia (Gestão do Agronegócio). Faculdade UnB Planaltina. Brasília, DF. 2014.

COSTA I. B. B. A. **Maturação em queijo dos Açores - Determinação de ácidos orgânicos e metabolismo do lactato.** Dissertação de Mestrado (Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos)- Instituto Superior de Agronomia de Lisboa, 2012.

COSTA, E. F. D.; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo; CAVALCANTI, Maria Taciana Holanda. **Queijos artesanais: fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais.** 2016.

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

CROW, V., Curry, B., & Hayes, M. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. **International Dairy Journal**, v.11, p. 275-283, 2001.

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

CRUZ, A. G. da et al. **Processamento de produtos lácteos.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 330 p., il. (Lácteos, 3).

DADALT, F., PADILHA, R. L., & SANT'ANNA, V. **Avaliação do tempo de cozimento da massa de queijo prato lanche sobre a umidade do produto maturado.** *Revista Eletrônica Científica Da UERGS* , 5(3), 257-262, 2019.

DIAS, J. C. **As raízes leiteiras do Brasil.** 11^a. ed. São Paulo: Barleus, p 167 2012.

DIAS, J. C. **As peripécias do queijo no Brasil.** Publicado em 12/12/16. Disponível em: <https://www.dinheirorural.com.br/secao/estilo-no-campo/as-peripecias-do-queijo-no-brasil>. Acesso em: 04 de Maio 2020.

DIGAITIENE, A.; HANSEN, A. S.; Juodeikiene, G. EIDUKONYTE, D.; JOSEPHSEN, J. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, n.4, p.732-742, 2012.

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

DUARTE, M. C. K. H.; VORTEZ, N. M. dos. S.; MACEDO, N. C. de.; CORTEZ, M. A. S.; FRANCO, R. M. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy Food Science**, Amapá, v.3, n.1, p.1-10, 2016.

DURR, J. W. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite: PNQL. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite**. Passo Fundo: Editora UPF, p. 38-55, 2004.

EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico Caracterização Molecular de Bactérias Láticas Endógenas de Queijo de Coalho**. Novembro de 2011. Disponível em: <www.cnpat.embrapa.br/download_publicacao.php?id=345>. Acesso em: 01 de abril de 2020.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Plano de qualificação do fornecedor deve ter envolvimento de toda a cadeia do leite. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/solos/sibcs/busca-de-noticias/-/noticia/44797916/plano-de-qualificacao-do-fornecedor-deve-ter-envolvimento-de-toda-a-cadeia-do-leite>. Acesso: 04 de jun. de 2020.

EPAMIG. Queijo Minas Artesanal - **Principais problemas de fabricação: manual técnico de orientação ao produtor**. pg 20 – Belo Horizonte: EPAMIG, 2019.

EFSA. European Food Safety Authority. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. **EFSA Journal**, v. 587, p.1-16, 2007.

FAO. **Agriculture Outlook 2013-2022**. Paris, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1787/agri.outlook2013>>. Acesso em: 5 abr. 2016.

FIALHO, T. L. **Identificação e ação antimicrobiana de peptídeos de queijo minas artesanal da Canastra**. 2015. 97f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

FIESP. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. **Outlook Fiesp 2015-2026: projeções para o agronegócio brasileiro**. São Paulo: Fiesp, 2016. 90 p.

FITZSIMONS, N., Cogan, T. M., Condon, S., & Beresford, T. P. (2001). Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. **Journal of Applied Microbiology**, 90, 600.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Estratégias de controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314p.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FOX, P. F. et al. Fundamentals of cheese science. **Gaithersburg Maryland**: Aspen Publishers: [s.n], 2000.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos**. São Paulo: Setembro Editora, 2017.

GALÁN, E.; CABEZAS, L.; SALGUERO, J. F. Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara*

cardunculus, calf rennet or a mixture thereof. **International Dairy Journal**, v.25, p.92-96, 2012.

GALVEZ, A.; LOPEZ, R. L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.28, n.2, p.128-152, 2008.

GANDRA, E.A., T.K.V; MELLO, W.S.; GODOI, H.S.; Técnicas moleculares aplicadas a microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**., 30(1): 111-112, 2008.

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

GATTI, M., B. Bottari, C. Lazzi, E. Neviani, and G. Mucchetti. 2014. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. **J. Dairy Sci.** 97:573–591.

GATTI, M., De Dea Linder, J., De Lorentiis, A., Bottari, B., Santarelli, M., Bernini, V., et al. (2008). Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano-Reggiano cheese production and ripening. **Applied Environ Microbiology**, 74, 6161–6167.

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

GOBBETTI, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., & Fox, P.F. (2015). Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. **Trends in Food Science & Technology**, 45, 167-178.

GONZÁLEZ, L.; SACRISTÁN, N.; ARENAS, R.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M. E. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. **Food Microbiology**, v.27, n.5, p.592-597, 2010.

HANSEN B., **O impacto das NSLAB na qualidade dos queijos**. Revista Indústria de Laticínios, São Paulo nº 124, ISSN 1678-7250, pg 24-25, Janeiro/Fevereiro 2017. Disponível em: http://www.revistalaticinios.com.br/download/edicoes_anteriores/IL-124-site.pdf . Acesso em: 11 de abr. 2017.

HAYALOGLU, A. A.; MCSWEENEY, P. L. H. Primary biochemical events during cheese ripening. In: OZER, B.; AKDEMIR-EVRENDILEK, G. **Dairy microbiology and biochemistry**: Recent developments. Boca Raton: CRC Press. 2014. 464p.

HAYEK, S. A.; IBRAHIM S.A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. **Food Nutr Sci** 4: 73–87, 2013.

HUERTAS.R.A.P.; **Bacterias acido laticas: papel funcional en los alimentos**. Facultad de ciências agropecuárias. vol.8. enero-junio,2010.

IKEDA, D. M.; WEINERT JR.,E.; CHANG, K. C. S.; MCGINN, J. M.; MILLER, S. A.; KELIIHOOMALU, C.; DUPONTE, M. W. Natural Farming: Lactic Acid Bacteria.

University of Hawai. **College of Tropical Agriculture and Human Resource**. Sustainable Agriculture. v. 8, 2013.

JEANSON, S., Chadoeuf, J., Madec, M. N., Aly, S., Floury, J., Brocklehurst, T. F., & Lortal, S. (2011). Spatial distribution of bacterial colonies in a model cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, 77, 1493–1500.

JOLY, L., (2018). **Quais os principais tipos de queijos produzidos no Brasil**. Revista Mundo Estranho. Disponível em: <https://super.abril.com.br/mundo-estranho/quais-sao-os-principais-tipos-de-queijo-produzidos-no-brasil/>. Acesso: 15/04/2020.

JOSAHKIAN L. Uma breve história da produção leiteira no Brasil. Revista Globo Rural. ed nº 396, 2018. Disponível em: <https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Leite/noticia/2018/10/leite-sem-politica.html>. Acesso: 04 de jun. de 2020.

JONGHE, V., COOREVITS, A., VAN HOORDE, K., MESSENS, W., VAN LANDSCHOOT, A., DE VOS, P., HEYNDRICKX, M. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 460-470, 2011.

KAGKLI, D.M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., Cogan, T.M., 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm environment. **Int. J. Food Microbiol.** 114, 243–251.

KEMPKA, A. P; KRUGER, R. L.; VALDUGA, E.; DI LUCCIO, M.; TREICHER, H.; CANSIAN, R., OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p.170-177, 2008.

KUMARI, A.; AKKOÇ, N.; AKÇELIK, M. Purification and partial characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LL171. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.4, p.1647-1655, 2012.

LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. et al. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. 4 ed. **New York, CRC Press**, p, 2; 40; 77-92, 2012.

LAVASANI, A. R. S.; EHSANI, M. R.; MIRDAMADI, S.; MOUSAVI, M. A. E. Z. Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.65, n.1, p.64-70, 2011.

LAZZI, C., S. Turrone, A. Mancini, E. Sgarbi, E. Neviani, P. Brigidi, and M. Gatti. 2014. Transcriptomic clues to understand the growth of *Lactobacillus rhamnosus* in cheese. **BMC Microbiol.** 14:28.

LINDNER, J. D. D., J., Bernini, V., De Lorentiis, A., Pecorari, A., Neviani, E., & Gatti, M. (2008). Parmigiano Reggiano cheese: evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening. **Dairy Science and Technology**, 88, 511–523.

LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. **Sustainable Biotechnology**, Springer Netherlands, 2010. p.211-228.

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

LOUREIRO, D. S. P. M. **Estudos da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* B391 para potencial utilização na Indústria**. 73f. Dissertação (Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar) - Instituto Politécnico de Viana do Castelo. Viana do Castelo, 2015.

MACHADO, S. G., DA SILVA, F. L., BAZZOLLI, D., HEYNDRICKX, M., COSTA, P. M. D. A., VANETTI, M. C. D. *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. M1842-M1849, 2015.

MACHADO, S. G., BAGLINIÈRE, F., MARCHAND, S., COILLIE, E. V., VANETTI, M. C. D., BLOCK, J., HEYNDRICKX, M. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 302, p.1-22, 2017.

MALLET, A.; GUÉGUEN, M.; KAUFFMANN, F.; CHESNEAU, A.; SESBOUÉ, A.; DESMASURES, N. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. **International Dairy Journal**, v.27, n.1, p.13-21, 2012.

MARCHAND, S.; DE BLOCK, J.; DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, n.2, p.133-147, 2012.

MCMAHON, D. J., Oberg, C. J., Drake, M. A., Farkye, N., Moyes, L. V, Arnold, M. R., et al. Effect of sodium, potassium, magnesium, and calcium salt cations on pH, proteolysis, organic acids, and microbial populations during storage of full-fat Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, 97, 4780–4798 (2014).

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview. In P. McSweeney, P. Fox, P. Cotter, & D. Everett (Eds.), **Cheese: Chemistry, physics and microbiology** (Vol. 1, pp. 379–387). London, UK: Academic Press, 2017.

MCSWEENEY, P. L. H., V. Caldeo, A. Topcu, and D. R. Cooke. Ripening of cheese: Oxidation-reduction potential and calcium phosphate. **Aust. J. Dairy Technol.** 65:178–184, 2010.

MELLO, E. Z. de.; ARMACHUK, M. A. **Avaliação das mudanças ocorridas no Queijo Colonial durante a maturação: modificações físico-químicas e microbiológicas**. 2013. 79 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Superior em Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2013.

- MENEZES, M. F., SIMEONI, C. P., ETCHEPARE, M. D., HUERTA, K., BORTOLUZZI, D. P., & MENEZES, C. R. (28 de 02 de 2014). **Microbiota e conservação do leite**. REGET UFSM, p. 14, 2014.
- MONTEL, M.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; DELBES-PAUS, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N. BERTHIER, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v.177, n.1, p.136-154, 2014.
- MORAES, P.M., PERIN, L.M., TODOROV, S.D., SILVA, A., JR., FRANCO, B.D.G.M., NERO, L.A. Bacteriocinogenic and virulence potential of Enterococcus isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology** v.113, p.318-328. 2012.
- MOURA, C. J. R. **A Influência da flora NSLAB na qualidade dos queijos**. Edição N.º 23 de março de 2017. Disponível em: https://issuu.com/fermentech/docs/fermentech_news_23_02_web. Acesso em: 06/04/2020.
- NERO, L.A., MATTOS, M.R., BARROS, M.A.F., ORTOLANI, M.B.T., BELOTI, V., FRANCO, B.D.G.M. Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health** v. 55, p. 299-305, 2008.
- NETO, J. P. de M. L. **Queijos – aspectos tecnológicos**. 1ª ed. Minas Gerais: Instituto Cândido Tostes de Laticínios, 2013.
- NÖRNBERG, M. D. F. B. L., MENTGES, M. L., SILVEIRA, S. T., TONDO, E. C., BRANDELLI, A. A psychrotrophic Burkholderia cepacia strain isolated from refrigerated raw milk showing proteolytic activity and adhesion to stainless steel. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 03, p. 257-262, 2011.
- NUNES, K. B. Caracterização bioquímica de bactérias psicotróficas e produção de enzimas termorresistentes em leite cru. Dissertação de mestrado. 2017.p.84.
- OECD. Organisation for Economic Co-Operation and Development. OECD: Agriculture Outlook 2016- 2026. Paris: OECD, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en>. Acesso em: 6 fev. 2016.
- PARENTE, E., T. Cogan, and I. Powell. 2017. Starter cultures: general aspects. Pages 201–226 in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. P. McSweeney, P. F. Fox, P. Cotter, and D. Everett, ed. **Academic Press**, London, UK.
- PEREIRA M.E.S.P., **A realização de práticas na identificação de bactérias ácido-láticas**. In: II Congresso Internacional das Ciências Agrárias, COINTER, 2017.
- PEREIRA, ALF, Feitosa, WSC, Abreu, VKG, Lemos, TD, Gomes, WF, Narain, N., & Rodrigues, S. (2017). Impacto das condições de fermentação na qualidade e nas propriedades sensoriais de um cupuaçu probiótico (Theobroma grandiflorum) bebida. **Food Research International**, 100, 603-611.

PERIN, L.M. **Diversidade molecular da microbiota Láctica bacteriocinogênica de Leite de cabra e caracterização de seu potencial bioconservador para a produção de queijo minas**. Minas Gerais, 2016. Originalmente apresentado como Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2016.

PERIN, L.M., MORAES, P.M., VIÇOSA, G.N., SILVA JÚNIOR, A., & NERO, L.A. Identification of bacteriocinogenic Lactococcus isolates from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. **International Dairy Journal** v.25, p.46-51. 2012.

PERRY K. S. P. **Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos**. Quim. Nova, Vol. 27, No. 2. pg. 293-300., 2004.

PICON A. Cheese Microbial Ecology and Safety, In: Papademas P, Bintsis T, Editors, Global Cheesemaking Technology, Cheese Quality and Characteristics, Chichester: **John Wiley & Sons Ltd.**, 71–99, 2018.

PINTO, C. L. DE O., MACHADO, S. G., MARTINS, M. L., VANETTI, M. C. D. **Identificação de bactérias psicrotólicas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 70, n. 2, p. 105-116, 2015.

PITHAN-SILVA, R. O.; BUENO, C. R. F.; AMARAL, A. M. P.; ZACARCHENCO, P. B. **Soro em pó: considerações sobre sua participação na cadeia do leite no Brasil**. Revista Indústria de Laticínios, v. 20, n. 210, p. 79-81, 2016.

PONCE, A. R., MARTINS, M. L., ARAUJO, E. F., MANTOVANI, H. C., VANETTI, M. C. D. AiiA quorum-sensing quenching controls proteolytic activity and biofilm formation by *Enterobacter cloacae*. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 758-763, 2012.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology**. v.37, n.5, p.664-698, 2013.

RABELO, M. **Boas perspectivas no mercado de lácteos: queijos e proteína do soro do leite em alta**. Sistema Faeg, mar. 2015. Disponível em: <<http://sistemafaeg.com.br/noticias/artigos/11466-boas-perspectivas-no-mercado-de-lacteosqueijos-e-proteina-do-soro-do-leite-em-alta>>. Acesso em: 15 abr. 2020.

RASINKANGAS, P.; REUNANEN, J.; DOUILLARD, F. P.; RITARI, J.; UOTINEN, V.; PALVA, A. Genomic characterization of non-mucus adherent derivatives of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals genes affecting pilus biogenesis. genomic. **Appl Environment Microbiology**, [s.l.], v.80, n.22, p.7001-7009, 2014.

RATHER, I. A.; SEO, B. J.; KUMAR, V. J. R.; CHOI, U.; CHOI, K.; LIM, J.; PARK, Y. Biopreservative potential of *Lactobacillus plantarum* YML007 and efficacy as a replacement for chemical preservatives in animal feed. **Food Science and Technology**, v.23, n.1, p.195-200, 2014.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering Reviews**, v.4, n.2, p.124-140, 2012.

RESENDE, M. F. S. **Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas**. 2010, 72f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P. et al. **Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000600039. Acesso em 31/03/2020.

ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. Fabricación de queso: R. Scott. Tradução de Andrés Marcos Barrado. 2. ed. **Zaragoza**: Acribia, 2010.

ROSSETTI, L. et al. A Qualified Presumption of Safety approach for the safety assessment of Grana Padano whey starters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 1, p. 70–73, 2009.

SABO, S., VITOLO, M., GONZÁLEZ, J. M. D., OLIVEIRA, R. P. d. S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.

SACCO B. **Qualidade do leite para a produção de derivados: alguns pontos para reflexão**. Edição 40, Abril/Maio/Junho de 2013. Revista Via Láctea. Disponível em: http://saccobrasil.com.br/admin/PASTA/VIA_LACTEA_40.pdf. Acesso: 05/05/2020.

SANTIS, Valéria B. G. de. **Queijo Minas padrão com baixo teor de sódio e gordura: caracterização físico-química e sensorial**. 67f. Dissertação de Mestrado – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

SETTANNI, L.; Moschetti, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, 27, 691–697, 2010.

SETTANNI, L.; FRANCIOSI, E.; CAVAZZA, A.; COCCONCELLI, P. S.; POZNANSKI, E. Extension of Tosela cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.28, n.5, p.883-890, 2011.

SGARBI, E., Lazzi, C., Tabanelli, G., Gatti, M., Neviani, E., & Gardini, F. Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. **Journal of Dairy Science**, 96, 4223–4234, 2013.

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

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. 2016. 82f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal, Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 2016.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 5ªed., São Paulo: Varela; 560p., 2017.

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

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

TAMANINI, R., BELOTI, V., SILVA, L.C.C., ANGELA, H.L., YAMADA, A.K., BATTAGLINI, A.P.P., FAGNANI, R., MONTEIRO, A.A. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1877-1886. 2012.

TEH, K. H., FLINT, S., PALMER, J., ANDREWES, P., BREMER, P., LINDSAY, D. Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 28-34, 2012.

TEH, K. H., LINDSAY, D., PALMER, J., ANDREWES, P., BREMER, P., FLINT, S. Proteolysis in ultra-heat-treated skim milk after exposure to multispecies biofilms under conditions modelling a milk tanker. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 2, p. 176-181, 2014.

TODESCATTO, C. **Obtenção de fermento láctico endógeno para produção de queijo típico da mesorregião sudoeste do Paraná**. 2014. 171f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2014.

UPADHYAY, V. K., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A.; & Fox, P.F. (2004) Proteolysis in Cheese during Ripening. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Ed.). **General Aspects: Vol. 1 Cheese – chemistry, physics, and microbiology** (3rd ed., pp. 391-433). London, UK: Elsevier Academic Press.

VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBÈS, C.; MONTEL, M. C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? **Food Microbiology**, v.26, n.3, p.305-310, 2009.

VIANA, E. S., CAMPOS, M. E. M., PONCE, A. R., MANTOVANI, H. C., VANETTI, M. C. D. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk. **Biological Research**, v. 42, n. 4, p. 427- 436, 2009.

VILELA, D. Para onde caminha o leite. **Revista Balde Branco**, n. 603, p. 41-43, jan. 2015.

VILELA, D.; RESENDE, J. C. de. Cenário para a produção de leite no Brasil na próxima década. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITERIA NA

REGIÃO SUL DO BRASIL, 6.; SEMINÁRIO DOS CENTROS MESORREGIONAIS DE EXCELÊNCIA EM TECNOLOGIA DO LEITE, 2., 2014, Maringá. Anais... Maringá: UEM, 2014.

WEDAJO B. Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. **J Prob Health** v.3, p. 129, 2015.

WILLIAMS, A. G.; WITHERS, S. E. Microbiological characterisation of artisanal farmhouse cheeses manufactured in Scotland. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.3, p.356-369, 2010.

WOUTERS, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal** 12, 91-109, 2002.

XING, Y.; XU, Q.; MA, Y.; CHE, Z.; CAI, Y.; JIANG, L. Effect of porous starch concentrations on the microbiological characteristics of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. **Food Function**, [s.l.], v.5, n.5, p.972-83, 2014.

YANG, E.; FAN, L.; JIANG, Y.; DOUCETTE, C.; FILLMORE, S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. **AMB Express**, v.2, n.48, p.1-12, 2012.

YVON, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D., & Gripon, J. C. (1997). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, 58(1), 414-419.

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

APÊNDICE A - BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO NÃO INICIADORAS (*NON STARTER LACTIC ACID BACTERIA* – NSLAB): UM DESAFIO PARA AS INDÚSTRIAS DE QUEIJO

Anderson Lunardi*; Paulo Henrique Gasparotto**

*Graduando de Medicina Veterinária pelo Centro Universitário São Lucas – Ji-Parana-Rondônia

**Ms. Professor de Medicina Veterinária pelo Centro Universitário São Lucas – Ji-Parana- Rondônia

*Autor para correspondência e-mail: andi_lunardi@hotmail.com

RESUMO

A microbiota do queijo é composta por bactérias do ácido lático, que são adicionadas como iniciadores (starter lactic acid bacteria – SLAB) e culturas adjuntas ou não iniciadoras (non starter lactic acid bacteria –NSLAB). O leite cru é a principal fonte do NSLAB. Dependendo da espécie e linhagem, sua atividade metabólica pode contribuir para defeitos ou inconsistência na qualidade do queijo e para o desenvolvimento do sabor típico do queijo. Embora exerça uma grande influência na maturação de alguns queijos, estima-se que 80% dos defeitos de queijos estejam relacionados às NSLAB, seja pela proteólise, produção de gás e racemização do L-Lactato, olhaduras em alguns tipos de queijos ou mesmo formando cristais de lactato na superfície dos queijos (póbranco). O objetivo deste estudo foi investigar o impacto causado pelas bactérias NSLAB na produção de queijos. Foram realizadas buscas sistemáticas em bases de dados eletrônicas nacionais e internacionais alcançando inúmeros artigos relacionados, alguns artigos avaliados apresentaram resultados satisfatórios demonstrando o potencial das bactérias NSLAB em causar prejuízos na fabricação do queijo. A presença da NSLAB melhora a qualidade microbiológica do queijo e sua vida de prateleira. Porém, algumas cepas são responsáveis por muitos defeitos apresentados pelos queijos. Dessa forma, pode concluir-se que os cuidados com as BPF podem evitar esses defeitos, tais como: análises microbiológicas de todos os processos de limpeza CIP, tanques de transporte rodoviário e de estocagem e análise microbiológica de todos os utensílios utilizados na fabricação do queijo.

Palavras-Chave: microbiota; cultura; fabricação; fermentação.

NON STARTER LACTIC ACID BACTERIA - NSLAB LACTIC ACID BACTERIA: A CHALLENGE FOR THE CHEESE INDUSTRIES

ABSTRACT

The cheese microbiota is composed of lactic acid bacteria, which are added as starters (starter lactic acid bacteria - SLAB) and adjunctive or non starter cultures (non starter lactic acid bacteria - NSLAB). Raw milk is the main source of NSLAB. Depending on the species and lineage, its metabolic activity may contribute to defects or inconsistency in the quality of the cheese and to the development of the typical cheese flavor. Although it has a great influence on the maturation of some cheeses, it is estimated that 80% of cheese defects are related to NSLAB, either by proteolysis, gas production and racemization of L-Lactate, glances in some types of cheese or even forming lactate crystals on the surface of the cheeses (white powder). The aim of this study was to investigate the impact of NSLAB bacteria on cheese production. Systematic searches were carried out in national and international electronic databases, reaching numerous related articles, some articles evaluated presented satisfactory results showing the potential of NSLAB bacteria to cause losses in cheese production. NSLAB's presence improves the microbiological quality of the cheese and its shelf life. However, some strains are responsible for many defects presented by cheeses. Thus, it can be concluded that the care with GMP can avoid these defects, such as: microbiological analysis of all CIP cleaning processes, tanks for road transport and storage and microbiological analysis of all utensils used in the manufacture of cheese.

Key words: microbiota; culture; manufacturing; fermentation.

INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro é dividido em vários setores, o de laticínios tem imenso destaque, tendo por base o valor bruto de produção (VBP) que é originado do setor pecuário, a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil aponta que o setor lácteo nacional representa 24% desse valor, perdendo apenas para o setor de carne bovina e sendo superior, por exemplo, ao setor de produção de carne suína, frangos e ovos (CNA, 2017). A indústria de laticínio possui vários segmentos, dentre eles o setor queijeiro está entre os de maior expressão econômica e comercial. Segundo levantamento realizado pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, a produção de leite no país em 2015 foi em torno de 34 bilhões de litros, dos quais 46% foram destinados à produção de queijos (ABIQ, 2016).

Na fabricação de queijos, as características do produto final são determinadas pelas propriedades físico-químicas e microbiológicas do leite utilizado e pelas etapas envolvidas no processo de fabricação conforme relatado por Dadalt, (2019). As intervenções tecnológicas podem influenciar nos aspectos físico-químicos, definindo o padrão de qualidade do produto maturado (DADALT, 2019).

No Brasil o mercado de queijos possui características específicas quando se refere às definições que são adotadas para que se possa diferenciar queijos comuns, queijos finos (ou especiais) e queijos artesanais conforme descrito por Perry, (2004). Queijos comuns tem fabricação padronizada, não apresentam sabor, aroma e textura destacáveis, como os produzidos pela indústria láctea, incluindo aqueles que possuem denominações regionais, mantidos tradicionalmente pela produção artesanal. No entanto queijos finos ou especiais tem sua produção em curta escala pela indústria, visando atender a uma estratégia comercial, objetivando manutenção de preços elevados e de diferenciação apenas de tamanho, forma e rotulagens. Essa porção do mercado de queijos finos no Brasil possui forte influência da oscilação dos queijos industriais importados que possuam o mesmo nome. (CHALITA et al., 2010).

Com a evolução da produção e comercialização observa-se que ao longo dos anos gerou uma transformação do mercado lácteo brasileiro. Uma dessas transformações está ligada à abertura comercial e a integração econômica, a valorização cambial e também a profissionalização da produção dos produtos lácteos, sendo a mais importante,

relacionada à mudança nos padrões de consumo de lácteos da população brasileira, associado a isso, está à transformação do produto em commodity e a constituição de grandes estruturas industriais (CORREA, 2014).

As bactérias lácticas (BAL) são grupos que tem como principal característica a produção de ácido láctico pela fermentação de carboidratos. São Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidases negativas e anaeróbias facultativas (SILVA et al., 2017). Essas bactérias são muito utilizadas como fermento láctico durante o processo de fabricação de queijos, por conferir características organolépticas como sabor, aroma e textura, agregando valor ao produto final (HUERTAS 2010).

OBJETIVO GERAL

Analisar como a presença das NSLAB impactam na qualidade do queijo, nas indústrias lácteas e na saúde humana, observando os desafios encontrados pela indústria de laticínios para manter um produto inócuo e objetivando os meios para atingir a segurança alimentar desejada.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Definir o que são bactérias NSLAB e quais é seu impacto na cadeia láctea.
- Identificar como métodos de controle preventivo podem se tornar um diferencial tanto na qualidade do produto, quanto na lucratividade da indústria através da bibliografia.
- Identificar as formas que o controle preventivo pode atuar dentro da indústria através da bibliografia.

METODOLOGIA

Esse trabalho é uma pesquisa bibliográfica realizada por meio de consulta na base de dados periódicos capes, repositórios institucionais e relatórios técnicos, acerca da NSLAB (*non starter lactic acid bacteria*), relacionado a defeitos encontrados nos queijos. As pesquisas e coletas de dados foram realizadas no período de fevereiro a junho do ano de dois mil e vinte, a partir de questões levantadas sobre o tema, foram consultadas cerca de 133 obras por meio de revisões bibliográficas, tendo sido empregados artigos científicos, livros e referências em bancos de dados eletrônicos e nas bases bibliográficas: Google acadêmico, Scielo, BDTD, ScienceDirect e o período de consulta foi de 2010 a 2019. Para coleta das informações, foram buscados os seguintes descritores (BAL, NSLAB, bactérias do ácido láctico, maturação dos queijos, microbiota dos queijos, características físico química dos queijos).

BACTÉRIAS ACIDO LÁTICAS (BAL)

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grande grupo de microrganismos, normalmente associado a laticínios, devido ao seu uso em alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas, como queijo, leite, carne, frutas e também são encontrados em grande quantidade na natureza. São utilizadas em grande escala na indústria de alimentos em processos de fermentação, e ocorre em algumas situações, que as bactérias ácido lácticas (BAL) podem se tornar desejáveis ou indesejáveis, pois podem contribuir para a formação de sabores, aromas, textura e odor, de forma positiva ou negativa causando uma alteração no alimento (EMBRAPA, 2011).

As BAL são grupos de bactérias que tem como principal característica a produção de ácido láctico pela fermentação de carboidratos. São Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidases negativas e anaeróbias facultativas (SILVA et al., 2017). Essas bactérias também são definidas como microrganismos desprovidos de citocromo e ácidos tolerantes. Dependendo da temperatura ótima de crescimento, essas bactérias podem ter sua classificação em mesofílicas 20-30 °C ou termofílicas 35-45 °C (REIS et al., 2012; GIRAFFA, 2012; ZHANG et al., 2013).

Desempenham um papel multifuncional em aplicações alimentares, agrícolas e clínicas (BINTSIS 2018). O uso de BAL na fermentação de alimentos é uma das antigas técnicas conhecidas de preservação de alimentos. Produtos lácteos fermentados, como iogurte e queijo, apareceram na dieta humana cerca de 8.000 a 10.000 anos atrás. Até o século 20, a fermentação de alimentos permaneceu num processo não regulamentado e, a descoberta e caracterização das LAB mudaram os pontos de vista sobre a fermentação de alimentos (HAYEK; IBRAHIM, 2013). O método tradicional para a fabricação de produtos alimentícios fermentados era a "inoculação" dos alimentos com uma amostra de um produto do dia anterior. Este método tem algumas desvantagens, principalmente uma grande flutuação na qualidade do produto, mas ainda é usado para alguns produtos caseiros. A substituição do *back-slopping* por uma cultura de partida selecionada foi percebida muito cedo como uma necessidade. Atualmente, como a produção de alimentos fermentados é automatizada e produzida em grandes quantidades, com controle total do processo, o uso de culturas iniciadoras comerciais é parte integrante de uma produção bem-sucedida de qualquer produto fermentado (BINTSIS; ATHANASOULAS; 2015).

As BAL são responsáveis por causar transformações na matéria-prima, colaborando para o sabor e textura de produtos fermentados e inibindo a deterioração de alimentos que é causada por outros microrganismos. Diante disso, é considerado o principal grupo de bactérias utilizado na fermentação de alimentos (IKEDA, 2013). Devido às suas propriedades metabólicas, as BAL manifestam significativo efeito inibitório sobre a produção e o crescimento de toxinas de muitas outras espécies de bactérias (COSTA et al., 2016).

Além disso, as bactérias ácido lácticas contribuem para a produção ou degradação de exopolissacarídeos, lipídios e proteínas, produção de componentes nutricionais como vitaminas, e utilizadas como culturas funcionais e promoção de efeitos terapêuticos (WEDAJO, 2015; BINTSIS; 2018, PICON, 2018).

Propriedades como adaptações nutricionais, ambientais e de adesão proporcionaram as LAB a capacidade de se adaptar e se apresentar em diferentes ambientes, desde matrizes alimentares como laticínios, carnes, vegetais e pão de fermento. Além disso, as LAB são habitantes comuns das superfícies mucosas humanas, como cavidade oral, vagina e trato gastrointestinal (HAYEK; IBRAHIM, 2013).

As BAL são muito exigentes em relação das suas condições de crescimento, tendo necessidade de fontes de nitrogênio, vitaminas e sais minerais. O metabolismo dessas bactérias pode apresentar duas rotas principais, a homo fermentativa, que tem produção

de ácido láctico e a heterofermentativa, com a formação de ácido láctico, gás carbônico, etanol e compostos de flavor (LI et al., 2010).

As Bactérias do ácido láctico homofermentativas mais utilizadas na produção de alimentos são as do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus*, pois o ácido láctico produzido por elas pode ser utilizado em indústrias de alimentos como flavorizante, acidulante, tamponante e inibidor de bactérias deteriorantes em alimentos processados como os produtos de panificação, produtos lácteos, bebidas, cerveja dentre outros (CAPELLARI, 2010; FORSYTHE, 2013). As BAL heterofermentativas principais são *Weissella* spp. e *Leuconostoc* spp., assim como alguns lactobacilos. A produção de ácido por elas assume um papel de aromatizantes nos alimentos em que se encontram, sendo, por este motivo, também empregados em larga escala em indústrias de laticínios (CAPELLARI, 2010; FORSYTHE, 2013).

BACTÉRIAS QUE FAZEM PARTE DO GRUPO DAS BAL

As bactérias que fazem parte do grupo das LAB são dos gêneros *Alloiococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* e *Vagococcus* (CROWLEY et al., 2013). Segundo Sabo et al., (2014) e Loureiro, (2015), as bactérias ácido lácticas de maior importância para a indústria de alimentos destacam-se aquelas pertencentes a onze gêneros: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Bifidobacterium*, *Vagococcus* e *Weissella*, sendo o *Lactobacillus plantarum*, encontrado em uma imensa variedade de alimentos, podendo ser isolado de produtos lácteos, assim como, em produtos fermentados cárneos como salames, salsichas, entre outros alimentos de origem vegetal, como chucrute e vinhos.

Esse grupo de bactérias expressa atividade antagonista contra microrganismos patogênicos e deteriorantes muito importantes em alimentos (BELLO et al., 2010). Alguns estudos identificaram o *Lactobacillus* spp., como sendo o principal gênero de LAB inibidor de microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* (DUARTE et al., 2016; NETO et al., 2013).

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

A forma de identificação da BAL pode ser realizada através de seu crescimento em meios de cultura seletivos, seja em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) ou M17, testes bioquímicos e fisiológicos, pode ser usado também coloração de Gram e as provas de catalase e urease, e moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (RESENDE et al., 2011; SILVA, 2016). Para isolamento destas bactérias os meios mais utilizados estão o ágar M17, mais seletivo para bactérias com morfologia de cocos, o ágar Rogosa acidificado ou ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe), para bactérias com morfologia de bacilos (CARVALHO, 2007; SILVA, 2016).

A identificação do fenótipo das BAL é realizada através de meios de cultura seletivos, através da técnica de coloração de Gram e posteriormente a bacterioscopia, que permite a verificação das características morfológicas, ou seja, se são cocos ou bacilos, permitindo uma identificação presuntiva de triagem ou confirmatório (PEREIRA, 2017). O teste de catalase também é de extrema importância na triagem das BAL, pois são catalase negativa. Apesar de ser um método relativamente sensível, pode ter suas limitações devido à dificuldade de discriminar algumas espécies e cepas. Dessa forma, é necessária a utilização de outros testes para classificar em gênero e espécie, como a PCR espécie-específica, esta técnica tem sido a mais empregada para confirmar a identificação bioquímica de microrganismos (EMBRAPA, 2011).

Vários métodos moleculares têm sido aplicados na identificação e caracterização de microrganismos. Dentre essas, a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) se destaca, pois tem sido bastante utilizada para confirmação e identificação de LAB (GANDRA et al., 2008, PERIN, 2016).

PRESENÇA DAS BAL NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS

No processo final da produção dos queijos, as culturas iniciadoras (starter) estão presentes de forma frequente em quantidades superiores a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de queijo durante a fase de maturação, as Bactérias Acido Láticas dominam a microbiota presente (STEELE et al., 2013). A presença dessas bactérias, embora possuam como principal função a produção de ácido lático no decorrer do processo fermentativo, tem uma atuação muito importante na maturação dos queijos, visto que suas enzimas estão envolvidas de modo direto nos processos de proteólise, lipólise e conversão de aminoácidos em compostos aromáticos (SLATTERY et al., 2010). A primeira fonte de enzimas do queijo é sua microbiota que influencia no desenvolvimento do aroma (STEELE et al., 2013). Hayaloglu e McSweeney (2014) relatam que o processo de maturação de queijos pode ser descrito como um conjunto complexo de eventos bioquímicos que envolvem em torno de três mecanismos de modificação dos compostos orgânicos presentes nos queijos. Estes mecanismos são a proteólise, lipólise e o metabolismo da lactose, ácido cítrico e aminoácidos, que podem originar centenas de metabólitos. Os autores descrevem que o processo é influenciado por fatores dentre os quais se destaca a composição da microbiota formada durante o processamento do queijo.

As bactérias lácticas (BAL) que são utilizadas na produção de queijos podem ser mesofílicas ou termofílicas. Culturas mesofílicas são basicamente compostas por *Lactococcus lactis*, que produzem ácido lático em temperaturas que variam de 38°C a 40°C (BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

A atuação dessas bactérias é importante para controlar a acidificação da massa até a formação da coalhada. Desta forma a diminuição do pH apenas pela ação do coagulante levaria à retenção deste coagulante na coalhada, e as reações que ocorrem pela proteólise continuariam durante o processo de maturação do queijo, o que desencadearia quebra gradual da estrutura do queijo e defeitos de sabor (BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

Para as indústrias produtoras de queijo, os microrganismos exercem funções importantes que contribuem para a maturação do queijo e contribuem na textura, sabor e no aroma do produto; e podem ser divididos em culturas iniciadoras (starter) ou culturas adjuntas, também denominadas de culturas secundárias (TAMANINI et al., 2012).

Um efeito benéfico das BAL é a sua capacidade de auxiliar na garantia de inocuidade de produtos alimentares. Alguns estudos já mostraram que as BAL desempenham atividade inibitória considerável sobre microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes nos alimentos (NERO et al., 2008; DAL BELLO et al., 2010; MORAES et al., 2012; PERIN et al., 2012).

PROTEÓLISE, LIPÓLISE E GLICÓLISE

Ao longo do processo de maturação dos queijos, acontecem processos bioquímicos, químicos e físicos, que irão acrescentar transformações correspondentes à proteólise, lipólise e glicólise, que deverão desempenhar grande influência sobre o sabor, aroma, textura dos queijos e outros fatores que afetam diretamente a composição do produto final (FIALHO, 2015).

Dentre as alterações acontecidas na maturação à proteólise o principal fenômeno que ocorre na fabricação de queijos, uma vez que, a produção de aminoácidos e peptídeos irá propiciar aroma e sabor ao alimento. No decorrer do fenômeno da proteólise, também ocorrerá mudanças no pH em função da formação de amônia, alterações na textura em função da quebra de proteínas e maior ligação de água pelos grupos formados, amino e carboxílicos (FOX et al., 2000; SANTIS, 2016).

O fenômeno da proteólise leva a mudanças na textura do queijo por meio da hidrólise da matriz proteica, gerando aumento da capacidade de retenção de água resultante da quebra das ligações peptídicas e consequente liberação de grupos carboxílico e amino e o aumento do pH devido a liberação de amônia (UPADHYAY et al., 2004).

O desenvolvimento da textura do queijo pode ocorrer através da matriz de proteínas, diminuição do a_w ou, então, indiretamente por um aumento do pH causado pela liberação de amônia dos aminoácidos produzidos por proteólise. A formação do aroma e do sabor pode dar-se de forma direta através da produção de pequenos peptídeos e aminoácidos ou, indiretamente, pela liberação de aminoácidos que agem como substratos de diversas reações catabólicas (COSTA 2012). A reação da proteólise na fabricação dos queijos pode ser catalisada por proteinases e peptidases, e pode possuir origens diferentes,

como pela flora adventícia do leite, o coagulante ou pela microflora secundária (COSTA 2012).

As bactérias ácido lácticas (BAL) presentes na flora adventícia do leite contam com uma proteinase que colabora para a cura do queijo através da hidrólise de peptídeos de pequena e média dimensão produzidos a partir da caseína pela ação de coagulantes como a quimosina ou a plasmina. As LAB associadas à flora adventícia do queijo desenvolvem-se ao longo da maturação. As proteinases e as peptidases destas bactérias são normalmente semelhantes às da flora adventícia e colaboram para a cura de um modo semelhante. Em algumas variedades de queijo é motivado o desenvolvimento de microflora secundária, a qual, por vezes, é deliberadamente adicionada. A grande maioria destes microrganismos contém uma atividade enzimática forte, incluindo proteinases e peptidases que contribuem substancialmente para a proteólise nestes casos (COSTA 2012).

Na fabricação de queijos a lipólise, que hidrolisa a gordura a glicerol e ácidos graxos, influencia predominantemente no sabor e no aroma final do produto (ROBINSON et al., 2010).

As enzimas lipolíticas podem ser classificadas como esterases e lipases, sendo que as lipases no queijo podem ter seis diferentes origens: o leite, o coagulante, as bactérias de arranque (starter), os microrganismos secundários bactérias lácticas “NSLAB” e preparações de lipases exógenas (COSTA 2012).

A glicólise tem atuação mais discreta que a proteólise, porém, não menos importante na fabricação do queijo, atua em conjunto com as bactérias lácticas, degradando os açúcares, principalmente a lactose, em ácido láctico, acidificando o meio, influenciando na textura e acidez do queijo (ROBINSON; WILBEY, 2010).

CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICA (LAB)

A classificação das culturas lácticas é dividida em bactérias ácido-lácticas starter (*Starter Lactic Acid Bacteria* - SLAB) ou iniciadoras, por terem a capacidade de metabolizar a lactose e, as culturas non starter (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* - NSLAB) ou não iniciadoras ou adjuntas, se evidenciando durante o processo de fabricação e período de maturação dos queijos (LINDNER, 2008).

As espécies de SLAB utilizadas na fabricação de queijos podem ser mesofílicas ou termofílica. As espécies mesofílicas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris* são utilizadas para a produção de queijo. Essas espécies mesofílicas podem ser suplementadas com citrato *Lactococcus lactis* fermentando e várias espécies de *Leuconostoc* para a produção de queijos especiais. Além do SLAB mesofílico, o SLAB termofílico, como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus helveticus* são utilizados para a produção de queijos de massa filata e do tipo suíço. Frequentemente, *S. termófilos* e / ou *Lactobacillus helveticus* podem ser adicionadas às culturas mesofílicas usadas para produzir queijos com uma mistura meso-térmica. As misturas proporcionam maior robustez do fago e maiores propriedades de sabor (MCSWEENEY, 2017; YVON et al., 1997). Segundo os autores além da fermentação de lactose, as SLAB também são importantes para a degradação da caseína em peptídeos e aminoácidos livres e na biotransformação desses aminoácidos livres em uma diversidade muito grande de compostos aromáticos. (MCSWEENEY, 2017; YVON et al., 1997). As SLAB são responsáveis pela produção de ácido e estão envolvidos no endurecimento durante o processo de fabricação do queijo. (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS STARTER (*Starter Lactic Acid Bacteria* - SLAB)

As bactérias do ácido láctico starter (*Starter Lactic Acid Bacteria* - SLAB) são usadas como culturas de arranque para o processo de fabricação do queijo, podendo ser adicionadas inicialmente ou fazerem parte da microflora natural do leite (WOUTERS et al., 2002). As culturas de arranque ou bactérias starter têm como função acidificar o leite e como consequência dessa acidificação, inibir o crescimento de outras bactérias (WOUTERS et al., 2002; CARMINATI et al., 2010).

As culturas iniciais também podem ser divididas em mesofílicas iniciantes, com uma temperatura ideal de crescimento de 25 a 30 ° C e entradas termofílicas, que crescem melhor entre 40 e 45 ° C. Os iniciantes mesofílicos podem conter apenas estirpes acidificantes ou uma mistura de acidificantes e BAL de fermentação de citrato. A BAL utilizada com mais frequência em culturas iniciantes mesofílicas são *Lactococcus lactis*, incluindo a subespécie *L. lactis ssp. lactis* e *L. lactis ssp. cremoris*, mas entradas

indefinidas também podem conter estirpes de *Leuconostoc spp.*, para fermentação de citrato (GATTI et al., 2014).

As culturas iniciadoras termofílicas geralmente incluem cepas de *Streptococcus thermophilus*, normalmente usados para a produção de queijos semiduros e duros. A BAL usa a lactose como fonte de carbono, resultando na produção de altas concentrações de ácido láctico e o crescimento de BAL no leite durante o estágio inicial da produção de queijo (GATTI et al., 2014).

As densidades de células iniciais na maioria das variedades de queijo são aproximadamente 10^8 a 10^9 ufc/g durante o processo de fabricação dos queijos (PARENTE et al., 2017). Durante os primeiros passos do amadurecimento, uma redução substancial na população SLAB pode ocorrer acompanhada de autólise celular e liberação de enzimas intracelulares, dependendo das características das estirpes utilizadas (STEELE et al., 2013).

BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS NÃO STARTER (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* - NSLAB)

A NSLAB provém geralmente do leite sem nenhum processamento, ou seja, in natura e da fabricação de queijos, e pode variar significativamente de uma fábrica de laticínios para outra (BANKS; WILLIAMS, 2004; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010; SGARBI et al., 2013).

Por outro lado, a bactéria NSLAB, também caracterizado como 'não iniciadora', é encontrada naturalmente no leite cru ou derivam de outras fontes, contaminações em propriedades ou plantas leiteiras e geralmente crescem com atraso durante a maturação do queijo (BERESFORD et al., 2001; KAGKLI et al., 2007). Esse crescimento ocorre à custa de substratos do leite que não são metabolizados pela SLAB ou subprodutos catabólicos de SLAB ou intracelulares nutrientes liberados pelas células SLAB após a autólise (SGARBI et al., 2013; GOBBETTI et al., 2015).

O grupo das NSLAB possui uma grande diversificação. A mais frequente e tecnologicamente NSLAB importante nas fermentações tradicionais de queijo é o genômico grupos de *Lactobacillus*, são heterofermentativo facultativo e mesofílico, fazem parte desse grupo: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus*

rhamnosus, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum*, vários heterofermentativos obrigatórios *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *E. faecium*, *E. faecalis* *E. durans* (BERESFORD et al., 2001; MONTEL et al., 2014; GOBBETTI et al., 2015).

RISCO RELACIONADO À CONTAMINAÇÃO DE QUEIJOS PELO USO DE BACTÉRIAS ACIDO LÁTICAS (BAL)

Apesar das bactérias ácido lácticas (BAL) serem consideradas seguras e que trazem benefícios ao homem, vem aumentando a preocupação com relação aos seus aspectos de segurança, sendo que algumas cepas de gêneros diferentes exibiram a presença de fatores de virulência, apresentaram também resistência a antibióticos ou tiveram alguma associação relacionada ao desenvolvimento de doenças (ADIMPONG et al., 2012; GIRAFFA, 2012).

Diante da aparente necessidade de desenvolver mecanismos para a definição de prioridades associados com o risco de usar essas bactérias na produção de alimentos, a (European Food Safety Authority (EFSA)) tem considerado que é preciso realizar uma avaliação formal da segurança, assim, um sistema foi proposto para fazer uma avaliação de segurança pré-comercialização de alguns grupos selecionados de microrganismos, levando a concessão de uma "Presunção de Segurança Qualificada" (QPS) (EFSA, 2007)..

Desta forma, a EFSA propôs que a avaliação da segurança de um grupo taxonômico definido, tal como um gênero ou um grupo de espécies relacionadas poderá ser feito com base na confirmação da identidade, possível patogenicidade e uso final (EFSA, 2007). Um dos grandes problemas na abordagem da QPS é a dificuldade de aplicar uma abordagem de estirpe para estirpe de culturas microbianas indefinidas, como são encontradas em diversos alimentos fermentados, como queijos e salames; onde a fermentação é baseada no uso dessas culturas indefinidas e/ou na reutilização de uma porção da produção anterior (ROSSETTI et al., 2009).

Segundo Rossetti et al., (2009), investigações sistemáticas raramente têm sido realizadas, não há base de conhecimento disponível para estes microrganismos,

entretanto, em muitos casos, existe uma longa e documentada história de uso seguro de BAL em alimentos.

Um fator de imensa relevância para garantir a segurança da cultura láctica utilizada é a verificação da presença dos genes que compõem a produção das amins biogênicas. As amins são bases orgânicas que possuem baixo peso molecular e de atividade biológica, podendo apresentar efeitos tóxicos se forem ingeridas em altas concentrações ou quando a desintoxicação natural do organismo for inibida pela ação de algum medicamento ou por alguma característica genética (GARAI et al., 2007; CALZADA, 2013).

Na formação das amins biogênicas à necessidade que se tenha a presença de microrganismos que são descarboxilase positiva, característica esta que é observada em muitos gêneros de BAL. Microrganismos que conseguem produzir quantidades consideráveis de amins biogênicas em condições de processamento não devem ser utilizados como culturas iniciadoras (starter) em alimentos fermentados (LORENCOVÁ et al., 2012).

PROCESSO FERMENTATIVO DAS BACTÉRIAS ACIDO LÁCTICA (BAL)

As bactérias do ácido láctico (BAL) são um dos grupos mais importantes de microrganismos usados na indústria de alimentos, pois possuem o status de (Generally A Asised As Safe (GRAS)) e são usados na fermentação de produtos de consumo comum, como iogurte, queijo e salsichas (PEREIRA et al., 2017). A fermentação com ácido láctico produz ácido láctico e outros metabólitos responsáveis pelas características alteradas e potencialmente pelas atividades biológicas aprimoradas dos produtos obtidos na fermentação (CAGNO et al., 2011; PEREIRA et al., 2017). A definição do fermento láctico compreende em uma preparação microbiana contendo números elevados de células de um ou mais gêneros, espécies e cepas de LAB (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Na elaboração de queijos, sua função está relacionada à produção de ácido láctico, que facilita a ação do coalho e auxilia na expulsão do soro, além do desenvolvimento das características sensoriais do queijo e o controle do crescimento de patógenos (TODESCATTO, 2014). Algumas culturas lácticas autóctones, compostas por bactérias

“*starter*” e adjuntas, tem sido selecionada do leite e queijos artesanais a fim de obter um fermento láctico para a produção de queijo fabricado com leite pasteurizado (GONZÁLEZ et al., 2010).

Algumas cepas microbianas específicas têm sido isoladas a partir do leite e adicionadas como culturas *starter* ou adjuntas durante o processo de fabricação dos produtos, a fim de conferir as características sensoriais desejáveis (QUIGLEY et al., 2013). A utilização de culturas lácticas, que apresentam comprovada atividade antimicrobiana, na produção de alimentos fermentados torna esses produtos mais seguros ao consumidor, bem como aumentam a sua vida de prateleira, uma vez que inibem o crescimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos (COSTA et al., 2012).

A produção do ácido láctico ocorre a partir da utilização da principal fonte de nutrientes dessas bactérias que geralmente são os carboidratos, como a glicose (IKEDA et al., 2013).

Segundo Ikeda et al., (2013) as BAL têm grande capacidade de degradar diferentes carboidratos, resultando predominantemente em ácido láctico. Aproximadamente 50% de todo o carboidrato consumido por essas bactérias seja convertido em ácido láctico. Essa conversão ocorre por duas vias metabólicas conhecidas como homo e heterofermentativas. Na via homofermentativa, também conhecida como *Embden-Meyerhof-Parnas* ou glicolítica, ocorre a produção quase que exclusiva de ácido láctico.

Nessa via ocorre à formação da frutose-1-6-difosfato que é clivada, por uma aldeose, em di-hidroacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP). Tanto o GAP quanto o DHAP (oriunda do GAP) são convertidos em piruvato que, em condições normais (excesso de carboidratos e pouco oxigênio), é reduzido a ácido láctico. Contudo na via heterofermentativa, que também é conhecida como 6-fosfogluconato/fosfocetolase ou via das pentoses fosfatos, ocorre uma desidrogenação inicial que resulta na formação de 6-fosfogluconato, seguida de uma descarboxilação. A pentose remanescente é clivada em GAP e acetil fosfato. O GAP é metabolizado resultando na formação de ácido láctico enquanto que o acetil é reduzido a etanol por intermédio de reduções de acetil-CoA e acetoaldeído (IKEDA et al., 2013).

CONVERSÃO DO LEITE EM QUEIJO PELA AÇÃO DAS BACTÉRIAS SLAB E NSLAB

A conversão de leite em queijo ocorre por um processo de duas etapas. Na primeira etapa, o leite é convertido em coalhada fresca, já na segunda etapa a coalhada fresca é convertida em queijo amadurecido. Na primeira etapa, a bactéria (*Starter Lactic Acid Bacteria* – SLAB) cresce rapidamente no leite devido à grande quantidade de substrato disponível (lactose) e após aproximadamente 24 horas atingem níveis de 10^9 ufc g⁻¹ em a coalhada fresca. Nenhum crescimento adicional de SLAB ocorre na coalhada fresca devido à hostilidade do ambiente encontrado (ausência de carboidrato fermentável, alta concentração de sal e pH baixo). Contudo, na segunda etapa, que ocorre ao longo de vários meses, os números da bactéria SLAB entram em declínio, enquanto os números da bactéria (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* – NSLAB) começam a aumentar. No início da maturação, a bactéria NSLAB começa em níveis bastante baixos de 10^1 - 10^3 ufc g⁻¹ e pode ser de fato indetectável usando técnicas convencionais de revestimento. À medida que a maturação progride, seu número aumenta para aproximadamente 10^7 - 10^8 ufc g⁻¹ (FITZSIMONS, COGAN, CONDON, & BERESFORD, 2001; LINDNER et al., 2008; GATTI et al., 2008; MCMAHON et al., 2014).

A bactérias ácido lácticas SLAB e a NSLAB se desenvolvem como colônias imobilizadas no queijo durante a maturação, tornando-as dependentes da difusão de metabólitos na matriz de queijo. A distribuição das células bacterianas imobilizadas na matriz de queijos é aleatória e, entretanto, foi evidenciado que a distância média entre as colônias é fortemente afetada pelos níveis iniciais de inoculação (JEANSON et al., 2011).

IMPORTÂNCIA DAS NSLAB NA MATURAÇÃO DE QUEIJOS

O processo de maturação dos queijos é um conjunto de reações lentas e delicadas que influenciam de modo direto nas características organolépticas finais do queijo. A mesma ocorre em câmaras frigoríficas com temperatura e umidade controlada, normalmente em temperaturas entre 5°C e 10°C e umidade relativa do ar entre 84 e 90%

(MELLO; ARMACHUK, 2013). Tais condições favorecem que as atividades microbiológicas e enzimáticas desejáveis ocorram da mesma forma, impedem o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Ao longo do processo de maturação, ocorrem processos físicos, bioquímicos e microbiológicos, que resultam na produção de inúmeras substâncias que se acumulam colaborando para o sabor e aroma (cetonas, aldeídos, peptídeos, ácidos graxos livres entre outros) (MELLO; ARMACHUK, 2013).

O desenvolvimento da bactéria (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* – NSLAB) durante o amadurecimento do queijo pode ser atribuído parcialmente à sua capacidade de usar as fontes alternativas de nutrientes disponíveis (LAZZI et al., 2014). Como a lactose no queijo é metabolizada nas primeiras semanas de amadurecimento, o NSLAB pode derivar energia de compostos como ácido láctico, ácido cítrico, ribose, ácidos graxos, glicol e AA (BROADBENT et al., 2003). O potencial redox afeta a produção de compostos aromatizantes através do metabolismo microbiano e reações químicas. Vários equilíbrios influenciam as mudanças no potencial de redução da oxidação (MCSWEENEY et al., 2010).

As NSLAB são bactérias adventícias que desempenham um papel importante durante o amadurecimento, melhorando o desenvolvimento do sabor (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

Segundo Settanni e Moschetti, (2010) a bactéria NSLAB pode estar presente em baixas concentrações após fabricação do queijo (10^2 a 10^3 ufc / g), porém, suas populações tendem a aumentar lentamente em torno de 4 a 6 (log ufc/g) nos primeiros meses de maturação.

Alternativamente, algumas espécies heterofermentativas podem utilizar pentoses como ribose e desoxirribose, liberadas após a lise de células de SLAB, o que normalmente ocorre durante o processo de maturação (SETTANI; MOSCHETTI 2010). No entanto, neste contexto, os autores destacam que as glicoproteínas, proteínas, peptídeos, glicopeptídeos e aminoácidos, presentes em altas concentrações, são os principais substratos para as bactérias NSLAB durante o processo de maturação. As NSLAB desempenham um papel essencial na degradação das caseínas e peptídeos, e por meio destes processos, contribuem significativamente para a liberação de aminoácidos livres e peptídeos de baixa massa molecular (SETTANI; MOSCHETTI 2010). Os autores descrevem que a intensidade da proteólise, que resulta na liberação de aminoácidos livres, contribui diretamente para o sabor do queijo e indiretamente para a formação de aromas,

uma vez que os aminoácidos liberados são metabolizados pela microbiota do queijo dando origem a diversos compostos voláteis como diacetil, 2,3- butanodiol e acetoína (SETTANI; MOSCHETTI 2010).

Os gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* compreendem várias espécies (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroide*), com capacidade de inibir a proliferação de bactérias indesejáveis em alimentos em virtude de sua eficácia na produção de várias substâncias antimicrobianas, que incluem ácidos orgânicos, diacetil, bactericidas, peróxido de hidrogênio, antibióticos de baixa massa molecular (reuterina e reuterociclina) e entre outros, (GALVEZ et al., 2008; SETTANNI et al., 2011; KUMARI et al., 2012; DIGAITIENE et al., 2012; REIS et al., 2012; YANG et al., 2012; RATHER et al., 2014).

A biopreservação constitui uma poderosa ferramenta para se estender o *shelf-life* e aumentar a segurança de alimentos por meio da aplicação de microrganismos naturalmente presentes nos mesmos, sem a necessidade da utilização de aditivos artificiais na produção do queijo (REIS et al. 2012). Seguindo essa mesma linha de raciocínio, Settani et al. (2011) descreveram que o efeito da adição de NSLAB sobre a vida de prateleira do queijo fresco. Neste estudo, constataram que a adição em conjunto de *L. paracasei* NdP78 e *Streptococcus macedonicus* NdP1 como adjuntos foi capaz de estender a vida de prateleira do produto, da mesma forma melhorar a qualidade microbiológica no que se refere às concentrações de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus sp.* e à atividade antilisteria, caracterizando também uma influência positiva sobre as características sensoriais do produto.

IMPACTO DAS NSLAB NA QUALIDADE DOS QUEIJOS

As bactérias (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* - NSLAB) são comumente encontradas no leite cru e também dentro da indústria láctea, dentro das tubulações e dos equipamentos de produção por onde circula o leite pasteurizado, bem como em equipamentos e utensílios utilizados na fabricação de queijos. Há também possibilidade de serem encontradas no ar ambiente da indústria (MOURA, 2017).

As NSLAB devem atender a vários critérios, elas têm que acidificar para atingir e manter altas densidades celulares no leite para evitar defeitos no queijo, e afetar negativamente a qualidade geral do queijo (CROW et al., 2001; CAGNO et al., 2011; GOBBETTI et al., 2015).

Bokulich and Mills (2013) relataram a existência nas instalações de “casas” nos equipamentos, uma microbiota específica e sugeriu que essa microbiota tem papel potencial na formação de características específicas do produto final.

O processo de pasteurização convencional do leite utilizado na fabricação de queijos consegue eliminar a totalidade das bactérias patogênicas. No entanto, de alguma forma uma pequena parte destas bactérias que estavam presente no leite cru consegue sobreviver e permanece no leite pasteurizado (HANSEN, 2017). O resfriamento do leite que é uma prática comum seja ele com temperatura de coagulação ou de estocagem, contribui para que o leite pasteurizado e armazenado por longos períodos beneficie o crescimento dessas bactérias na superfície destes equipamentos, com isso acaba desfavorecendo os processos frequentes de limpeza, pois muitas vezes acabam ultrapassando o tempo recomendado para realização da limpeza CIP no circuito (HANSEN, 2017).

Desta maneira à medida que o equipamento fica por muito tempo sem a realização da limpeza, amplia-se a possibilidade de um aumento na carga das bactérias NSLAB no leite pasteurizado. Outro ponto que merece atenção dentro na produção é o tempo em que o leite se mantém parado para a pré-maturação do queijo, seja pela característica da cultura ou mesmo por questões operacionais da indústria (HANSEN, 2017). Precisa-se cuidado redobrado para evitar esta operação tratando-se da fabricação de queijos, já que isso acaba contribuindo para o crescimento das bactérias NSLAB. Na maior parte dos queijos a contagem das bactérias NSLAB nos primeiros dias de fabricação é baixa, ao mesmo tempo em que a contagem das bactérias iniciadoras (starter) é alta. Conforme o tempo em que o queijo permanece estocado, as bactérias iniciadoras do fermento diminuem sua população dando lugar ao crescimento das bactérias NSLAB, dinâmica está fortemente influenciada pela quantidade residual de açúcares pós salga existente e pela temperatura de estocagem do queijo (HANSEN, 2017). Para que se possa ter uma ideia do grau de interferência da temperatura de estocagem dos queijos no crescimento destas bactérias é possível ter uma redução de até três ordens logarítmicas à medida que a temperatura cai de 08 para 03°C. (HANSEN, 2017).

DEFEITOS EM QUEIJOS

Apesar de que exerça influência no processo maturação de alguns queijos, estima-se que em torno de 80% dos defeitos encontrados nos queijos estejam relacionados às bactérias NSLAB, seja pelo evento da proteólise (descaracterização da textura e off flavours), e/ou pela produção de gás e racemização do L-Lactato em D-Lactato dificultando assim a abertura de olhaduras em alguns tipos de queijos com bactérias propiônicas ou mesmo na formação de cristais de lactato na superfície dos queijos (pó branco) (HANSEN, 2017).

As NSLAB são consideradas um grupo de bactérias bastante grande que pode variar de uma região para outra, ocorrendo em muitos casos resistência à pasteurização. As NSLAB influenciam principalmente na maturação de queijos alterando sua textura e flavor. Novamente é importante destacar a importância da baixa CBT no leite, que de forma direta, está associada à menor presença de NSLAB (SACCO, 2013).

A produção de gás pelos lactobacilos heterofermentativos, que no caso de alguns tipos de queijos são desejáveis, em outros são classificados como defeitos que podem ser de textura e sabor. Inicialmente essas bactérias podem ser encontradas em pequenas quantidades no leite, e podem atingir mais de 10^7 UFC.g⁻¹ dentro de 4 a 6 semanas, podendo produzir quantidades excessivas de CO₂, contribuindo para o início da formação olhaduras ou rachaduras dependendo do tipo de consistência do queijo e de sabor não característico do queijo (FURTADO, 2017).

Alguns tipos de acidificação são confundidos com a de um cultivo mais lento, no entanto, trata-se de uma fermentação realizada pelas bactérias NSLAB. É comum nestes casos ocorrer a diminuição da dose do fermento utilizado à medida que o pasteurizador fica sem a realização da limpeza CIP, ou a limpeza ocorre em um longo espaço de tempo o que torna a fermentação quase que exclusiva pelas bactérias NSLAB (HANSEN, 2017). Esta operação acarreta em consequências muito graves para a produção dos queijos, porque leva ao aparecimento de alterações como, sabores indefinidos aos queijos (muitas vezes amargo), amolecimento (queijo muçarela) e off flavours e abertura de massa (Queijo Prato) devido à intensa proteólise e em alguns casos ocorre a abertura da massa devido à produção de gás (HANSEN, 2017).

ESTUDOS DO IMPACTO DA NSLAB NA INDÚSTRIA LÁCTEA

Em estudo publicado por Başar, (2019), foram coletadas 144 amostras de três laticínios durante o período de maturação do queijo Ezine, na região de Çanakkale, região montanhosa de Ida, na Turquia. A composição físico-química e as análises de identificação do NSLAB foram realizadas usando métodos convencionais e moleculares. Os resultados indicam que o NSLAB contribui para a estabilidade microbiológica do queijo Ezine ao longo de 12 meses de maturação. O isolamento do NSLAB com atividade antimicrobiana, potenciais produtores de bacteriocina, produziu coleções definidas de isolados naturais de NSLAB do queijo Ezine. O estudo também relatou que após o processo de pasteurização, algumas cepas NSLAB resistentes ao calor permanecem, recuperando e proliferando durante o período de maturação. Além disso, a capacidade de algumas LAB mesofílico de formar biofilmes serve como fonte para as NSLAB através da contaminação pós-pasteurização (BAŞAR, 2019).

Em matéria publicada por Moura, (2017) mais da metade dos problemas de queijos estão relacionados às NSLAB. Problemas causados por proteólise (amolecimento, sabor e odor estranho); produção de gás e rancemização do lactato, causando problema em queijos como olhaduras, bem como aparecimento de manchas como pó um branco na casca dos queijos, devido à formação de cristais de lactato na superfície dos mesmos (MOURA, 2017).

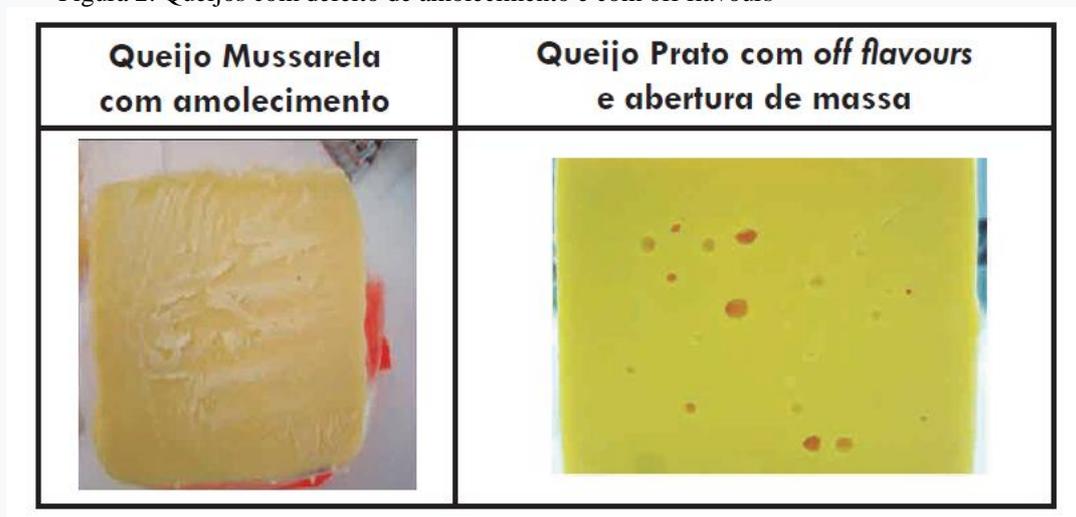
Figura 1: Queijo com produção de gás e rancemização do lactato



Fonte: (MOURA, 2017)

Corroborando da mesma descrição, a revista Laticínios publicou em seu caderno Técnico que mesmo exercendo uma enorme influência na fase de maturação de alguns tipos de queijos, estima-se que 80% dos defeitos encontrados nos queijos possam estar relacionados às bactérias NSLAB, esses defeitos podem ser por proteólise (descaracterização de textura e *off flavours*), pela produção de gás e racemização do L-Lactato em D-Lactato (HANSEN, 2017).

Figura 2: Queijos com defeito de amolecimento e com *off flavours*



Fonte: (HANSEN, 2017).

Segundo a EPAMIG ILCT, que desenvolve estudos e pesquisas com queijos artesanais de leite cru, relata que algumas bactérias lácticas selvagens presentes no leite cru, chamadas bactérias lácticas não adicionadas (NSLAB), também podem produzir gases e consequentemente olhadura, que não necessariamente seria considerada estufamento, ou seja, o queijo possui algumas olhaduras, mas seu sabor e odor são agradáveis, diferente do queijo estufado (EPAMIG, 2019).

CONCLUSÃO

As *Non-Starter Lactic Acid Bacteria* (NSLAB), fazem parte da flora de bactérias secundária que se desenvolve espontaneamente nos queijos e alimentos fermentados durante a maturação.

O presente trabalho reintera que os cuidados com as BPF podem evitar esses defeitos, tais como: Cumprimento da IN 76, que trata das características e da qualidade do produto na indústria e da IN 77, que define critérios para obtenção de leite de qualidade e seguro ao consumidor. Monitoramento por meio de análises microbiológicas de todos os processos de limpeza CIP, tanques de transporte rodoviário, tanques de estocagem e análise microbiológica de todos os utensílios utilizados na fabricação do queijo. Monitorar as contagens de CBT no leite cru bem como a contagem de NSLAB no leite pasteurizado. Evitar cultivos com fase Lag extensa ou períodos largos de pré-maturação do leite. Adotar temperatura de estocagem dos queijos o mais próximo de 4 °C e nos casos de queijos maturados, evitar temperaturas muito altas de maturação. Utilizar combinação de cultivos que minimize a quantidade de açúcares residuais pós salga. Diminuir a dependência da fermentação das NSLAB respeitando a dose correta do fermento. Sob aspectos futuros é importante a realização de novas pesquisas buscando aprofundar os conhecimentos a respeito da ação das NSLAB como agentes envolvidos na maturação dos queijos para preencher lacunas ainda existentes.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus primeiramente, pela vida, saúde e coragem para chegar até aqui. Mesmo com tantas dificuldades pelo caminho, Ele nunca me deixou desistir. Foram inúmeros quilômetros rodados em cima de uma moto para alcançar um objetivo, sol, chuva, buracos, dores no corpo, sustos na estrada, cansaço, tudo superado pela graça de Deus.

Aos meus pais, Antonio Lunardi (in memoriam) e Delurde Adelia Lunardi pelo amor incondicional e apoio. Ao meu pai, que foi meu exemplo de superação, simplicidade e luta, que mesmo sem ter muito estudo me ensinou a ser uma pessoa íntegra e de princípios. A minha mãe que sempre esteve do meu lado me ajudando, me apoiando e a cada dia que eu pegava a estrada ela rezava por mim, quando eu pensava em desistir, ela me sustentava.

A minha esposa Nilza pelo apoio e pelas incansáveis orações, pedindo que Deus me protegesse e cuidasse de mim nas estradas.

Aos meus irmãos, pelo apoio, pela ajuda que sempre me deram quando precisei.

Ao meu orientador Prof. Paulo Henrique Gasparotto, pela prestatividade, competência e paciência durante todo o período de realização desse trabalho e de vida acadêmica. Terei seu exemplo de profissional e ser humano por toda vida, lembrando sempre de sua humildade.

A todos os meus colegas de turma, que compartilharam comigo as horas de estudo e de conhecimento, sempre me ajudando no que fosse preciso, fazendo com que os dias de estudo se tornassem mais leves.

REFERÊNCIAS

ADIMPONG, D. B. et al. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 75, p. 1-12, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2180-12-75>. Acesso: 05 mai. 2020.

ABIQ, Associação Brasileira de Indústrias de Queijo. **Mercado nacional de lácteos 2016**. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/noticias_interna.asp?codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6>. Acesso em: 05 mai. 2020.

BANKS, J. M., Williams, A. G. The role of the nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, 57, 145–152 (2004).

BAŞAR U. Physicochemical and Microbiological Characterization of Protected Designation of Origin Ezine Cheese: Assessment of Non-starter Lactic Acid Bacterial Diversity with Antimicrobial Activity. **Food Science of Animal Resources**. DOI <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e71>. Çanakkale, Turkey, 2019.

BELLO, B.D.; Rantsiou, K.; Bellio, A.; Zeppa, G.; Ambrosoli, R.; Civera, T.; Cocolin, L.; Microbial ecology of artisanal products from North West Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology** 43, 1151-1159, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810001040>. Acesso: 20 de mai. 2020.

BERESFORD, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M.,. Recent advances in cheese microbiology. **Int. Dairy J.** 11, 259–274, 2001.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In Fox, P. F. McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee, T. P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 3 ed. Amsterdam. Elsevier, p. 287-318, 2004.

BINTSIS, T.; ATHANASOULAS, A.; (2015) Dairy starter cultures, In: Papademas P, Editor, **Dairy Microbiology, A Practical Approach**, Boca Raton: CRC Press, 114–154, 2015.

BINTSIS T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. **J Bacteriol Mycol** 5: 1065, 2018.

BOKULICH, N. A.; D. Mills. Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. **Appl. Environ. Microbiol.** 79:5214–5223, 2013.

BROADBENT, J. R.; Houck K., M.; Johnson; C. Oberg. 2003. Influence of adjunct use and cheese microenvironment on nonstarter bacteria in reduced-fat Cheddar-type cheese. **J. Dairy Sci.** 86:2773–2782, 2003.

- BROOME, M. C.; LIMSOWTIN, G. K. Y. Starter Cultures: General Aspects. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences** 2 ed. Londres: Elsevier, 2011. p. 552 a 558. 2 v.
- CALZADA, J. et al. Reducing biogenic-amine-producing bacteria, decarboxylase activity, and biogenic amines in raw milk cheese by high-pressure treatments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1277-1283, 2013.
- CAPELLARI, J. B. **Biossíntese de ácido láctico por Lactobacillus amylovorus a partir de resíduos agroindustriais**. 71f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville. Joinville, 2010.
- CARMINATI, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., Reinheimer, J., Advances and Trends in Starter Cultures for Dairy Fermentations. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. Blackwell Publishing, USA, pp. 177-192, 2010.
- CARVALHO, J.D.G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.
- CHALITA, M. A. N.; SILVA, D.; PETTI, R. H. V. e SILVA, R. de O. P. “**Análise sócio-cultural do consumo de queijos e sua relação com a alimentação: diálogos entre classes sociais, estilos de vida e mercados de qualidade**”. XLVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER), Campo Grande/MS, julho. *Anais...*2010.
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Boletim VBP 2017**. Disponível em: <<http://cnabrazil.org.br/boletim/2017/10/30/vbp-29a-edicao/>>. Acesso em: 05 mai. 2020.
- CORRÊA, N. M.. **Análise de eficiência sobre a bovinocultura de leite, em bases microrregionais, do estado do Rio Grande do Sul**. Monografia (Gestão do Agronegócio). Faculdade UnB Planaltina. Brasília, DF. 2014.
- COSTA I. B. B. A. **Maturação em queijo dos Açores - Determinação de ácidos orgânicos e metabolismo do lactato**. Dissertação de Mestrado (Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos)- Instituto Superior de Agronomia de Lisboa, 2012.
- CROW, V., Curry, B., & Hayes, M. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. **International Dairy Journal**, v.11, p. 275-283, 2001.
- CROWLEY, S.; MAHONY, J.; SINDEREN, D. **Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives**. Trends in Food Science and Technology, v. 33, n. 2, p. 93-109, 2013.

COSTA, E. F. D.; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo; CAVALCANTI, Maria Taciana Holanda. **Queijos artesanais: fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais.** 2016.

DADALT, F., PADILHA, R. L., & SANT'ANNA, V. **Avaliação do tempo de cozimento da massa de queijo prato lanche sobre a umidade do produto maturado.** *Revista Eletrônica Científica Da UERGS*, 5(3), 257-262, 2019.

BELLO, B. D., RANTSIOU, K., BELLIO, A., ZEPPA, G., AMBROSOLI, R., CIVERA, T., COCOLIN, L., 2010. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology** v.43, p. 1151-1159, 2010.

LINDNER, J. D. D., J., Bernini, V., De Lorentiis, A., Pecorari, A., Neviani, E., & Gatti, M. (2008). Parmigiano Reggiano cheese: evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening. **Dairy Science and Technology**, 88, 511–523.

CAGNO, R. DI., Minervini, G., Rizzello, CG, De Angelis, M. e Gobbetti, M. (2011). **Efeito da fermentação do ácido láctico nas propriedades antioxidantes, textura, cor e sensoriais dos smoothies vermelhos e verdes.** *Microbiologia de Alimentos*, 28 (5), 1062-1071.

DIGAITIENE, A.; HANSEN, A. S.; Juodeikiene, G. EIDUKONYTE, D.; JOSEPHSEN, J. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, n.4, p.732-742, 2012.

DUARTE, M. C. K. H.; VORTEZ, N. M. dos. S.; MACEDO, N. C. de.; CORTEZ, M. A. S.; FRANCO, R. M. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy Food Science**, Amapá, v.3, n.1, p.1-10, 2016.

EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico Caracterização Molecular de Bactérias Lácticas Endógenas de Queijo de Coalho.**

Novembro de 2011. Disponível em:

<[www.cnpat.embrapa.br/download_publicacao.php?id= 345](http://www.cnpat.embrapa.br/download_publicacao.php?id=345)>. Acesso em: 01 de abril de 2020.

EPAMIG. Queijo Minas Artesanal - **Principais problemas de fabricação: manual técnico de orientação ao produtor.** pg 20 – Belo Horizonte: EPAMIG, 2019.

EFSA. European Food Safety Authority. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. **EFSA Journal**, v. 587, p.1-16, 2007.

FIALHO, T. L. **Identificação e ação antimicrobiana de peptídeos de queijo minas artesanal da Canastra.** 2015. 97f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

FITZSIMONS, N., Cogan, T. M., Condon, S., & Beresford, T. P. (2001). Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. **Journal of Applied Microbiology**, 90, 600.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos**. São Paulo: Setembro Editora, 2017.

GALVEZ, A.; LOPEZ, R. L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.28, n.2, p.128-152, 2008.

GANDRA, E.A., T.K.V; MELLO, W.S.; GODOI, H.S.; Técnicas moleculares aplicadas a microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**., 30(1): 111-112, 2008.

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

GATTI, M., B. Bottari, C. Lazzi, E. Neviani, and G. Mucchetti. 2014. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. **J. Dairy Sci.** 97:573–591.

GATTI, M., De Dea Linder, J., De Lorentiis, A., Bottari, B., Santarelli, M., Bernini, V., et al. (2008). Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano-Reggiano cheese production and ripening. **Applied Environ Microbiology**, 74, 6161–6167.

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

GOBBETTI, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., & Fox, P.F. (2015). Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. **Trends in Food Science & Technology**, 45, 167-178.

GONZÁLEZ, L.; SACRISTÁN, N.; ARENAS, R.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M. E. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. **Food Microbiology**, v.27, n.5, p.592-597, 2010.

HANSEN B., **O impacto das NSLAB na qualidade dos queijos**. Revista Indústria de Laticínios, São Paulo nº 124, ISSN 1678-7250, pg 24-25, Janeiro/Fevereiro 2017. Disponível em: http://www.revistalaticinios.com.br/download/edicoes_anteriores/IL-124-site.pdf . Acesso em: 11 de abr. 2017.

HAYALOGLU, A. A.; MCSWEENEY, P. L. H. Primary biochemical events during cheese ripening. In: OZER, B.; AKDEMIR-EVRENDILEK, G. **Dairy microbiology and biochemistry**: Recent developments. Boca Raton: CRC Press. 2014. 464p.

HAYEK, S. A.; IBRAHIM S.A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. **Food Nutr Sci** 4: 73–87, 2013.

HUERTAS.R.A.P.; **Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos.** Facultad de ciências agropecuárias. vol.8. enero-junio,2010.

IKEDA, D. M.; WEINERT JR.,E.; CHANG, K. C. S.; MCGINN, J. M.; MILLER, S. A.; KELIIHOOMALU, C.; DUPONTE, M. W. Natural Farming: Lactic Acid Bacteria. University of Hawai. **College of Tropical Agriculture and Human Resource.** Sustainable Agriculture. v. 8, 2013.

JEANSON, S., Chadoeuf, J., Madec, M. N., Aly, S., Floury, J., Brocklehurst, T. F., & Lortal, S. (2011). Spatial distribution of bacterial colonies in a model cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, 77, 1493–1500.

KAGKLI, D.M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., Cogan, T.M., 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm environment. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 243–251.

KUMARI, A.; AKKOÇ, N.; AKÇELIK, M. Purification and partial characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LL171. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.4, p.1647-1655, 2012.

LAZZI, C., S. Turrone, A. Mancini, E. Sgarbi, E. Neviani, P. Brigidi, and M. Gatti. 2014. Transcriptomic clues to understand the growth of *Lactobacillus rhamnosus* in cheese. **BMC Microbiol.** 14:28.

LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. **Sustainable Biotechnology, Springer Netherlands**, 2010. p.211-228.

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

LOUREIRO, D. S. P. M. **Estudos da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* B391 para potencial utilização na Indústria.** 73f. Dissertação (Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar) - Instituto Politécnico de Viana do Castelo. Viana do Castelo, 2015.

MCMAHON, D. J., Oberg, C. J., Drake, M. A., Farkye, N., Moyes, L. V, Arnold, M. R., et al. Effect of sodium, potassium, magnesium, and calcium salt cations on pH, proteolysis, organic acids, and microbial populations during storage of full-fat Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, 97, 4780–4798 (2014).

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview. In P. McSweeney, P. Fox, P. Cotter, & D. Everett (Eds.), **Cheese: Chemistry, physics and microbiology** (Vol. 1, pp. 379–387). London, UK: Academic Press, 2017.

MCSWEENEY, P. L. H., V. Caldeo, A. Topcu, and D. R. Cooke. Ripening of cheese: Oxidation-reduction potential and calcium phosphate. **Aust. J. Dairy Technol.** 65:178–184, 2010.

MELLO, E. Z. de.; ARMACHUK, M. A. **Avaliação das mudanças ocorridas no Queijo Colonial durante a maturação: modificações físico-químicas e microbiológicas.** 2013. 79 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Superior em Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2013.

MONTEL, M.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; DELBES-PAUS, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N. BERTHIER, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v.177, n.1, p.136-154, 2014.

MORAES, P.M., PERIN, L.M., TODOROV, S.D., SILVA, A., JR., FRANCO, B.D.G.M., NERO, L.A. Bacteriocinogenic and virulence potential of Enterococcus isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology** v.113, p.318-328. 2012.

MOURA, C. J. R. **A Influência da flora NSLAB na qualidade dos queijos.** Edição N.º 23 de março de 2017. Disponível em: https://issuu.com/fermentech/docs/fermentech_news_23_02_web. Acesso em: 06/04/2020.

NERO, L.A., MATTOS, M.R., BARROS, M.A.F., ORTOLANI, M.B.T., BELOTI, V., FRANCO, B.D.G.M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health** v. 55, p. 299-305, 2008.

NETO, J. P. de M. L. **Queijos – aspectos tecnológicos.** 1ª ed. Minas Gerais: Instituto Cândido Tostes de Laticínios, 2013.

PARENTE, E., T. Cogan, and I. Powell. 2017. Starter cultures: general aspects. Pages 201–226 in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. P. McSweeney, P. F. Fox, P. Cotter, and D. Everett, ed. **Academic Press**, London, UK.

PEREIRA M.E.S.P., **A realização de práticas na identificação de bactérias ácido-láticas.** In: II Congresso Internacional das Ciências Agrárias, COINTER, 2017.

PERIN, L.M. **Diversidade molecular da microbiota Láctica bacteriocinogênica de Leite de cabra e caracterização de seu potencial bioconservador para a produção de queijo minas.** Minas Gerais, 2016. Originalmente apresentado como Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2016.

PERIN, L.M., MORAES, P.M., VIÇOSA, G.N., SILVA JÚNIOR, A., & NERO, L.A. Identification of bacteriocinogenic *Lactococcus* isolates from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. **International Dairy Journal** v.25, p.46-51. 2012.

PICON A. Cheese Microbial Ecology and Safety, In: Papademas P, Bintsis T, Editors, *Global Cheesemaking Technology, Cheese Quality and Characteristics*, Chichester: **John Wiley & Sons Ltd.**, 71–99, 2018.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology**, v.37, n.5, p.664-698, 2013.

RATHER, I. A.; SEO, B. J.; KUMAR, V. J. R.; CHOI, U.; CHOI, K.; LIM, J.; PARK, Y. Biopreservative potential of *Lactobacillus plantarum* YML007 and efficacy as a replacement for chemical preservatives in animal feed. **Food Science and Technology**, v.23, n.1, p.195-200, 2014.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering Reviews**, v.4, n.2, p.124-140, 2012.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P. et al. **Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000600039. Acesso em 31/03/2020.

ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. Fabricación de queso: R. Scott. Tradução de Andrés Marcos Barrado. 2. ed. **Zaragoza**: Acribia, 2010.

ROSSETTI, L. et al. A Qualified Presumption of Safety approach for the safety assessment of Grana Padano whey starters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 1, p. 70–73, 2009.

SABO, S., VITOLO, M., GONZÁLEZ, J. M. D., OLIVEIRA, R. P. d. S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.

SACCO B. **Qualidade do leite para a produção de derivados: alguns pontos para reflexão**. Edição 40, Abril/Maio/Junho de 2013. Revista Via Láctea. Disponível em: http://saccobrasil.com.br/admin/PASTA/VIA_LACTEA_40.pdf. Acesso: 05/05/2020.

SANTIS, Valéria B. G. de. **Queijo Minas padrão com baixo teor de sódio e gordura: caracterização físico-química e sensorial**. 67f. Dissertação de Mestrado – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

SETTANNI, L.; Moschetti, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, 27, 691–697, 2010.

SETTANNI, L.; FRANCIOSI, E.; CAVAZZA, A.; COCCONCELLI, P. S.; POZNANSKI, E. Extension of Tosela cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.28, n.5, p.883-890, 2011.

SGARBI, E., Lazzi, C., Tabanelli, G., Gatti, M., Neviani, E., & Gardini, F. Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. **Journal of Dairy Science**, 96, 4223–4234, 2013.

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. 2016. 82f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal, Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 2016.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 5ªed., São Paulo: Varela; 560p., 2017.

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

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

TAMANINI, R., BELOTI, V., SILVA, L.C.C., ANGELA, H.L., YAMADA, A.K., BATTAGLINI, A.P.P., FAGNANI, R., MONTEIRO, A.A. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1877-1886. 2012.

TODESCATTO, C. **Obtenção de fermento láctico endógeno para produção de queijo típico da mesorregião sudoeste do Paraná**. 2014. 171f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2014.

WEDAJO B. Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. **J Prob Health** v.3, p. 129, 2015.

WOUTERS, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal** 12, 91-109, 2002.

YANG, E.; FAN, L.; JIANG, Y.; DOUCETTE, C.; FILLMORE, S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. **AMB Express**, v.2, n.48, p.1-12, 2012.

YVON, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D., & Gripon, J. C. (1997). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, 58(1), 414–419.

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