

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Lactococcus lactis*
lactis EM BEBIDA LÁCTEA**

MARIA HELENA FREITAS LOPES



MARIA HELENA FREITAS LOPES

**ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Lactococcus*
lactis lactis EM BEBIDA LÁCTEA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador (a): Prof. Gabriela da Rocha Lemos Mendes
Coorientador (a): Prof. Igor Viana Brandi

Montes Claros – MG

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Helena Freitas Lopes

ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Lactococcus lactis lactis* EM BEBIDA LÁCTEA

Aprovada pela banca examinadora constituída por:



Milton Cano Chauca
D.Sc. em Ciências dos Alimentos
Metrícula: 224583
ICA - UFMG

Prof. Milton Nobel Cano Chauca ICA/UFMG



Prof. Willian James Nogueira Lima ICA/ UFMG



Prof. Igor Viana Brandi - Coorientador ICA/UFMG



Prof. Gabriela da Rocha Lemos Mendes - Orientadora ICA/UFMG

Montes Claros, 27 de março de 2021.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por serem minha força e meu amparo durante toda a minha jornada na graduação.

Aos meus pais Renato (*in memoriam*) e Gislene que por todos esses anos me deram todo suporte necessário, abrindo mão de muitos dos seus sonhos para que os meus se realizassem. Sei que meu pai lá do céu vibra de orgulho por eu estar concluindo essa fase da minha vida.

Aos meus professores por toda entrega de conhecimento repassado durante todos esses anos.

A minha orientadora Prof. Gabriela da Rocha Lemos Mendes pela paciência, cuidado e ensinamentos a mim dedicados nesse estudo, ao meu coorientador Prof. Igor Viana Brandi por todos os ensinamentos, oportunidades e cuidados durante todos esses anos trabalhando juntos.

Aos técnicos Carla Durães e Sandro Braga, pela ajuda que me prestaram em todos esses anos de Universidade em vários estudos e pesquisas.

Aos colegas do grupo de estudos em biotecnologia GEBIO, em especial Maria Luiza e Lara que com toda dedicação me ajudaram neste trabalho.

A Fundação Universitária Mendes Pimentel (FUMP) por toda ajuda e auxílio financeiro e psicológico prestados durante o curso de graduação.

Aos meus colegas da turma 2014 que foram como irmãos durante todos esses anos, em especial a Larissa e Raquel. Eles que fizeram meus dias mais leves e a caminhada bem mais fácil de ser percorrida. Levarei vocês para a vida!

“Faça o seu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores para fazer melhor ainda.”

(Mário Sérgio Cortella)

RESUMO

O consumo de probióticos e alimentos que possuem propriedades funcionais são um importante aliado no combate a várias patologias, pois podem melhorar certas desordens do metabolismo humano. O *Lactococcus lactis* tem sido alvo de diversos estudos que elucidam a fisiologia e biologia molecular de traços relevantes para aplicação industrial, incluindo a produção de compostos aromatizantes e fatores que influenciam na estabilidade e no crescimento celular. Assim, esse estudo objetivou elucidar as potencialidades e características do microrganismo probiótico *Lactococcus lactis lactis* através de uma revisão bibliográfica, e avaliar a cinética de crescimento em meios de cultura elaborados, leite e bebida láctea com leite e soro de queijo. Para isso, inicialmente foi preparado pré-inóculo de *Lactococcus lactis lactis*. Logo após retirou-se uma alíquota de 1% e adicionou-se nos meios caldo MRS, leite, soro e leite (60%) + soro (40%). Após 24 horas foram realizadas análises de pH e microbiológica. Escolheu-se o meio leite (60%) + soro (40%) para a realização da cinética de crescimento frente ao menor custo desse meio. Conclui-se que a espécie de *L. lactis lactis* possui grandes vantagens tecnológicas além de conferir benefícios aos produtos na qual é agregado, e nos testes realizados no presente estudo ele se mostrou eficiente no crescimento e multiplicação em diferentes meios de cultura, se destacando no meio Leite + Soro. Neste meio obteve-se, com 10 horas de cultivo contagem de $2,8 \times 10^7$ UFC/mL, pH 4,82 e 0,65% de ácido lático. Pode-se concluir que bebidas lácteas com leite e soro de leite são promissores ao cultivo de *Lactococcus lactis lactis* e que podem se tornar fonte de bactérias probióticas nestes alimentos. Estudos posteriores são necessários para se avaliar a viabilidade dessas células na vida de prateleira dessas bebidas.

Palavras-chave: Probiótico. Alimento Funcional. Bebida Láctea. *Lactococcus lactis lactis*.

ABSTRACT

The consumption of probiotics and foods that have functional properties are an important ally in combating various pathologies, as they can improve certain disorders of human metabolism. *Lactococcus lactis* has been the target of several studies that elucidate the physiology and molecular biology of relevant traits for industrial application, including the production of flavoring compounds and factors that influence cell stability and growth. Thus, this study aimed to elucidate the potential and characteristics of the probiotic microorganism *Lactococcus lactis lactis* through a literature review, and to evaluate growth kinetics in prepared culture media, milk and milk beverage with milk and cheese whey. To this end, a preinoculum of *Lactococcus lactis lactis* was initially prepared. After that, a 1% aliquot was taken and added to MRS broth, milk, whey, and milk (60%) + whey (40%). After 24 hours pH and microbiological analyses were performed. The milk (60%) + whey (40%) medium was chosen to perform the growth kinetics due to the lower cost of this medium. It was concluded that the species *L. lactis lactis* has great technological advantages besides conferring benefits to the products in which it is aggregated, and in the tests performed in this study it proved efficient in the growth and multiplication in different culture media, standing out in the Milk + Whey medium. In this medium, after 10 hours of cultivation, a count of 2.8×10^7 CFU/mL was obtained, pH 4.82 and 0.65% of lactic acid. It can be concluded that milk and whey milk drinks are promising for the cultivation of *Lactococcus lactis lactis* and that they can become a source of probiotic bacteria in these foods. Further studies are needed to evaluate the viability of these cells in the shelf life of these beverages.

Keywords: Probiotic. Functional Food. Dairy beverage. *Lactococcus lactis lactis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fluxograma de decisão para determinar se um candidato a probiótico atende aos critérios de definição	19
Figura 2- Placas com colônias do <i>Lactococcus lactis lactis</i> em meio ágar MRS após 24 h de fermentação em caldo MRS, Leite, Soro e Leite e Soro	27
Figura 3- Colônias do <i>Lactococcus lactis lactis</i> em meio ágar MRS após 10 h de cinética de fermentação em Leite + Soro	30
Gráfico 1- Valores de pH nos meios caldo MRS, Leite, Soro e Leite e Soro após 24h de fermentação	26
Gráfico 2- Curva de crescimento do <i>L. lactis lactis</i> . e da acidez em meio Leite e Soro após 10 h de cinética	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores médios de pH, acidez (% ácido láctico) e contagem de células (UFC/mL) obtidos durante a cinética de fermentação no meio leite e soro	28
--	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REFERÊNCIAL TEORICO	18
	2.1 Probiótico	18
	2.2 <i>Lactococcus subsp. lactis lactis</i>	19
	2.3 Alimento funcional.....	20
	2.4 Produtos lácteos	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS	24
	3.1 Material	24
	3.2 Preparo do pré-inóculo e inóculo.....	24
	3.3 Avaliação do pH e acidez titulável	24
	3.4 Avaliação do crescimento microbiano em diferentes meios	25
	3.5 Cinética de fermentação	25
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
	4.1 Avaliação do desenvolvimento de <i>L. Lactis lactis</i> em diferentes meios	26
	4.2 Cinética de fermentação	28
5.	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos, desde os primórdios, desempenham um papel importante no meio ambiente, corpo humano e nas atividades relacionadas à alimentação, como em produtos fermentados. Em 1908, o cientista russo Elia Metchnikoff foi o primeiro a pontuar a importância do consumo de leites fermentados, na grande vida dos pastores balcânicos, eliminando bactérias deteriorativas da microbiota intestinal. (CHAMPAGNE *et al.*, 2011).

Segundo a FAO/WHO (2001), probiótico é definido como “*microrganismos vivos que conferem efeito benéfico para a saúde do hospedeiro, quando administrado em quantidade adequado*”. A concentração de microrganismos na cultura pode variar dependendo da legislação vigente, mas geralmente para um produto ser considerado probiótico deve conter $>10^6$ UFC/g ou mL.

O consumo de probióticos e alimentos que possuem propriedades funcionais se tornam um importante aliado no combate a várias patologias, pois melhoraram as desordens do metabolismo humano, permitindo ao paciente um prognóstico melhor, principalmente no perfil lipídico, reduzindo os níveis de colesterol. Esses resultados são resultantes de vários mecanismos de ação, como diminuição de absorção intestinal de colesterol, modulação de metabolismo lipídico por meio de citocinas e adipocinas, incorporação ou assimilação de colesterol na membrana intestinal e inibição de transportadores intestinais de colesterol (VILLENA e KITAZAWA, 2017). Além disso, Flesch *et al.* (2014) citam um controle glicêmico, redução da constipação ou diarreia e estimula o sistema imune aumentando a permeabilidade intestinal, fazendo com que os nutrientes sejam absorvidos de forma mais eficaz.

Quanto as espécies de bactérias utilizadas na fermentação de produtos lácteos, as espécies *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* são as mais frequentes. Em contrapartida, as espécies de *Lactococcus lactis* apresentam características vantajosas para a sua aplicação nestes produtos fermentados com respeito à vida útil, preservação e qualidade sensorial (GONZÁLEZ REVELLO *et al.*, 2016). De acordo com Schleifer *et al.* (1985) existem duas subespécies de *Lactococcus lactis* (primeiramente definidas como *Streptococcus lactis* e *Streptococcus cremoris*), logo após redefinidas como *Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*. A *subsp. Lactis* tem maior aplicação na fabricação de queijos macios e a *subsp. Cremoris* para queijos duros. Porém as duas tem sido alvos de muitos

estudos principalmente no ramo industrial e vem se tornando destaques em modelos de pesquisas genéticas, metabolismo e biologia molecular (BOLOTIN *et al.*, 2001).

O Grupo de Estudos em Biotecnologia (GEBIO) vem realizando pesquisas relacionadas com bebida láctea desde o ano de 2014, por ser um produto de fácil acesso na região de Montes Claros-MG, de baixo custo comparado com o Iogurte e que tem potencialidade de trazer benefícios a saúde quando consumido regularmente. Pesquisas já foram realizadas com a suplementação da bebida láctea com ferro, além de estudos que ainda estão em andamento com a adição de zinco encapsulado.

Tendo em vista a tendência mundial para o consumo de alimentos que sejam seguros, práticos e que ainda possam contribuir para a saudabilidade dos consumidores, como as bebidas lácteas fermentadas, e as potencialidades das espécies de *L. lactis lactis* em fornecer essas características ao produto fermentado, o objetivo deste estudo foi elucidar as potencialidades e características do microrganismo probiótico *L. lactis lactis* através de uma revisão bibliográfica e avaliar a cinética de crescimento para se conhecer a produção de células em bebida láctea.

2. REFERÊNCIAL TEORICO

2.1 Probiótico

Segundo Fuller (1989), probióticos são definidos como suplementos alimentares microbianos vivos que afetam vantajosamente o animal hospedeiro, melhorando o seu equilíbrio intestinal. O conceito de probióticos não é novo e realmente sempre foram consumidos por seres humanos, em sua grande maioria vindo de alimentos fermentados o que se deu durante muitos anos (CROSS *et al.*, 2001; KOPP-HOOLIHAN, 2001).

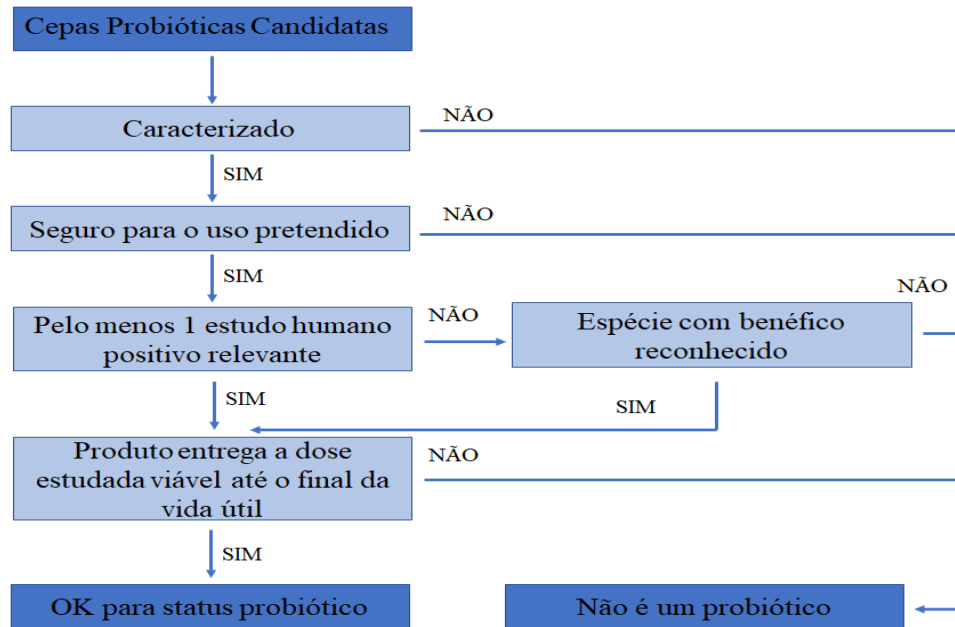
Sabe-se que esses microrganismos probióticos trazem diversos benefícios a saúde, como os citados por Hipócrates e outros cientistas que relataram que leite fermentado poderia tratar algumas agitações do sistema digestivo, além de serem relatados em escritos bíblicos o uso de probióticos no tratamento de doenças corporais (LOURENSHATTINGH e VILJOEN, 2001). O cientista russo Elie Metchnikoff sugeriu o conceito inicial para probióticos tal como é conhecido hoje. Alegou que o consumo de grandes quantidades de produtos lácteos fermentados contendo lactobacilos prolongava a vida e citou a primeira explicação científica para os benefícios das bactérias do ácido láctico presentes no leite fermentado (RASIC, 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) sugeriram uma definição para probióticos no ano de 2001, que posteriormente foi refeita em 2014 por questões gramaticais para "*microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício de saúde ao hospedeiro*" (FAO/OMS, 2002; HILL *et al.*, 2014). Hill *et al.* (2014), determinaram que os probióticos devem ter "*conteúdo definido, contagem viável apropriada no fim do prazo de validade e provas adequadas de benefícios para a saúde,*" e citaram ainda que todos os probióticos devem ser "*seguros para o seu uso pretendido*". Quesitos esses que em 2018 foram revisados pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP, 2018). Embora o termo "probiótico" seja vastamente utilizado uma grande variedade de alimentos ainda é frequentemente mal utilizado.

A definição de probióticos é de suma importância e cada parte dela pode ser "adaptada" para critérios de fácil utilização. A definição desses critérios tem sido um objetivo dos diferentes interventores no vasto campo dos probióticos. Estes critérios podem ser apresentados em um fluxograma de decisão (Figura 1), servindo como instrumento para determinar se uma estirpe candidata, ou combinação de estirpes, podem ser qualificadas para probiótico

independentemente do pedido final. Além disso, podem ser apresentadas de forma de lista de controle, ou como uma lista de "mandamentos", sugerido por Toscano *et al.*, (2017).

Figura 1- Fluxograma de decisão para determinar se um candidato a probiótico atende aos critérios de definição



Fonte: (BINDA *et al.*, 2020).

Certamente ainda existirão alguns candidatos a probióticos sendo isolados de fontes inovadoras, com funções atualmente imprevisas e com excelentes benefícios a saúde. Os probióticos da futura geração que podem ser conceitualizados em alguns casos como bioterapêuticos vivos, no entanto, dependendo da utilização prevista, segurança adequada, questões legais e éticas devem ser pontuadas no desenvolvimento de tais probióticos em conformidade com o protocolo de Nagóia (JOHANSEN, 2017).

2.2 *Lactococcus subsp. lactis lactis*

Sabendo da importância das bactérias lácticas no processo fermentativo e em diversas outras áreas de aplicação, dentre elas a de bioprocessamento, agricultura, alimentos e atualmente na medicina. Essas bactérias vêm sendo empregadas em várias pesquisas e utilizadas no comércio durante décadas, visando agregar conteúdo a estes estudos, grandes esforços foram e estão sendo feitos para determinar as sequências genômicas das espécies e linhagens representativas das bactérias lácticas (KLAENHAMMER *et al.*, 2002).

Grande parte dos probióticos estudados hoje em dia pertence ao grupo das bactérias lácticas que abrangem um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, não esporuladas e

anaeróbias facultativas que tem como característica em comum a produção de ácido láctico como principal produto do metabolismo de carboidratos. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Lactococcus* compreendem os principais gêneros das bactérias lácticas (LJUNGH e WADSTROM, 2006).

As espécies do gênero *Lactococcus* são considerados bactérias seguras ou "GRAS" (Generally Recognized As Safe) e seu uso se dá ao longo dos anos na manutenção e preservação de alimentos. No grupo das bactérias lácticas, a *Lactococcus lactis* é uma das espécies melhor caracterizada e que configura como um microrganismo modelo para estudos deste grupo (BOLOTIN *et al.*, 2001). *Lactococcus lactis* têm sido objeto de diversos estudos que elucidam a fisiologia e biologia molecular de traços relevantes para aplicação industrial, incluindo a produção de compostos aromatizantes e fatores que influenciam na estabilidade e no crescimento celular (LEROY e VUYST, 2004; CAVANAGH *et al.*, 2015).

Lactococcus lactis foi o primeiro organismo geneticamente modificado a ser utilizado vivo para o tratamento de uma ampla variedade de doenças. Por ser uma bactéria de fácil manuseio, não comensal, não patogênica e não invasiva, tem sido utilizada como vetor in vivo para antígenos e proteínas imunomoduladoras (AVERY *et al.*, 2015).

Haghshenas *et al.*, (2014) demonstraram in vitro que metabólitos secretados por *Lactococcus lactis subsp. lactis* tem altas atividades anti-carcinogênicas em diferentes linhagens celulares carcinogênicas de origem epitelial, porém, não há estudos que comprovem seus reais efeitos anti-carcinogênicos in vivo.

2.3 Alimento funcional

O alimento funcional, além de suas funções nutricionais como sendo fonte de energia e de substrato para a formação de células e tecidos, também possui em sua composição substâncias que atuam diretamente na ativação os processos metabólicos, dessa forma obtendo uma melhora das condições de saúde pela maior efetividade do sistema imune, levando então ao bem-estar das pessoas, além de prevenir doenças degenerativas que levam a uma redução da longevidade (PARK; KOO; CARVALHO, 1997; SGARBIERI e PACHECO, 1999).

Um exemplo das novas utilizações dos probióticos pode ser observado no tratamento de distúrbios funcionais do trato gastrointestinal. Para muitas destas, como a síndrome do intestino irritável, existem poucas opções de tratamentos farmacológicos, devido à baixa eficácia e aos graves efeitos colaterais (SHEN & NAHAS, 2009). Além disso, a síndrome do intestino

irritável é bastante comum e acredita-se ser causada por mudanças do microbiota gastrointestinal (PORTER *et al.*, 2011).

A busca da população brasileira pelo consumo de produtos mais saudáveis, inovadores, seguros e de fácil utilização, associada à consolidação dos produtos no mercado, contribuíram para o crescimento da indústria de bebidas lácteas, fazendo com que estas ganhassem popularidade (LIMA; MADUREIRA; PENNA, 2002).

Com o aumento dos consumidores e o interesse em manter uma alimentação saudável através da ingestão de alimentos e suplementos em suas dietas observou-se a expansão dos probióticos mesclando do mercado de alimentos funcionais para o mercado farmacêutico e terapêutico. Esta expansão cresce conforme os avanços dos aspectos científicos e regulatórios dos mecanismos probióticos e de entrega. Isto tem gerado um mercado cada vez mais variado de alimentos e suplementos, especialmente as que contêm probióticos (FOLIGNÉ *et al.*, 2013; HILL *et al.*, 2014).

Visto essa tendência de mercado, a indústria de laticínios reagiu ao aumento da competitividade nas linhas de produtos funcionais, para se adaptar as exigências do consumidor, visto que essas se modificam rapidamente, visando também preservar sua liderança tecnológica na indústria de alimentos (BRANDÃO, 2002; PUPIN, 2002).

A demanda dos consumidores por alimentos funcionais impulsionou a expansão de produtos como iogurtes líquidos e outras bebidas lácteas. Esse crescimento é influenciado pela conveniência e praticidade, saúde e segurança. Na categoria iogurtes líquidos, houve o lançamento de diversos novos produtos, sabores e embalagens inovadoras. Com mais alternativas de bebidas lácteas entrando no mercado, esta categoria combinada apresentou significativa atividade de novos produtos (NIELSEN, 2002).

A bebida láctea, como o leite fermentado, é considerada um alimento funcional e já faz parte da alimentação de muitas pessoas, devido à sua praticidade. Confere benefícios a seu hospedeiro, quando administrada em doses recomendadas. Nessas bebidas, são encontradas culturas probióticas que ao se fixarem no cólon humano promovem efeito terapêutico. Para tal feito, é necessário que as bactérias lácticas estejam viáveis durante toda a vida de prateleira do produto (FLESCHE; POZIOMYCK; DAMIN, 2014; HAENLEIN, 2007).

2.4 Produtos lácteos

Os nômades foram os primeiros produtores do leite fermentado. Eles armazenavam o leite vindo da ordenha em reservatórios feitos de estômago de bode. Essa estocagem era

benéfica em consequência do clima árido e seco da região da Eurásia, fato esse que proporcionava a proliferação de bactérias que modificam a estrutura do alimento, fazendo com que sensorialmente se tornasse mais atrativo para aqueles indivíduos, além de ser uma forma de conservação da substância láctea (HAENLEIN, 2007; YILDIZ, 2010). O iogurte e os leites fermentados são considerados como os principais veículos para o crescimento probiótico. Normalmente, o iogurte é preparado com culturas puras específicas de bactérias lácticas (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) (LOURENS-HATTINGH e VILJOEN, 2001).

Atualmente, os probióticos estão principalmente incorporadas em produtos lácteos sendo eles o queijo, iogurte, gelado comestível e diversas outras sobremesas lácteas. (LAVERMICOCCA, 2006). Kailasapathy *et al.* (2008), citou a adição de substâncias como a proteína de soro de leite no iogurte pode aumentar a viabilidade de alguns probióticos devido à manutenção da capacidade de amortecimento de iogurte. O teor de gordura, concentração e tipo de proteínas, açúcares e pH do produto são alguns fatores que podem afetar diretamente o crescimento dos probióticos e sua sobrevivência na alimentação. Dessa forma a formulação do produto pode ser feita para ajudar à sua eficácia. Os produtos lácteos dentre todos os alimentos são considerados como o veículo ideal para levar as bactérias probióticas ao trato gastrointestinal humano (ROSS *et al.*, 2002).

Dessa forma a viabilidade e propriedades funcionais das bactérias probióticas no iogurte são relacionadas com as características do produto alimentar, incluindo a sua composição química. Contudo a eficácia funcional destes probióticos não se dá apenas pela composição química do meio de transporte, mas também por outros fatores que devem ser investigados mais a fundo. A produção de bebida láctea adicionada de soro de queijo em sua formulação vem ganhando um mercado muito grande, principalmente com o maior nível de informação sobre a importância do cálcio, a qualidade das proteínas, o papel dos componentes bioativos e das bactérias probióticas para a saúde, do custo do produto para o fabricante e do preço final para o consumidor (FERREIRA, 1997,2002; NIELSEN, 1997; SANTOS e FERREIRA, 2001; USDEC, 2002).

O termo “bebidas lácteas” pode englobar uma série de produtos fabricados com leite e soro, sendo um produto lácteo resultante da mistura do leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado ou em pó) adicionado ou não de produto(s) alimentício(s) ou substância alimentícia, gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos

51% do total de ingredientes do produto, fermentado mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionado de leite(s) fermentado(s) e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g ou mL no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade. Podendo conter em sua formulação, além do soro, do leite e dos cultivos de bactérias lácticas já tradicionais, acidulantes, aromatizantes, reguladores de acidez, estabilizantes, espessantes, emulsificantes, corantes, conservantes, pedaços, polpa ou sucos de frutas e mel (BRASIL, 2004).

A bebida láctea é considerada um alimento funcional e já faz parte da alimentação de muitas pessoas, devido à sua praticidade, benefícios quando administrada em doses recomendadas e custo (OLIVEIRA, 2018).

SILVA *et al.* (2001), elaboraram uma bebida láctea fermentada com cultura probiótica, à base de soro de queijo, fortificada com ferro quelato, e avaliaram as características físico-químicas, microbiológicas, nutricionais e sensoriais. O produto foi considerado um adequado veículo alimentar para suplementação com ferro. As propriedades funcionais dos produtos de soro são de grande importância para os fabricantes de produtos lácteos fermentados com características probióticas ou nutracêuticas. Os produtos de soro não só permitem ao fabricante reduzir o custo total dos ingredientes como também apresentam a importante vantagem de possuírem propriedades funcionais excepcionais, além de serem uma fonte concentrada de nutrientes lácteos, sobretudo proteínas de elevado valor nutricional e cálcio (HUGUNIN, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

A bactéria *Lactococcus lactis lactis* foi adquirida na Fundação André Tosello e cedida para esse estudo pelo banco de linhagens do laboratório de Biotecnologia. O meio de manutenção da bactéria e os procedimentos para inoculação foram seguidos conforme instruções do fabricante. O soro de leite em pó foi cedido pela empresa Laticínios Porto Alegre (Ponte Nova, MG). O leite em pó desnatado foi adquirido em comércio local. Demais reagentes utilizados neste estudo, foram de grau analítico.

As análises de pH, acidez e microbiológicas foram realizadas em duplicata no Laboratório de Biotecnologia no bloco A do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, em Montes Claros – MG.

3.2 Preparo do pré-inóculo e inóculo

Inicialmente, fez-se o preparo do pré-inóculo dentro da capela de fluxo laminar. Para isso, utilizou-se um *ependorf* contendo o microrganismo que foi inoculado em 250 mL de meio de cultura caldo Tripton Soja (TSA), e incubado a 37°C por 48h.

Para a produção do inóculo, utilizou-se para a fermentação quartos meios diferentes, sendo eles: o caldo Man Rogosa & Sharpe (MRS), leite em pó, soro de leite em pó e a combinação de leite em pó desnatado (60%) e soro de leite em pó (40%), (Erlenmeyer de 250 mL) e então estes foram submetidos a autoclavagem (Temperatura 121°C Pressão 1 atm) por 15 min. Em seguida, o pré-inóculo foi adicionado aos meios na concentração de 1% e foram incubados a 37 °C por 24 horas. Posteriormente avaliou-se o melhor meio para realizar a cinética de fermentação.

3.3 Avaliação do pH e acidez titulável

O pH foi avaliado pelo instrumento pHmetro de (Strada, modelo PHS-3E-BI). Para avaliação da acidez, 10 mL das amostras foram tituladas com solução de hidróxido de sódio (0,1M), utilizando fenolftaleína 1% como indicador (Instituto Adolfo Lutz, 2008). A acidez foi expressa em % de ácido láctico, conforme equação 1.

$$\frac{V \times f \times 0,9}{A} = \% \text{ ácido láctico}$$

(Equação 1)

Sendo que:

V = n° de mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 M

A = n° de mL da amostra

0,9 = fator de conversão para ácido láctico

3.4 Avaliação do crescimento microbiano em diferentes meios

Para esta análise, todo o material foi previamente esterilizado a 121°C por 15 min e manipulado dentro da capela de fluxo laminar. A contagem das células de *L. lactis lactis* durante a fermentação foi realizada através de plaqueamento, para isso, alíquota de 1mL do meio foi coletada e adicionada a tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. As diluições foram realizadas de forma seriadas sucessivas de 10⁻¹ até 10⁻⁸, agitadas em vórtex para homogeneização. Foi inoculado 1 mL das diluições 10⁻⁴ até 10⁻⁸ em placas de petri estéreis e vazias, adicionando em seguida o meio de cultura ágar de Man Rogosa & Sharpe (MRS). As placas foram incubadas invertidas em estufa BOD a 37°C por 48h para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) no intervalo entre 25 e 250 colônias. (SILVA *et al.*, 2007).

3.5 Cinética de fermentação

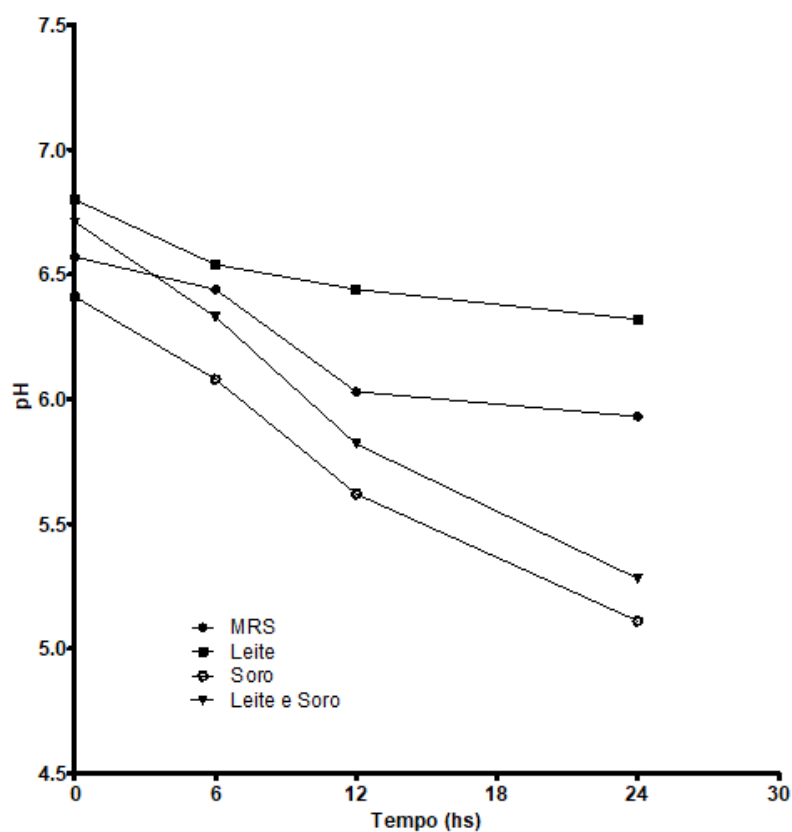
A cinética de fermentação foi realizada por um período de 10 h, sendo que a cada 2 h foram retiradas amostras e avaliadas quanto ao pH, acidez titulável e contagem de células, expressas em UFC/ mL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação do desenvolvimento de *L. Lactis lactis* em diferentes meios

Após a fermentação dos meios de crescimento durante 24 h, foi possível obter os valores de pH conforme mostra a Gráfico 1 e realizar o plaqueamento para avaliação de qual meio o *L. lactis lactis* se desenvolveria melhor.

Gráfico 1- Valores de pH nos meios caldo MRS, Leite, Soro e Leite e Soro após 24h de fermentação

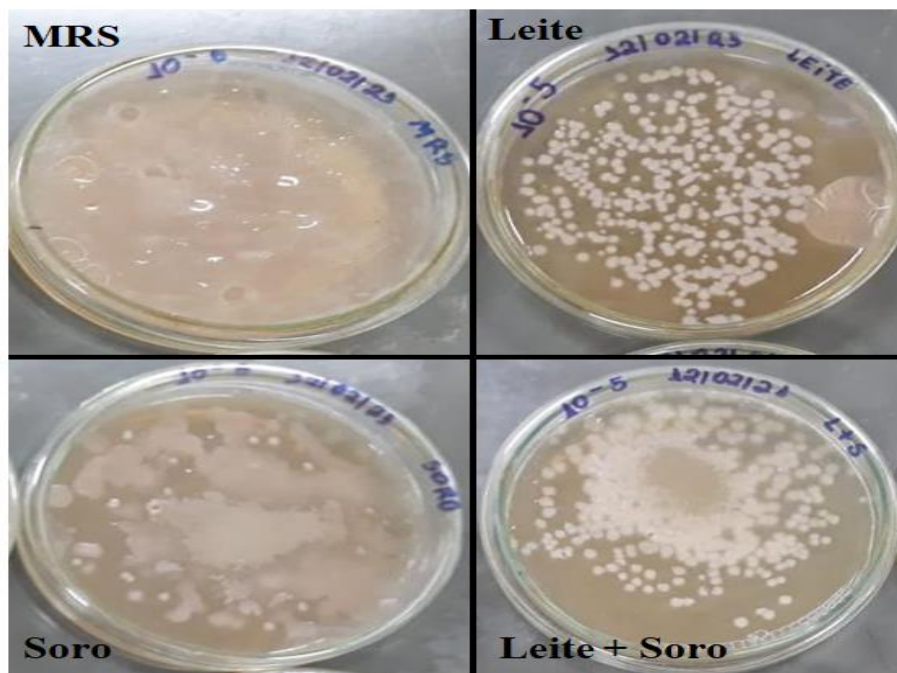


Fonte: Do autor (2021).

Houve uma diminuição do valor de pH em todos os meios utilizados no teste, pela ação de multiplicação do microrganismo durante a fermentação, consumindo substrato presente nos meios, produzindo ácidos e conseqüentemente diminuindo o pH. Posteriormente estudos podem ser realizados no meio MRS para que ele sirva de meio base para cultivo da bactéria

visto que ele teve um bom resultado. O crescimento nos outros meios era esperado pelo fato de serem meios lácteos o que favorece o crescimento da bactéria probiótica.

Figura 2- Placas com colônias do *Lactococcus lactis lactis* em meio ágar MRS após 24h de fermentação em caldo MRS, Leite, Soro e Leite e Soro.



Fonte: Do autor (2021).

Após o plaqueamento pode ser observado um crescimento de massa celular em todos os meios, possivelmente devido a sua grande concentração, não sendo possível realizar a contagem das colônias. Entretanto nos meios Leite e Leite e Soro foram onde as colônias melhor se formaram como mostra a Figura 2.

Com os resultados obtidos na análise de pH e crescimento das colônias no plaqueamento o meio escolhido para realização da cinética foi o Leite e Soro. Uma vez que pesquisas envolvendo a bebida láctea já são feitas pelo Grupo de Estudos em Biotecnologia (GEBIO) por ser popularizada devido ao seu baixo custo comparado com os outros meios, trazendo benefícios quando se adicionado microrganismos probióticos a fim de se obter um alimento funcional.

4.2 Cinética de fermentação

A Tabela 1 apresenta os valores médios referentes à pH, acidez e contagem de colônias da fermentação.

Tabela 1- Valores médios de pH, acidez (% ácido lático) e contagem de células (UFC/mL) obtidos durante a cinética de fermentação no meio leite e soro

Tempo (horas)	pH	Acidez (% ácido lático)	Contagem de células (UFC/mL)
0	6,72	0,30	$6,0 \times 10^7$
2	6,33	0,46	$2,2 \times 10^8$
4	5,87	0,52	$7,4 \times 10^8$
6	5,32	0,54	$1,8 \times 10^9$
8	4,91	0,61	$3,2 \times 10^8$
10	4,82	0,65	$2,8 \times 10^7$

Fonte: Do autor (2021).

É possível verificar que, conforme o aumento do período fermentativo, ocorreu o aumento da formação de ácidos, principalmente o ácido lático, diminuição do pH e aumento das células das bactérias. Estes resultados confirmam que o processo fermentativo ocorreu.

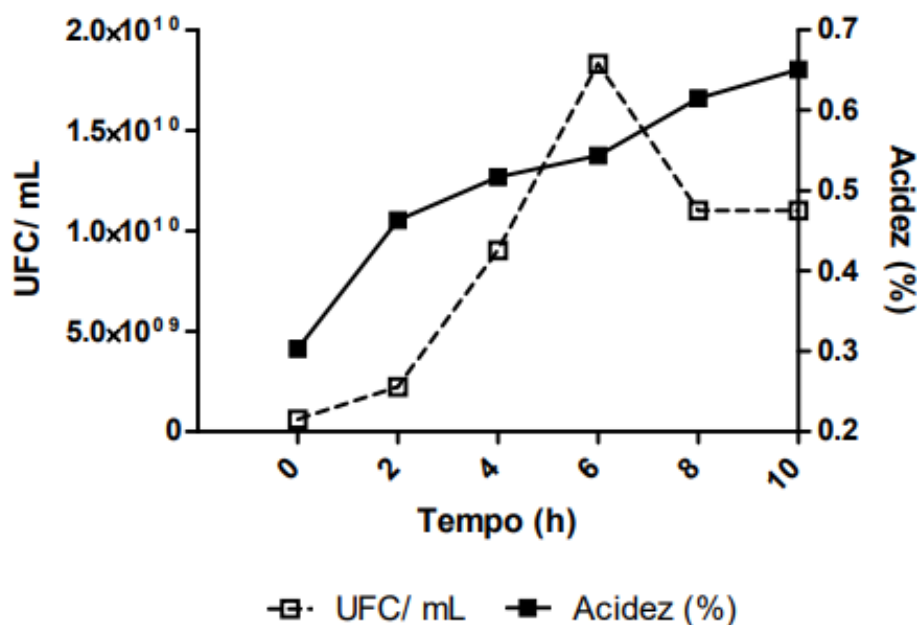
O acompanhamento do pH e da acidez é fundamental para a avaliação de um processo fermentativo utilizando bactérias lácticas, visto que essas bactérias produzem durante a fermentação, ácidos orgânicos. Esses ácidos orgânicos contribuem para o aumento da acidez do meio e conseqüente, diminuição do pH. A verificação deste comportamento revela se houve uma adaptação do microrganismo ao meio e conseqüentemente utilização dos substratos para a fermentação. Dessa forma foi possível verificar que em todos os meios houve uma diminuição do pH, conseqüentemente desenvolvimento do microrganismo.

De acordo com Thamer e Penna (2006), em seu estudo os valores de pH para bebidas lácteas fermentadas por probióticos de cultura padrão, em tempos de fermentação de 180 a 255 min (2,5 a 5h) variaram entre 4,83 e 4,72. Já Bergamim e Gomes (2017) estudaram a viabilidade de dois iogurtes elaborados com cultura de *Lactococcus lactis subsp. lactis* NCDO 2118 (3 e 7%) e obtiveram valores de pH de 4,38 e 4,46 respectivamente. No presente experimento o menor valor foi o de 4,82 que foi atingido após 10 horas de fermentação, dessa forma essas diferenças de valores podem ser explicadas pelo fato do tipo e porcentagem de cultura que foi

utilizada, quantidade de leite e soro utilizada na elaboração e adição de outros possíveis ingredientes.

No gráfico 2 pode-se observar a curva de crescimento do *L. lactis lactis*. e da acidez. A contagem das colônias (Figura 3) foi realizada fazendo o somatório e a média do valor das UFC presentes em cada diluição.

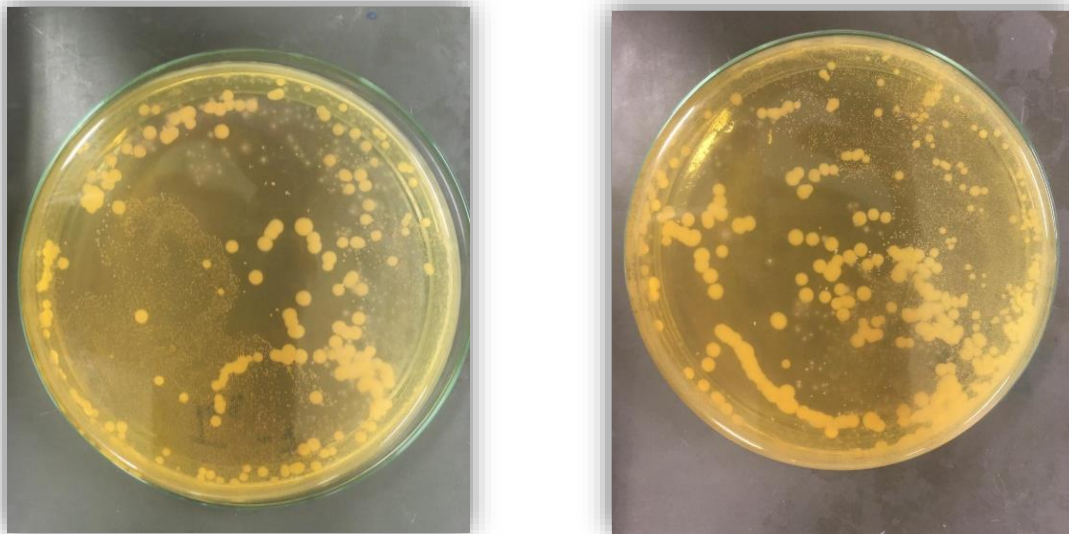
Gráfico 2- Curva de crescimento do *L. lactis lactis*. e da acidez em meio Leite e Soro após 10 h de cinética



Fonte: Do autor (2021).

Bergamim e Gomes (2017), estudaram a viabilidade de dois iogurtes elaborados com cultura de *Lactococcus lactis subsp. lactis* NCDO 2118 (3 e 7%) e obtiveram valores obtiveram acidez de 0,72 e 0,80 respectivamente, já a Instrução Normativa nº 46/2007 do MAPA determina que leites fermentados devem ter acidez (g de ácido láctico/100 g) de 0,6 a 2,0. No presente estudo como pode-se observar no gráfico 1, obtivemos valores inferiores aos encontrados por Bergamim e GomeS (2017), mas que após 8 horas de fermentação atingiu o valor determinado na legislação. Desse modo, levando em consideração que na formulação da bebida só utilizamos leite e soro e não foi adicionado nenhuma outra substância que fosse favorecer a acidificação pode-se considerar que o resultado está uma escala aceitável.

Figura 3- Colônias do *Lactococcus lactis lactis* em meio ágar MRS após 10 h de cinética de fermentação em Leite e Soro



Fonte: Do autor (2021).

Os valores encontrados para cada tempo (hora) de fermentação encontravam-se dentro do intervalo de no mínimo 10^6 UFC/g ou mL, atendendo a Instrução Normativa nº 46/2007 do MAPA. Bergamim e Gomes (2017), fizeram um controle do valor de UFC durante 5 semanas e obtiveram valor de $4,79 \times 10^{11}$ na primeira semana e $1,01 \times 10^6$ na quinta semana. Valor que também está conforme a legislação e se assemelha ao encontrado nesse experimento.

Observa-se que com o uso de leite fermentado com as mais diversas cepas pode-se obter resultados semelhantes na microbiota intestinal, desde que tenha as unidades formadoras de colônias em quantia satisfatória, tal como o resultado aqui encontrado (AYENI e RUPPITSCH, 2017).

De acordo com Calvette e Fiaux (2010), quando os microrganismos são inoculados em meio adequado e incubados sob condições apropriadas, ocorre um aumento do número de células, em um tempo relativamente curto de 4 a 6 horas. Com algumas espécies, a população máxima é atingida dentro de 24 horas. Houve uma diminuição de UFC a partir das 6 horas de cinética, fato que pode ser explicado pelo crescimento máximo logo após atingindo a fase estacionária. Em contrapartida mesmo depois que o crescimento máximo foi atingido e a fase estacionária foi iniciada a acidez ainda diminuía, isso pode ser explicado pelo fato de que ainda em concentrações menores os microrganismos lá existentes ainda produziam ácidos aumentando o valor da acidez.

5. CONCLUSÃO

Através do presente estudo foi possível observar que produtos funcionais vêm sendo amplamente consumidos e que os microrganismos probióticos trazem muitos benefícios a saúde dos consumidores. Visto isso, após o estudo, verificou-se que a espécie de *Lactococcus lactis lactis* possui grandes vantagens tecnológicas além de conferir benefícios aos produtos na qual é agregado.

Nos testes realizados no presente estudo pode-se concluir que o meio leite e soro é propício ao cultivo de *Lactococcus lactis lactis* atingindo-se contagens de $2,8 \times 10^7$ UFC/mL, atendendo às exigências legais. Devido ao cenário atual de pandemia surgiram dificuldades para frequentar o laboratório e realizar as análises programadas para este estudo. Foi possível fazer apenas os testes iniciais para conhecimento da bactéria *Lactococcus lactis lactis*, e verificar seu crescimento em bebida láctea.

Estes resultados são promissores frente ao baixo custo de bebidas lácteas em comparação ao leite, para se viabilizar a suplementação e consumos desses alimentos com bactérias probióticas. Dessa forma existe a proposta de continuidade, a fim de realizar análises complementares para agregar ainda mais resultados a este estudo.

REFERÊNCIAS

- AVERY, G. S.; VERNON, M. P.; CROCKETT, W. M.; MCLEAN, L. D. **Cleaning fluid comprising glycerin and a culture of microorganisms**. U.S. Patent n. 8,951,953, 10 fev. 2015.
- AYENI, F. A.; RUPPITSCH, W. Antagonistic and Quantitative Assessment of Indigenous Lactic acid Bacteria in Different Varieties of Ogi against Gastrointestinal Pathogens. **The Pan African medical jornal**, v. 27, p. 1-11, 2017.
- BERGAMIN, G. P.; GOMES, R. G. Estudo da viabilidade de *Lactococcus lactis subsp. lactis* NCDO 2118 na elaboração do iogurte potencialmente probiótico. **26º Encontro anual de Iniciação Científica**. Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Tecnológicas/ Maringá, PR, 2017. Disponível em: <<http://www.eaic.uem.br/eaic2017/anais/artigos/2099.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2021.
- BINDA, S.; HILL, C.; JOHANSEN, E.; OBIS, D.; POT, B.; SANDERS, M.E.; TREMBLAY, A.; OUWEHAND, A.C. (2020) Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. **Front. Microbiol.** 11:1662. doi: 10.3389/fmicb.2020.01662. 2020. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01662/full>>. Acesso em: 23 mar. 2021.
- BOLOTIN A.; WINCKER P.; MAUGER S.; JAILLON O.; MALARME K. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome Res** 11: 731-753, 2001.
- BRANDÃO, S. C. C. Novas gerações de produtos lácteos funcionais. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 6, n. 37, p. 64-66, 2002.
- BRASIL, Portaria 71. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. **Diário Oficial da União**, 21 set. 2004. Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/diarios/795158/pg-18-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-23-09-2004>>. Acesso em: 22 mar. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução Normativa nº. 46, de 23 de outubro de 2007. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.lex.com.br/doc_1206402_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_46_DE_23_DE_O

UTUBRO_DE_2007.aspx#:~:text=INSTRU%C3%87%C3%83O%20NORMATIVA%20N%C2%BA%2046%2C%20DE%2023%20DE%20OUTUBRO%20DE%202007,MINIST%C3%89RIO%20DA%20AGRICULTURA&text=O%20MINISTRO%20DE%20ESTADO%20DA,que%20lhe%20confere%20o%20art.&text=n%C2%BA%2047%2F97%2C%20que%20aprovou,Art.>. Acesso em: 23 mar. 2021.

CALVETTE, Y. M. A.; FIAUX, S. B. Roteiro de aulas práticas: Enzimologia e Tecnologia das Fermentações Tecnologia Enzimática e das Fermentações. **UFF**, Niterói, 2010.

CAVANAGH, D.; FITZGERALD, G. F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food microbiology**, v. 47, p. 45-61, 2015.

CHAMPAGNE, C. P.; ROSS, R. P. SAARELA; M., HANSEN, K. F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **Int Food Microbiol.** 149: 185-193, 2011.

CROSS, M. L.; STEVERSON, L. M.; GILL, H. S. Anti-allergy properties of fermented foods: An important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? **International Immunopharmacology**, 1(5), 891–901, 2001.

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation Of Probiotics in Food. Paris: **FAO**, 1–11, 2002.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert **Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Cordoba, Argentina, October, 2001.

FERREIRA, A. C. Breve história e perspectivas para a indústria de laticínios no Brasil. **2º Simpósio de Tecnologia de Produtos Lácteos** – Germinal, 2002.

FERREIRA, A. C. Tendências mercadológicas de produtos lácteos fermentados e bebidas lácteas. In: LERAYER, A. L. S., SALVA, T. J. G., coords. **Leites fermentados e bebidas lácticas**. Campinas: ITAL, p. 7.21-7.40, 1997.

FLESCH, A. G. T.; POZIOMYCK, A. K.; DAMIN, D. D. C. The therapeutic use of symbiotics. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**. v. 27, n. 3, p. 206-209, 2014.

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. (2013) Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. **Curr Opin Microbiol** 16: 284-292.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, 66(5), 365–378, 1989.

GONZÁLEZ REVELLO, Á.; CARRO, S.; CAL, K.; GIACAMAN, S.; ALDROVANDI, A. Lactococcus lactis autóctono: evaluación del efecto antilisterial y de propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo. **Innotec**, n. 12, 2016.

HAENLEIN, G. About the evolution of goat and sheep milk production. **Small Ruminant Research**. v. 68, n. 1-2, p. 3-6, 2007.

HAGHSHENAS, B.; ABDULLAH, N.; NAMI, Y.; RADIAH, D.; ROSLI, R.; KHOSROUSHAHI, A.Y. Different effects of two newly-isolated probiotic Lactobacillus plantarum 15HN and Lactococcus lactis subsp. Lactis 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. **Anaerobe**, v. 30, p. 51-59, 2014.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B., et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** 11, 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66, 2014.

HUGUNIN, A. O uso de produtos de soro em iogurte e produtos lácteos fermentados. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 5, n. 49, p. 22-33, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: IMESP 2008. p. 815. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>> . Acesso em: 24 fev. 2021.

ISAPP. Minimum Criteria for Probiotics [Online]. Sacramento, CA: **International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics**, 2018.

JOHANSEN, E. (2017). Future access and improvement of industrial lactic acid bacteria cultures. **Microb. Cell Fact.** 16:230. doi: 10.1186/s12934-017-0851-851.

KAILASAPATHY, K.; HARMSTORF, I.; PHILLIPS, M. Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis ssp. Lactis in stirred fruit yogurts. **LWT Food Science and Technology**, 41(7), 1317–1322, 2008.

KLAENHAMMER, T.; ALTERMANN, E., ARIGONI, F., BOLOTIN, A., BREIDT, F. et al. (2002) Discovering lactic acid bacteria by genomics. **Antonie Van Leeuwenhoek** 82: 29-58.

- KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. **Journal of the American Dietetic Association**, 101(2), 229–241, 2001.
- LAVERMICOCCA, P. Highlights on new food research. **Digestive and Liver Disease**, 38(Suppl. 2), S295–S299, 2006.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.
- LIMA, S. M. C. G.; MADUREIRA, F. C. P.; PENNA, A. L. B. Bebidas lácteas: nutritivas e refrescantes. **Milkbizz Tecnologia**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 4-11, 2002.
- LJUNGH, A.; WADSTROM, T. Lactic acid bacteria as probiotics. **Curr Issues Intest Microbiol.** 7(2):73-89, 2006.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, 11(1–2), 1–17, 2001.
- NIELSEN, A. C. Os produtos mais quentes do mundo. Informações sobre o crescimento de alimentos e bebidas. **Relatório Executivo de Notícias**, 2002.
- NIELSEN, A. C. Tendência do mercado de iogurtes e bebidas lácteas: evolução dos segmentos. In: LERAYER, A. L. S., SALVA, T. J. G., coords. **Leites fermentados e bebidas lácteas**. Campinas: ITAL, p. 2.11-2.25, 1997.
- OLIVEIRA, E. A. M.; SOLDI, C. L.; CAVEIÃO, C.; SALES, W. B. Contagem de bactérias lácticas viáveis em leites fermentados. **Revista Univap**, São José dos Campos, v. 24, n. 46, 2018. Disponível em: < <https://revista.univap.br/index.php/revistaunivap/article/view/1943>>. Acesso em: 21 mar. 2021.
- PARK, Y. K.; KOO, M. H.; CARVALHO, P. O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 5, n. 31, p. 200-206, 1997.
- PORTER, C. K.; GORMLEY, R.; TRIBBLE, D.R.; CASH, B.D.; RIDDLE, M.S. (2011) The Incidence and gastrointestinal infectious risk of functional gastrointestinal disorders in a healthy US adult population. **Am J Gastroenterol** 106: 130-138.
- PUPIN, A. M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. **Seminário Novas Alternativas de Mercado – ITAL**, Campinas, p. 133-145, 2002.

RASIC, J. L. Microflora of the intestine probiotics. In B. Caballero, L. Trugo, & P. Finglas (Eds.), **Encyclopedia of food sciences and nutrition** (pp. 3911–3916). Oxford: Academic Press, 2003.

ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; STANTON, C. Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, 57(2), 71–78, 2002.

SANTOS, J. P. V.; FERREIRA, C. L. L. F. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 3, p. 44-50, 2001.

SCHLEIFER K.; KRAUS J.; DVORAK C.; KILPPER-BÄLZ R.; COLLINS M. et al. Transfer of *Streptococcus lactis* and Related *Streptococci* to the Genus *Lactococcus* gen. nov.. **Systematic and Applied Microbiology** 6: 183-195, 1985.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. 2, p. 7-19, 1999.

SHEN, Y. A.; NAHAS, R. (2009) Complementary and alternative medicine for treatment of irritable bowel syndrome. **Can Fam Physician** 55: 143-148.

SILVA, M. R.; FERREIRA, C. L. L. F.; COSTA, N. M. B.; MAGALHÃES, J. Elaboração e avaliação de uma bebida láctea fermentada à base de soro de leite fortificada com ferro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 3, p. 7-14, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológicas de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552 p.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de probiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 589-595, jul.-set. 2006. Disponível em:<https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000300017>. Acesso em: 22 mar. 2021.

TOSCANO, M.; DE GRANDI, R.; PASTORELLI, L.; VECCHI, M.; DRAGO, L. A consumer's guide for probiotics: 10 golden rules for a correct use. **Dig. Liver Dis.** 49, 1177–1184. doi: 10.1016/j.dld.2017.07.011, 2017.

USDEC – UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. Características, funções e novas aplicações das proteínas de soro e suas novas frações. **Food Ingredients**, São Paulo, n. 17, p. 50-56, 2002.

VILLENA, J.; KITAZAWA, H. Probiotic Microorganisms: A Closer Look. **Microorganisms**. v. 5, n. 17, p. 1-3, 2017.

YILDIZ, F. Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products. New York: CRC Press; 2010.