

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

FABIANA FRANÇA

**USO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO ISOLADAS DE SORO-FERMENTO DE
QUEIJO PORUNGO NA FABRICAÇÃO E NO CONTROLE DE *Staphylococcus*
aureus EM QUEIJO MINAS PADRÃO**

SOROCABA
AGOSTO/2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

FABIANA FRANÇA

**USO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO ISOLADAS DE SORO-FERMENTO DE
QUEIJO PORUNGO NA FABRICAÇÃO E NO CONTROLE DE *Staphylococcus*
aureus EM QUEIJO MINAS PADRÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e Monitoramento
Ambiental para obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Orientação: Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel
Filho

SOROCABA

AGOSTO/2024

França, Fabiana

Uso de bactérias do ácido láctico isoladas de soro-fermento de queijo Porungo na fabricação e no controle de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Padrão / Fabiana França -- 2024.
118f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Natan de Jesus Pimentel Filho
Banca Examinadora: Felipe Alves de Almeida, Juliano De Dea Lindner
Bibliografia

1. Bactérias do ácido láctico. 2. Queijo artesanal de leite cru. 3. Bioconservação. I. França, Fabiana. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Fabiana França, realizada em 23/08/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Felipe Alves de Almeida (UFV)

Prof. Dr. Juliano de Dea Lindner (UFSC)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve comigo em todos os momentos, guiando-me a cada passo com sua infinita sabedoria e proteção.

Aos meus pais e ao meu noivo, Vinicius, cuja dedicação incondicional e generosidade foram fundamentais para que eu pudesse me dedicar plenamente aos meus estudos.

À minha irmã Fernanda, pelo apoio constante e incentivo durante todos esses anos de pesquisa.

À minha família e amigos, cuja presença constante e encorajamento foram essenciais ao longo deste percurso.

Ao Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho, minha sincera gratidão pela orientação e pelo conhecimento compartilhado, que foram fundamentais para a realização deste estudo e para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos professores Felipe Alves de Almeida e Juliano De Dea Lindner, agradeço pelas valiosas contribuições durante as bancas de qualificação e defesa, que enriqueceram significativamente este trabalho.

À professora Miriam Selani, expresse minha profunda gratidão pela ajuda contínua e pela colaboração significativa ao longo da realização deste estudo.

Às minhas amigas de laboratório, Mayara e Larissa, agradeço pelo convívio maravilhoso, que tornaram este período mais leve e agradável, e pela ajuda dedicada durante a execução dos experimentos.

Ao Gustavo, por todo o auxílio prestado na elaboração do queijo e na realização das análises, que foi de grande importância para o desenvolvimento deste estudo.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Estudos Avançados em Microbiologia de Alimentos, Miriam, Julia e Sofia, pelo convívio e pelas boas risadas compartilhadas.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental e à Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, pela oportunidade de realizar este curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pela concessão da bolsa de estudo

À Universidade Federal de São Carlos, *campus* Lagoa do Sino, por toda a estrutura fornecida. Um agradecimento especial aos funcionários Thales, Ueslei, Caetano e Jéssica, pelo suporte essencial.

RESUMO

FRANÇA, F. **Uso de bactérias do ácido lático isoladas de soro-fermento de queijo Porungo na fabricação e no controle de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Padrão.** 2024. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2024.

A demanda crescente por alimentos saudáveis e com menos ingredientes sintéticos tem impulsionado a formulação de produtos contendo bactérias do ácido lático (BAL), que oferecem benefícios significativos à saúde e características únicas aos alimentos. As BAL ganham destaque por suas inúmeras propriedades, como seu potencial antimicrobiano. Essas bactérias desempenham papel crucial na fermentação, prolongando a vida útil dos produtos e produzindo metabólitos importantes. Os queijos, especialmente os artesanais, como o queijo Porungo, são ricos em BAL. Este estudo teve como objetivo reportar as diversas fontes de isolamento de BAL, bem como revisar os principais métodos de identificação, caracterização e aplicação dessas bactérias na produção de alimentos fermentados. Além disso, buscou-se avaliar o potencial biotecnológico de oito cepas de BAL isoladas de soro-fermento do queijo Porungo, visando otimizar e aprimorar a qualidade na produção de queijos. Os isolados foram identificados por meio da análise MALDI-TOF MS e testados quanto à suscetibilidade a 12 antibióticos e à produção de diacetil. O potencial antibacteriano dos isolados foi analisado frente a *Lactococcus lactis* ATCC 19435 e *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 utilizando sobrenadantes livres de células neutralizados (SLC). O efeito da temperatura na cinética de crescimento dos isolados e a alteração do pH do leite integral foram avaliados ao longo de 48 h. Os isolados *Enterococcus faecium* QP60 e *Streptococcus infantarius* QP6 foram avaliados como culturas coadjuvante e iniciadoras na elaboração de queijo Minas Padrão bem como no controle do crescimento de *S. aureus* na matriz alimentar. Foram identificados dois isolados da espécie *S. infantarius*, dois como *Streptococcus lutetiensis*, três da espécie *L. lactis* e um isolado como *E. faecium*. A maioria das BAL demonstrou sensibilidade a múltiplos antibióticos, com seis delas produtoras de diacetil. Apenas o SLC obtido a partir do cultivo de *E. faecium* QP60 apresentou atividade antibacteriana contra *L. lactis*, mas não contra *S. aureus*. O potencial biotecnológico dos isolados revelou que as espécies do gênero *Streptococcus* têm rápida adaptação e alta taxa de crescimento em leite integral incubado entre 30 e 40 °C, com destaque para o isolado QP6. Os tratamentos utilizando as diferentes combinações de BAL não mostraram eficácia significativa sobre o crescimento *S. aureus* ao longo de 60 dias. Além disso, o processo de maturação do queijo Minas Padrão e os diferentes tratamentos aplicados

causaram mudanças significativas nas características físico-químicas do produto. Os resultados sugerem que *E. faecium* QP60 e *S. infantarius* QP6 precisam de estudos mais aprofundados e podem ser considerados potenciais culturas coadjuvantes e bioprotetoras.

ABSTRACT

FRANÇA, F. **Use of lactic acid bacteria isolated from Porungo cheese whey-ferment in the production and control of *Staphylococcus aureus* in Minas Padrão cheese.** 2024. Master's thesis (Masters in Biotechnology and Environmental Monitoring) – Federal University of São Carlos *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2024.

The increasing demand for healthier foods with fewer synthetic ingredients has driven the development of products containing lactic acid bacteria (LAB), which offer significant health benefits and impart unique characteristics to foods. LAB have gained prominence due to their numerous properties, particularly their antimicrobial potential. These bacteria play a crucial role in fermentation, extending product shelf life and producing important metabolites. Cheeses, especially artisanal varieties such as Porungo cheese, are rich in LAB. This study aimed to document various sources of LAB isolation and review the main methods for their identification, characterization, and application in the production of fermented foods. Additionally, it sought to evaluate the biotechnological potential of eight LAB strains isolated from Porungo cheese whey ferment, with the goal of optimizing and enhancing cheese production quality. The isolates were identified using MALDI-TOF MS analysis and tested for susceptibility to 12 antibiotics, as well as for diacetyl production. The antibacterial potential of the isolates was assessed against *Lactococcus lactis* ATCC 19435 and *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 using neutralized cell-free supernatants (CFS). The effect of temperature on the growth kinetics of the isolates and the pH change in whole milk was evaluated over 48 hours. The isolates *Enterococcus faecium* QP60 and *Streptococcus infantarius* QP6 were evaluated as adjunct and starter cultures in the production of Minas Padrão cheese, as well as for their ability to control *S. aureus* growth in the food matrix. Two isolates were identified as *S. infantarius*, two as *Streptococcus lutetiensis*, three as *L. lactis*, and one as *E. faecium*. Most LAB strains demonstrated sensitivity to multiple antibiotics, with six producing diacetyl. Only the CFS obtained from *E. faecium* QP60 showed antibacterial activity against *L. lactis*, but not against *S. aureus*. The biotechnological potential of the isolates revealed that *Streptococcus* species rapidly adapted and exhibited high growth rates in whole milk incubated between 30 and 40°C, with *S. infantarius* QP6 standing out. However, treatments using various LAB combinations did not show significant effectiveness in controlling *S. aureus* growth over 60 days. Furthermore, the maturation process of Minas Padrão cheese and the different treatments applied resulted in significant changes in the product's physicochemical characteristics. The

results suggest that *E. faecium* QP60 and *S. infantarius* QP6 warrant further investigation and may be considered potential adjunct and bioprotective cultures.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
Isolamento, identificação, caracterização, regularização e aplicação de bactérias do ácido láctico	12
RESUMO	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. FONTES DE ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICO (BAL)	15
3. MÉTODOS CLÁSSICOS E MOLECULARES DE IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	29
3.1. MÉTODOS DEPENDENTES DE CULTIVO.....	30
3.2. MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO.....	31
4. REGULARIZAÇÃO	33
5. APLICAÇÕES	35
5.1. FERMENTAÇÃO POR BAL E SEUS METABÓLITOS	36
5.2. PROBIÓTICOS E SAÚDE INTESTINAL	40
5.3. POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIFÚNGICO	41
6. PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO 2	68
Uso de bactérias do ácido láctico isoladas de soro-fermento de queijo Porungo na fabricação e no controle de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijo Minas Padrão.....	68
RESUMO	68
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAIS E MÉTODOS	72
2.1. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	72
2.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA POR IONIZAÇÃO COM DESSORÇÃO À LASER ASSISTIDO POR MATRIZ E ANALISADOR DE TEMPO DE VOO (MALDI-TOF MS).....	73
2.2.1. Protocolos de extração padrão e em placa	73
2.2.2. Etapa final da preparação da placa	73
2.3. ANTIBIOGRAMA	73
2.4. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	74
2.5. PRODUÇÃO DE DIACETIL	75

2.6. EFEITO DA TEMPERATURA NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E ACIDIFICAÇÃO DO LEITE INTEGRAL POR BAL.....	75
2.7. APLICAÇÃO DE BAL ISOLADAS DO SORO-FERMENTO DE QUEIJO PORUNGO COMO CULTURAS COADJUVANTE E INICIADORAS EM QUEIJO MINAS PADRÃO.....	75
2.7.1. Preparo do inóculo.....	76
2.7.2. Fabricação de queijo Minas Padrão.....	76
2.7.2.1. Análises físico-químicas	77
2.7.2.2. Análise reológica.....	77
2.7.2.3. Cor instrumental.....	77
2.7.2.4. Análises Microbiológicas.....	78
2.7.2.5. Análise de dados.....	78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BAL POR MALDI-TOF MS.....	78
3.2. SUSCEPTIBILIDADE DAS BAL A ANTIBIÓTICOS	80
3.3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	83
3.4. PRODUÇÃO DE DIACETIL	86
3.5. EFEITO DA TEMPERATURA NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E ACIDIFICAÇÃO DO LEITE INTEGRAL PELAS BAL	88
3.6. APLICAÇÃO DE BAL ISOLADAS DO SORO-FERMENTO DE QUEIJO PORUNGO NA ELABORAÇÃO DE QUEIJO MINAS PADRÃO E CONTROLE DE <i>S. aureus</i>	94
3.6.1. Características físico-químicas	94
3.6.2. Análise reológica	97
3.6.3. Cor instrumental.....	99
3.6.4. Análise microbiológica	100
4. CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS	105

CAPÍTULO 1

ARTIGO

Isolamento, identificação, caracterização, regularização e aplicação de bactérias do ácido láctico

Formatado de acordo com as normas da revista *Food Research International*

Fabiana França¹ & Natan de Jesus Pimentel-Filho²

¹Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba. Rod. João Leme dos Santos, km 110 - SP-264, Bairro Itinga, 18052-780, Sorocaba/SP, Brasil

²Universidade Federal de São Carlos *campus* Lagoa do Sino. Rod. Lauri Simões de Barros SP-189, Km 12, Bairro Aracaçú, 18290-000, Buri/SP, Brasil

RESUMO

Bactérias do ácido láctico (BAL) são onipresentes em diversos ecossistemas. Embora sejam tradicionalmente isoladas de produtos lácteos, sua presença se estende a uma ampla gama de outros ambientes, incluindo superfícies de plantas, alimentos fermentados (como carnes, peixes, vegetais, leguminosas, cereais e bebidas) e o corpo humano. Devido às suas exigências nutricionais específicas e condições de crescimento, o desenvolvimento de um meio de cultura universal para BAL continua sendo um desafio. Os esforços atuais de pesquisa estão direcionados para melhorar a seletividade dos meios de cultura tradicionais e explorar alternativas sustentáveis, como a utilização de resíduos agroindustriais. A identificação e caracterização de BAL são realizadas por meio de métodos clássicos e moleculares para garantir precisão. Esses métodos variam desde testes fenotípicos, bioquímicos e fisiológicos tradicionais até técnicas genotípicas avançadas, incluindo sequenciamento do gene 16S rRNA, DGGE e sequenciamento de nova geração (NGS). O aumento do uso industrial de BAL requereu a criação de sistemas de regulamentação como o GRAS nos EUA, o QPS na Europa e as normativas da Anvisa no Brasil, como forma de garantir a segurança para consumo humano. As BAL são conhecidas por produzir metabólitos valiosos, como ácidos orgânicos, bacteriocinas, peptídeos bioativos e antioxidantes, que encontram amplas aplicações na indústria de alimentos. Além disso, as BAL funcionam como probióticos, beneficiando a

microbiota intestinal e promovendo a saúde humana, além de atuarem como bioconservantes naturais que melhoram a segurança alimentar e prolongam a vida útil dos alimentos. Esta revisão tem como objetivo investigar as diversas fontes de isolamento de BAL, discutindo tanto métodos tradicionais quanto moleculares para sua identificação e caracterização, além de explorar seus mecanismos regulatórios, diversas aplicações e perspectivas futuras.

Palavras-chave: Microbiota fermentativa; Bioconservação; Probióticos; Caracterização microbiana; Regulamentação.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do ácido láctico (BAL) são microrganismos que predominam em diferentes ecossistemas, que vão desde a superfície de vegetais, alimentos fermentados até o corpo humano (Fidan et al., 2022; Gopal, 2022; Liu et al., 2014). Embora as fontes mais tradicionais de isolamento de BAL sejam produtos lácteos, é cada vez mais comum que esse processo seja feito em carne, peixe, vegetais, legumes, cereais e até mesmo em bebidas (Fossi et al., 2022; Gupta et al., 2021; Huang et al., 2023; Łepecka et al., 2023).

O grupo de BAL é diverso, composto por mais de 60 gêneros, como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Daba & Elkhateeb, 2020; Plavec & Berlec, 2020; Wang et al., 2021). No entanto, recentemente foi proposta a fusão de *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae* em uma única família, *Lactobacillaceae*, e a reclassificação do gênero *Lactobacillus* em outros 25 gêneros, sendo que a reorganização foi conduzida considerando vários marcadores genéticos, tais como a filogenia do genoma central, a identidade de aminoácidos, a identidade de nucleotídeos, critérios metabólicos e os genes de assinatura (Zheng et al., 2020).

As BAL são conhecidas por apresentarem morfologia em cocos ou bastonetes, Gram-positivas, catalase-negativas, não esporulantes, anaeróbicas facultativas e tolerantes a ácidos (Hosken et al., 2023; Murindangabo et al., 2023; Raj et al., 2022). Nos dias atuais, a fermentação por BAL é vista como um processo biotecnológico que ajuda a melhorar a qualidade dos alimentos fermentados em diferentes aspectos, abrangendo características técnicas, nutricionais, sensoriais e funcionais (Ağagündüz et al., 2022). Especificamente, as cepas de BAL desejáveis possuem propriedades tecnológicas especiais, como a rápida acidificação da matriz, a capacidade de tolerar as condições de processamento de alimentos, atividades proteolíticas e lipolíticas robustas, além da capacidade de biossintetizar metabólitos funcionais (Fiocco et al., 2020).

O metabolismo apresentado pelas BAL é único, pois permite a conversão de polissacarídeos complexos em uma variedade de produtos com alto valor agregado (Meruvu & Harsa, 2022; Wang et al., 2021). As duas vias metabólicas utilizadas pelas BAL têm o poder de determinar o produto final gerado, já que na via homolática, a produção se concentra exclusivamente em ácido láctico, enquanto na via heterolática, outros metabólitos podem ser produzidos (Hosken et al., 2023; Meruvu & Harsa, 2022; Raj et al., 2022; Rathod et al., 2021). Os diversos metabólitos resultantes da fermentação por essas bactérias, como os ácidos

orgânicos, bacteriocinas, peptídeos bioativos, vitaminas, polissacarídeos extracelulares, ácidos γ -aminobutíricos, precursores de sabor e substâncias antioxidantes são, atualmente, empregados em indústrias de processamento de alimentos (Meruvu & Harsa, 2022; Raj et al., 2022).

Em virtude dos diversos metabólitos que produzem, as BAL oferecem potenciais benefícios à saúde, com destaque para sua capacidade de atuar como probióticos. BAL são capazes de restaurar o equilíbrio da microbiota intestinal, alterando a sua composição e promovendo a sua estabilidade, quando seu consumo é feito adequadamente (Hosken et al., 2023; Raj et al., 2022; Tang et al., 2023). Ainda, estudos relacionados à prevenção e ao tratamento de diversas doenças têm chamado a atenção para as BAL (Aburjaile et al., 2022; Guo et al., 2023; Olaimat et al., 2020; Rathod et al., 2021).

O papel dessas bactérias na fermentação é reconhecido há muito tempo e tem sido tradicionalmente empregado para estender a vida útil e a segurança dos alimentos, principalmente pela redução do pH resultante da conversão de carboidratos e substratos alimentares em ácido lático (Ağagündüz et al., 2022; Mala et al., 2023). As BAL também são reconhecidas como bioconservantes naturais, seja pela produção de bacteriocinas ou pelas propriedades antimicrobianas de seus outros metabólitos (Fidan et al., 2022).

Atualmente, há um crescente interesse no isolamento, identificação, caracterização e escolha de novas linhagens de BAL para desempenhar o papel de culturas iniciadoras e de produtoras de metabólitos, visando proporcionar propriedades tecnológicas e funcionais específicas, uma vez que alguns são considerados microrganismo geralmente reconhecido como seguro (GRAS) (Ağagündüz et al., 2022; Mora-Villalobos et al., 2020). Sabendo da importância comercial das BAL, é crucial compreender a sua origem, requisitos de crescimento, métodos de isolamento, identificação e caracterização. Assim, o objetivo desta revisão é explorar de forma abrangente as fontes de isolamento das BAL e os métodos clássicos e moleculares de identificação e caracterização dessas bactérias, além de avaliar as suas diversas aplicações e perspectivas futuras.

2. FONTES DE ISOLAMENTO DE BAL

Encontradas em ecossistemas variados em todo o mundo, as BAL podem ser isoladas de diversas origens. Esses microrganismos têm interagido e se adaptado de maneira dinâmica ao longo do tempo, desenvolvendo propriedades ecológicas versáteis por meio de diferentes estratégias nutricionais, incluindo mutualismo, simbiose, comensalismo e parasitismo. As BAL

probióticas, que têm maior destaque no mercado, geralmente têm sua origem no trato gastrointestinal humano. No entanto, esses microrganismos podem ser encontrados em diversas fontes alimentícias, especialmente em produtos fermentados com base láctea (Meruvu & Harsa, 2022; Trindade et al., 2022). Durante os últimos 3 anos, várias espécies de BAL foram isoladas a partir de diferentes fontes alimentícias, como evidenciado na Tabela 1. Existe uma forte motivação para isolar novas cepas de BAL, com o objetivo de fornecer ao mercado novas opções de culturas iniciadoras (Güley, Fallico, & Beresford, 2022).

Tabela 1. Fontes de isolamento de BAL.

Gênero	Espécie	Fontes de isolamento	Referência
<i>Companilactobacillus</i>	<i>Companilactobacillus crustorum</i> QHS-4	Leite fermentado tradicional da China Ocidental	Li et al. (2023)
	<i>Companilactobacillus allii</i> WiKim39	Kimchi	Lee et al. (2023)
	<i>Companilactobacillus musae</i> e <i>Companilactobacillus paralimentarius</i>	Fermento natural de cevada sem casca	Çakır et al. (2020)
	<i>Companilactobacillus futsaii</i>	Queijos mexicanos	Morales Estrada et al. (2020)
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	Quesillo e queijo cremoso duplo	Durango-Zuleta et al. (2022)
	<i>E. faecium</i>	Vinho de palma tradicional camaronês e da cerveja de milho	Fossi et al. (2022)
	<i>Enterococcus lactis</i>	Mingau de milho fermentado e massa de jalebi	Manovina et al. (2022)
	<i>E. faecium</i>	Vinho de palma e cerveja de milho	Fossi et al. (2022)
	<i>E. faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus durans</i>	Queijo branco artesanal	Albayrak & Duran (2021)
	<i>E. faecium</i>	Alimentos fermentados de uma comunidade tribal indiana	Gnanaprakash et al. (2023)
	<i>E. faecium</i> e <i>E. durans</i>	Queijo branco turco	Mohammed & Çon (2021)
	<i>E. lactis</i>	Leite de camelo	Sharma et al. (2021)
	<i>Enterococcus hirae</i> , <i>E. lactis</i> , <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i>	Peixe fermentado da Índia	Gupta et al. (2021)
	<i>E. faecium</i>	Drupas de oliveira	Riolo et al. (2023)

<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> e <i>E. durans</i>	Leite fermentado	Mkadem et al. (2023)
<i>E. faecalis</i>	Leite materno humano	Javed et al. (2022)
<i>E. faecium</i>	Leite de camelo iraniano	Rezaei et al. (2020)
<i>Enterococcus</i> spp.	Queijos gregos	Rhoades et al. (2021)
<i>E. faecium</i>	Queijos artesanais gregos	Gantzias et al. (2020)
<i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>	Queijo mexicano	Morales Estrada et al. (2020)
<i>Enterococcus mundtii</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>E. durans</i>	Vegetais folhosos indígenas africanos	Wafula et al. (2023)
<i>E. hirae</i>	Queijo Graviera Cru	Psomas et al. (2023)
<i>Enterococcus thailandicus</i>	Comida tradicional tailandesa fermentada	Suwannaphan (2021)
<i>Lacticaseibacillus</i>	Resíduos de frutos do Cerrado brasileiro	Trindade et al. (2022)
<i>Lacticaseibacillus casei/paracasei</i>	Quesillo e queijo cremoso duplo	Durango-Zuleta et al. (2022)
<i>L. paracasei</i>	Embutidos e queijos curados tradicionais.	Martín et al. (2022a)
<i>L. casei</i> e <i>L. paracasei</i>	Leite humano	Kang et al. (2020)
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> LHL6 e LHL7		
<i>L. rhamnosus</i> S51	Kefir de água fermentada tradicional	Li et al. (2023a)
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	Leite de cabra cru	Islam et al. (2021)
<i>L. paracasei</i>	Queijos tradicionais	Abarquero et al. (2022)
<i>L. paracasei</i>	Leite fermentado	Mkadem et al. (2023)
<i>L. rhamnosus</i> e <i>L. paracasei</i>	Queijos artesanais brasileiros	Margalho et al. (2020) e (2021)

	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i>	Leite de vaca, ovelha e cabra	Ramos-Pereira et al. (2021)
	<i>L. casei</i> e <i>L. paracasei</i>	Picles e carnes curadas	Chen et al. (2021)
	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Queijo Graviera Cru	Psomas et al. (2023)
	<i>L. paracasei</i>	Leite de égua cru	Jin et al. (2021)
	<i>L. casei</i>	Vegetais folhosos indígenas africanos	Wafula et al. (2023)
<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum/pentosus</i>	Resíduos de frutos do Cerrado brasileiro	Trindade et al. (2022)
	<i>L. plantarum</i>	Líquidos pré-fermentados de cereais e leguminosas selecionados	Yalmanci et al. (2022)
	<i>L. plantarum</i>	Picles chineses	Yu et al. (2023)
	<i>L. plantarum</i> S49, S187 e S184	Kefir de água fermentada tradicional	Li et al. (2023a)
	<i>L. plantarum</i> TXZ2-35	Leite fermentado tradicional da China Ocidental	Li et al. (2023)
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Leite de cabra cru	Islam et al. (2021)
	<i>L. plantarum</i>	Kimchi da Coreia do Sul	Won et al. (2020)
	<i>L. plantarum</i>	Leite de camelo	Sharma et al. (2021)
	<i>L. plantarum</i> e <i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	Queijos tradicionais	Abarquero et al. (2022)
	<i>L. plantarum</i>	Drupas de oliveira	Riolo et al. (2023)
	<i>L. plantarum</i>	Fermentação de grãos de cacau	Viesser et al. (2020)
	<i>L. plantarum</i>	Alimentos fermentados de cereais chineses	Xu et al. (2020)
	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> e <i>L. plantarum</i>	Bebidas fermentadas de Gilaburu e Shalgam	Akman et al. (2021)

<i>L. paraplantarum</i> e <i>L. plantarum</i>	Queijos artesanais brasileiros	Margalho et al. (2020) e (2021)
<i>L. papraplantarum</i>	Fermento em massa de arroz	Yang et al. (2021)
<i>L. plantarum</i>	Fermento natural de cevada sem casca	Çakır et al. (2020)
<i>L. plantarum</i>	Picles e carnes curadas	Chen et al. (2021)
<i>L. plantarum</i>	Salsichas fermentadas secas	Hu et al. (2022)
<i>L. plantarum</i>	Queijos artesanais gregos	Gantzias et al. (2020)
<i>L. plantarum</i>	Camarão gigante de água doce	Mohamad et al. (2020)
<i>L. plantarum</i>	Produtos fermentados de carne/peixe	Jitpakdee et al. (2021)
<i>L. plantarum</i>	Leite de égua cru	Jin et al. (2021)
<i>L. plantarum</i>	Pitaia amarela	Valencia-Hernández et al. (2021)
<i>L. plantarum</i> e <i>L. pentosus</i>	Vegetais folhosos indígenas africanos	Wafula et al. (2023)
<i>L. plantarum</i> e <i>L. pentosus</i>	Leite fermentado	Vasudha et al. (2023)
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	Queijo cottage etíope
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> GRIPUMSK, <i>Lactobacillus johnsonii</i> PUMSKGRI e <i>Lactobacillus leichmannii</i> SKGRIPUM	Produtos alimentares fermentados caseiros	Adugna & Andualem (2023) Srinivash et al. (2023)
<i>L. subsp. bulgaricus</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leite de cabra cru	Islam et al. (2021)
<i>Lactobacillus</i> spp.	Queijos gregos	Rhoades et al. (2021)

	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Leite de égua cru	Jin et al. (2021)
	<i>L. acidophilus</i>	Leite fermentado produzido no sudoeste da Etiópia	Goa et al. (2022)
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	Quesillo e queijo cremoso duplo	Durango-Zuleta et al. (2022)
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordinae</i>	Líquidos pré-fermentados de cereais e leguminosas selecionados	Yalmanci et al. (2022)
	<i>Lactococcus hircilactis</i> CH4	Produtos alimentares fermentados caseiros	Srinivash et al. (2023)
	<i>L. lactis</i>	Kimchi	Lee et al. (2023)
	<i>L. lactis</i>	Leite de camelo	Sharma et al. (2021)
	<i>L. lactis</i>	Ervas, frutas e vegetais	Huang et al. (2023)
	<i>L. lactis</i>	Queijos tradicionais	Abarquero et al. (2022)
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kefir	Mantegazza et al. (2023)
	<i>Lactococcus garviae</i> , <i>L. lactis</i> e	Queijos artesanais brasileiros	Margalho et al. (2021)
	<i>Lactococcus</i> spp.		
	<i>L. lactis</i>	Leite de camelo iraniano	Rezaei et al. (2020)
	<i>L. lactis</i>	Salsichas fermentadas secas	Hu et al. (2022)
	<i>L. lactis</i>	Queijo artesanais gregos	Gantzias et al. (2020)
	<i>L. garviae</i>	Leite de égua cru	Jin et al. (2021)
	<i>L. garviae</i>	Vegetais folhosos indígenas africanos	Wafula et al. (2023)
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite fermentado produzido no sudoeste da Etiópia	Goa et al. (2022)

	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>	Quesillo e queijo cremoso duplo	Durango-Zuleta et al. (2022)
<i>Latilactobacillus</i>	<i>Latilactobacillus sakei</i>	Embutidos e queijos curados tradicionais	Martín et al. (2022a)
	<i>Latilactobacillus curvatus</i> WiKim38	Kimchi	Lee et al. (2023)
	<i>L. sakei</i>	Kimchi da Coreia do Sul	Won et al. (2020)
	<i>Latilactobacillus kefir</i>	Kefir	Mantegazza et al. (2023)
	<i>L. curvatus</i>	Queijos artesanais brasileiros	Margalho et al. (2020) e (2021)
	<i>L. sakei</i>	Salsichas de peixe fermentadas	Belleggia et al. (2022)
	<i>L. sakei</i> e <i>L. curvatus</i>	Salsichas fermentadas secas	Hu et al. (2022)
	<i>L. kefir</i> e <i>L. curvatus</i>	Leite de égua cru	Jin et al. (2021)
	<i>L. kefir</i> M4	Kefir	Chen et al. (2021)
<i>Lentilactobacillus</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	Queijos artesanais brasileiros	Margalho et al. (2020) e (2021)
	<i>Lentilactobacillus parafarraginis</i> e <i>L. buchneri</i>	Picles e carnes curadas	Chen et al. (2021)
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> e <i>Leuconostoc lactis</i>	Líquidos pré-fermentados de cereais e leguminosas selecionados	Yalmanci et al. (2022)
	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Kimchi na Coreia do Sul	Won et al. (2020)
	<i>Leuconostoc citreum</i> , <i>L. mesenteroides</i> e <i>L. pseudomesenteroides</i>	Queijos tradicionais	Abarquero et al. (2022)

<i>L. pseudomesenteroides</i> e <i>L. mesenteroides</i>	Kefir	Mantegazza et al. (2023)
<i>L. pseudomesenteroides</i>	Fermentação de grãos de cacau	Viesser et al. (2020)
<i>L. mesenteroides</i>	Queijos artesanais brasileiros	Margalho et al. (2021)
<i>L. mesenteroides</i>	Leite de camelo iraniano	Rezaei et al. (2020)
<i>L. mesenteroides</i>	Fermento natural de cevada sem casca	Çakır et al. (2020)
<i>L. mesenteroides</i>	Queijo artesanal grego	Gantzias et al. (2020)
<i>L. lactis</i>	Leite de égua cru	Jin et al. (2021)
<i>L. citreum</i>	Queijo mexicano	Estrada et al. (2020)
<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. citreum</i> e <i>L. lactis</i>	Vegetais folhosos indígenas africanos	Wafula et al. (2023)
<i>L. pseudomesenteroides</i>	Queijo Graviera cru	Psomas et al. (2023)
<i>L. lactis</i>	Leite fermentado produzido no sudoeste da Etiópia	Goa et al. (2022)
<i>L. mesenteroides</i> e <i>Leuconostoc sakei</i>	Alimentos tradicionais de soja fermentada no Japão	Shimodate & Honda (2022)
<i>Levilactobacillus</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Vinho de palma tradicional camaronês e da cerveja de milho
	<i>L. brevis</i>	Fossi et al. (2022)
	<i>L. brevis</i>	Queijos tradicionais
	<i>L. brevis</i>	Leite materno humano
	<i>L. brevis</i>	Queijos artesanais brasileiros
	<i>L. brevis</i>	Margalho et al. (2020) e (2021)
	<i>L. brevis</i>	Kombuchá
		Nguyen & Nguyen (2024)

	<i>L. brevis</i>	Fermento natural de cevada sem casca	Çakır et al. (2020)
	<i>L. brevis</i>	Queijos artesanais gregos	Gantzias et al. (2020)
<i>Limosilactobacillus</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	Quesillo e queijo cremoso duplo	Durango-Zuleta et al. (2022)
	<i>L. fermentum</i> S7	Kefir de água fermentada tradicional	Li et al. (2023a)
	<i>L. fermentum</i>	Picles chineses	Yu et al. (2023)
	<i>L. fermentum</i> TZ-22	Leite fermentado tradicional da China Ocidental	Li et al. (2023)
	<i>L. fermentum</i>	Diferentes fontes de alimentos	Aman et al. (2021)
	<i>L. fermentum</i>	Leite de cabra cru	Islam et al. (2021)
	<i>L. fermentum</i>	Leite fermentado	Mkadem et al. (2023)
	<i>L. fermentum</i>	Leite materno humano	Javed et al. (2022)
	<i>L. fermentum</i>	Bebidas fermentadas de Gilaburu e Shalgam	Akman et al. (2021)
	<i>L. fermentum</i>	Queijos artesanais brasileiros	Margalho et al. (2020) e (2021)
	<i>L. fermentum</i>	Fermento em massa de arroz	Yang et al. (2021)
	<i>Limosilactobacillus equigenerosi</i> e <i>L. fermentum</i>	Fermento natural de cevada sem casca	Çakır et al. (2020)
	<i>L. fermentum</i>	Processo tradicional da cerveja marfinense	Aka et al. (2020)
	<i>L. fermentum</i>	Vegetais folhosos indígenas africanos	Wafula et al. (2023)
	<i>L. fermentum</i>	Comida tradicional tailandesa fermentada	Suwannaphan (2021)
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Resíduos de frutos do Cerrado brasileiro	Trindade et al. (2022)
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Diferentes fontes de alimentos	Aman et al. (2021)

	<i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> e <i>Pediococcus. lolii</i>	Peixe fermentado da Índia	Gupta et al. (2021)
	<i>P. pentosaceus</i>	Drupas de oliveira	Riolo et al. (2023)
	<i>P. acidilactici</i> e <i>P. pentosaceus</i>	Fermentação de grãos de cacau	Viesser et al. (2020)
	<i>P. acidilactici</i> e <i>P. pentosaceus</i>	Queijos artesanais brasileiros	Margalho et al. (2021)
	<i>P. acidilactici</i>	Fermento natural de cevada sem casca	Çakır et al. (2020)
	<i>P. pentosaceus</i>	Queijo artesanal grego	Gantzias et al. (2020)
	<i>P. pentosaceus</i>	Produtos fermentados de carne/peixe	Jitpakdee et al. (2021)
	<i>P. pentosaceus</i>	Leite de égua cru	Jin et al. (2021)
	<i>P. acidilactici</i>	Kefir	Chen et al. (2021)
	<i>P. pentosaceus</i>	Geleia de rosas fermentada	Xia et al. (2021)
	<i>P. acidilactici</i>	Processo tradicional da cerveja marfinense	Aka et al. (2020)
	<i>P. pentosaceus</i>	Vegetais folhosos indígenas africanos	Wafula et al. (2023)
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	Drupas de oliveira	Riolo et al. (2023)
	<i>Streptococcus macedonicus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i>	Queijo Tulum Salmourado de Izmir	Güley et al. (2022)
	<i>Streptococcus infantarius</i>	Quesillo e queijo cremoso duplo	Durango-Zuleta et al. (2022)
	<i>S. thermophilus</i>	Leite cru de cabra	Islam et al. (2021)
<i>Weissella</i>	<i>Weissella cibaria/confusa</i>	Resíduos de frutos do Cerrado brasileiro	Trindade et al. (2022)
	<i>W. cibaria</i>	Mingau de milho fermentado e massa de jalebi	Manovina et al. (2022)

<i>W. cibaria</i> e <i>W. confusa</i>	Líquidos pré-fermentados de cereais e leguminosas selecionados	Yalmanci et al. (2022)
<i>W. confusa</i>	Leite materno humano	Javed et al. (2022)
<i>Weissella paramesenteroides</i>	Picles e carnes curadas	Chen et al. (2021)
<i>Weissella hellenica</i>	Salsichas fermentadas secas	Hu et al. (2022)
<i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i> e <i>W. muntiaci</i>	Vegetais folhosos indígenas africanos	Wafula et al. (2023)
<i>Weissella thailandensis</i>	Comida tradicional tailandesa fermentada	Suwannaphan (2021)

Apesar de compartilharem características comuns, as BAL apresentam necessidades nutricionais e condições de crescimento específicas, incluindo faixas de pH específicas, o que representa um desafio para o desenvolvimento de um meio de cultura universal para esse grupo (Renschler et al., 2020). Nas últimas décadas, os estudos têm se voltado para compreender as exigências nutricionais das BAL e para desenvolver meios de cultura mais eficazes para otimizar seu crescimento. A descoberta de nutrientes essenciais para o crescimento desses microrganismos possibilitou a formulação de meios de cultura quimicamente definidos, otimizando o crescimento e controle de diferentes espécies (Hayek et al., 2019). Essa busca por meios de cultura mais específicos e eficientes trouxe avanços significativos para a microbiologia e a indústria alimentícia.

O meio de cultura de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) é amplamente utilizado para isolamento e enumeração de BAL (Nero et al., 2020; Veselá et al., 2019; Vinderola et al., 2019). Embora o meio forneça informações importantes como a contagem total de BAL, sua baixa seletividade impede a quantificação precisa de certos grupos, como *Streptococcus*, que podem não se desenvolver adequadamente neste meio (Hayek et al., 2019; Yoon et al., 2023). Espécies distintas de *Lactobacillus*, quando cultivadas em meio MRS sólido, frequentemente formam colônias com características visuais muito semelhantes, o que representa um desafio para a identificação precisa e diferenciação entre as espécies (Vinderola et al., 2019).

É possível associar diferentes substâncias e condições de incubação a esse meio de cultura, a fim de permitir a enumeração seletiva de BAL. Grande parte dos métodos de isolamento é fundamentada no emprego de meios de cultura padrão não seletivos para BAL, com modificações nas concentrações de NaCl, fontes de carbono, pH, inclusão de antibióticos e ajustes nas temperaturas e atmosfera de incubação, a fim de aprimorar a seletividade (Meruvu & Harsa, 2022; Nero et al., 2020).

O meio de cultura MRS tem desempenhado um papel essencial como um meio de cultura geral e basal para uma variedade de testes microbiológicos. O emprego do ácido nítrico em meio MRS (mMRS) pode possibilitar o isolamento seletivo de BAL em amostras de alimentos, atuando como agente seletivo. A utilização de mMRS, facilita a detecção de várias cepas de BAL, enquanto inibe o crescimento de outras bactérias indesejadas, como *Bifidobacterium* spp. (Renschler et al., 2020). Um estudo conduzido por Renschler et al. (2020), mostrou que cinco espécies de BAL (*Bifidobacterium longum*, *S. salivarius*, *L. lactis*, *L. acidophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) cresceram de forma mais rápida e atingiram densidades significativamente maiores em caldo mMRS, em comparação ao meio MRS convencional. Por outro lado, bactérias não-alvo como *E. faecalis* e *Bacillus cereus*

apresentaram um crescimento mais vigoroso e maiores valores de densidade óptica em MRS tradicional, comparado ao mMRS.

Outro estudo relatou resultados positivos para *Lactobacillus bulgaricus* ao modificar o meio MRS, substituindo a fonte de nitrogênio por alternativas mais eficazes (Ayivi et al., 2022). Além do MRS, outros meios de cultura também foram avaliados. Nwamaioha e Ibrahim (2018) descobriram que o meio clostridial reforçado, suplementado com CaCl₂, uracila, Tween 80 e corante azul de anilina, superou o MRS convencional na contagem e diferenciação de *L. bulgaricus* em culturas mistas de BAL.

A busca por meios alternativos levou ao desenvolvimento do meio M16, que se mostrou mais adequado para o crescimento de *Streptococcus*. No entanto, a rápida acidificação do meio M16 durante o crescimento bacteriano levou à criação do meio M17, com capacidade tamponante aprimorada (Terzaghi & Sandine, 1975). Este meio, rico em aminoácidos e peptídeos essenciais para o desenvolvimento bacteriano, é empregado para promover o rápido crescimento e a detecção eficiente de microrganismos. Ele a rápida proliferação das bactérias, gerando sinais de crescimento, como turbidez ou variações de pH, mesmo em baixas concentrações (Hayek et al., 2019).

Outros meios de cultura específicos foram desenvolvidos para o isolamento e cultivo seletivo de diferentes gêneros e espécies, como o *Lactobacillus* MRS para microrganismos do gênero *Lactobacillus* spp. Além disso, meios como All Purpose Tween 80 (APT), ágar de isolamento de *S. thermophilus*, ágar de contagem de placa púrpura de bromocresol (BCP) e o ágar de sangue vivo (BL), são apenas alguns de muitos meios que foram estudados para o cultivo de BAL (Hayek et al., 2019; Yoon et al., 2023). Em estudo realizado por Yoon et al. (2023), foram investigados 13 meios com o intuito de determinar sua eficácia na enumeração seletiva de 17 cepas de bacilos e 7 cepas de cocos de BAL tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. Análises posteriores revelaram que o meio BL com suplementação de ácido propiônico com pH de 5,8 demonstrou ser o mais apropriado para a contagem de BAL em amostras de alimentos. Alternativamente, placas Petrifilm 3M de Contagem de Bactérias Ácido-Láticas podem ser utilizadas como ferramenta de enumeração rápida e prática de diferentes BAL em alimentos, como demonstrou Nero et al. (2020), obtendo resultados confiáveis durante a enumeração de BAL em bacon.

Uma opção para redução de despesas, promoção da sustentabilidade ambiental e simplificação de procedimentos é o aproveitamento de resíduos agroindustriais como meios de cultivo. Segundo Rama et al. (2019), observa-se que a presença de lactose e aminoácidos de

cadeia ramificada (BCAAs) no soro de leite tem um impacto positivo no crescimento de diversas BAL.

3. MÉTODOS CLÁSSICOS E MOLECULARES DE IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

A abordagem baseada em testes fenotípicos, bioquímicos e fisiológicos tradicionais é amplamente reconhecida para a identificação e classificação de BAL (Sharma et al., 2020). Geralmente, as colônias isoladas são submetidas a testes para avaliar sua morfologia e características bioquímicas, incluindo reação de Gram, teste da catalase, coloração de esporos e ensaio de utilização da oxidase. Aquelas que apresentam características de Gram positiva, ausência de formação de esporos, resultado negativo nos testes de catalase e oxidase são consideradas como BAL (Adugna & Andualem, 2023).

Adicionalmente, outros testes são empregados para complementar a identificação e diferenciação de cepas de BAL. Esses testes incluem a avaliação da fermentação da glicose, o crescimento em diferentes faixas de temperatura e a capacidade de fermentar diversos carboidratos (Mushtaq et al., 2021; Sun et al., 2022). Além disso, o sistema de identificação Analytical Profile Index (API 50 CHL, bioMérieux) (Fossi et al., 2022) e o teste de hidrólise de arginina, importante para distinguir cepas heterofermentativas, (Nakibapher Jones Shangpliang & Tamang, 2021) também são empregados.

Os métodos genotípicos surgiram como uma alternativa para classificar as BAL devido às limitações das ferramentas fenotípicas na identificação precisa de cepas bacterianas. A classificação baseada unicamente em características fenotípicas pode levar a ambiguidades, devido aos procedimentos complexos, às diferentes exigências nutricionais e de crescimento desses microrganismos, além de uma pequena capacidade discriminatória dessas abordagens (Abdullah et al., 2021; Sharma et al., 2020).

A identificação e diferenciação de cepas de BAL podem ser alcançadas com precisão e resolução utilizando métodos genotípicos que dependem de análise genética. Existem diversas técnicas moleculares disponíveis para identificação desse grupo de bactérias, incluindo opções dependentes e independentes de cultivo. O isolamento prévio de bactérias utilizando técnicas microbiológicas convencionais e meios de cultura seletivos é um pré-requisito para análise via métodos dependentes de cultivo, que envolve testes microscópicos e bioquímicos subsequentes (Rivas et al., 2022).

3.1. MÉTODOS DEPENDENTES DE CULTIVO

O sequenciamento do gene *16S rRNA*, a partir de método dependente de cultivo, tem sido largamente utilizado como uma técnica para a identificação e estabelecimento de relações filogenéticas entre as espécies bacterianas (Johnson et al., 2019; Skotniczny & Satora, 2023). Por meio do método, as sondas de ácido nucleico são aplicadas para identificar os genes ribossomais presentes no genoma bacteriano (Sharma et al., 2020). As regiões variáveis do gene *16S rRNA* equivalem à distância filogenética entre os microrganismos, o que indica as diferenças genéticas entre as espécies bacterianas. Por outro lado, as regiões conservadas do gene, que mudam lentamente ao longo do processo de evolução, possibilitam o desenho de oligonucleotídeos universais que podem ser utilizados para amplificar o gene *16S rRNA* em todas as bactérias (Skotniczny & Satora, 2023). Estudos recentes utilizaram este método para identificação de BAL (Durango-Zuleta et al., 2022; Fossi et al., 2022; Gnanaprakash et al., 2023; Papadopoulou et al., 2023; Patil et al., 2019; Qayyum et al., 2023; Rhoades et al., 2021; Viesser et al., 2020).

No método de ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), o DNA ribossômico é amplificado e, em seguida, digerido por endonucleases de restrição específicas, capazes de clivar o DNA em sequências específicas. Isso resulta em fragmentos de diferentes tamanhos que podem ser separados por eletroforese em gel de agarose, permitindo a análise e a comparação dos padrões de fragmentos obtidos (Sharma et al., 2020). *E. durans* foi a BAL mais dominante identificada por ARDRA em queijo *Chhurpi* produzido na região de Sikkim no Himalaia (Chourasia et al., 2022). ARDRA é uma abordagem que busca diferenciar microrganismos em nível de espécie, aproveitando a conservação do rRNA (Adikari et al., 2021). No entanto, estudos recentes, como o de Adikari et al. (2021), relataram que a técnica pode não ser suficientemente sensível para distinguir isolados com precisão em níveis de espécie em coalhada tradicional de leite de búfala fermentado no Sri Lanka. Conforme observado, a técnica de ARDRA não foi capaz de distinguir entre *L. fermentum* e *L. plantarum*. Contudo, o estudo mostrou-se eficaz na diferenciação de *L. curvatus* e *L. acidophilus* em relação a *L. fermentum* e *L. plantarum*.

A tipagem molecular desempenha um papel crucial na discriminação entre as diferentes cepas de BAL. Ao utilizar métodos de tipagem molecular, como a análise de polimorfismo de fragmentos amplificados (RAPD), análise número variável de repetições em tandem (VNTR) ou digitação de sequência multilocus (MLST), é possível obter informações precisas sobre a diversidade genética e a variabilidade das cepas (Rivas et al., 2022).

Embora a técnica de amplificação e purificação dos genes do DNA extraído através da reação em cadeia da polimerase (PCR) seja conhecida por sua morosidade, a espectrometria de massa de tempo de voo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) oferece uma alternativa eficaz e rápida para identificação precisa. Utilizando apenas uma única colônia, esta técnica permite analisar simultaneamente um grande número de isolados, destacando-se pela sua eficiência e velocidade no processo de identificação microbiológica (Lee et al., 2018). O método utiliza os padrões espectrais de massa das proteínas ribossômicas de microrganismos de diferentes gêneros, espécies e cepas para sua identificação única (Ashfaq et al., 2022). Um espectrômetro de massa MALDI-TOF consiste de uma fonte de íons projetada para amostras sólidas, conectada a um analisador de massa que separa os íons com base no tempo que levam para percorrer uma distância específica em um vácuo controlado (Nacef et al., 2017). Essa técnica rápida e precisa foi previamente empregada na caracterização de BAL presentes em uma variedade de alimentos, como bebidas fermentadas (Ogunremi et al., 2022, 2024), queijos (Caldeira et al., 2024; Gantzias et al., 2020) e carnes (Altakhis et al., 2021).

3.2. MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO

A identificação e caracterização precisa da comunidade microbiana em uma amostra exige a análise de células viáveis e não cultiváveis. Métodos dependentes de cultivo, embora úteis para determinar a distribuição de células viáveis e isolar microrganismos, apresentam limitações na detecção de bactérias presentes em baixas concentrações ou mortas. Nesses casos, métodos independentes de cultivo surgem como alternativas eficazes para a detecção de microrganismos, ampliando a capacidade de análise da diversidade microbiana. Esses métodos envolvem a extração de DNA genômico total de uma amostra para analisar e identificar diferentes membros da comunidade microbiana (Lee et al., 2018; Rivas et al., 2022).

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante por reação em cadeia da polimerase (PCR-DGGE) é um método independente de cultivo. Esse método envolve a extração do DNA total de uma população bacteriana, seguida da amplificação das regiões hipervariáveis do gene *16S rDNA* por meio da técnica de PCR seguido de gradientes de desnaturação para examinar variações nos perfis de DNA (Dimitrov, 2019). Em um estudo de Demirci et al. (2021), foi identificado 9 espécies diferentes através do método PCR-DGGE em amostras de queijo Tulum, produzido em Mut, região da Turquia, enquanto Wang et al. (2021) demonstrou que BAL podem ser identificadas durante todo o processo de fermentação de salsichas estilo Sichuan, fabricadas em províncias do sudoeste da China, pelo mesmo método.

Ainda, existem outras técnicas, como a hibridização fluorescente *in situ* (FISH); polimorfismos no comprimento do fragmento de restrição terminal (TRFLP); e a análise automatizada do espaçador intergênico ribossomal (ARISA). Embora essas metodologias apresentem algumas vantagens, como baixo custo e reprodutibilidade aceitável, elas fornecem análises limitadas da diversidade microbiana (Rivas et al., 2022; Sharma et al., 2020).

O desenvolvimento do método de sequenciamento de Sanger foi fundamental para o avanço das tecnologias de sequenciamento, impulsionando o interesse por métodos automatizados e de alto rendimento. Esse esforço culminou no desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (NGS), capaz de gerar milhões de leituras rapidamente a um custo reduzido (Van Reckem et al., 2021; Verma et al., 2024). Essas avançadas tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (HTS) possibilitam a obtenção de uma enorme quantidade de informações, permitindo a detecção tanto de microrganismos cultiváveis quanto não cultiváveis, além de microrganismos presentes em baixas abundâncias relativas (Maidana et al., 2020; Rivas et al., 2022). No entanto, microrganismos presentes em concentrações extremamente baixas ainda podem não ser identificados com precisão (Rimoldi et al., 2024).

As tecnologias de HTS são baseadas em amplicon, metagenômica shotgun e metatranscriptômica (Walsh et al., 2023). O sequenciamento baseado em amplicon, geralmente direcionado ao gene *16S rRNA*, é rápido e econômico para perfis de comunidades, mas pode sofrer vieses de PCR e resolução taxonômica limitada. A metagenômica shotgun sequencia quase todo o DNA, permitindo uma resolução taxonômica mais alta, montagem do genoma e investigação funcional (Van Reckem et al., 2021), mas apresenta custos mais altos em relação ao amplicon (Walsh et al., 2023). Por outro lado, metatranscriptômica é capaz examinar a expressão genética coletiva de quase todos os microrganismos em uma amostra (Aplakidou et al., 2024). Atualmente, tanto as plataformas NGS de leitura curta (como Illumina, 454 pirosequenciamento, Ion Torrent, SOLiD, cPAL) quanto as de leitura longa (como SMRT e Oxford Nanopore) são empregadas para investigar os aspectos taxonômicos, comunitários, genômicos e funcionais dos microrganismos (Verma et al., 2024). A Illumina domina o campo de NGS com sua tecnologia baseada em amplificação de ponte. Nesse método, fragmentos de DNA (~500 pb) com adaptadores específicos em suas extremidades são amplificados em uma lâmina de vidro. Essa amplificação ocorre através de ciclos repetidos de síntese de DNA, utilizando como molde os fragmentos originais e como primers sequências complementares aos adaptadores, fixados na lâmina (Slatko et al., 2018). Em março de 2023, a Illumina introduziu sua plataforma de sequenciamento de leitura longa, facilitando o sequenciamento de genomas complexos e maiores. Tecnologias como TELL-Seq, que utiliza a enzima transposase,

prometem melhorar a análise de amostras microbianas ricas em G+C e permitir um melhor acesso a regiões difíceis dos genomas (Verma et al., 2024).

Diversos estudos utilizaram a técnica de HTS para identificar BAL em matrizes alimentares complexas. Dentice Maidana et al. (2020) revelaram que as BAL, bacilos e clostrídios são os principais grupos bacterianos presentes nas etapas de retrogradação de massa fermentadas espontaneamente preparada com sementes de chia. Valletta et al. (2023) empregaram nanoLC-ESI-MS/MS para criar perfis detalhados de BAL, abrangendo os níveis de gênero, espécie e subespécie, em produtos de kefir, tanto comerciais quanto artesanais, assim como em grãos de kefir. Mais recentemente, Wang et al. (2024) identificaram *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Komagataeibacter* e *Gluconacetobacter* como os principais gêneros microbianos responsáveis pela fermentação do kombucha.

4. REGULARIZAÇÃO

Importantes descobertas em microbiologia começaram a transformar a produção de alimentos a partir da segunda metade do século XIX. Em 1857, Louis Pasteur elucidou o processo de fermentação láctica, e em 1873, Joseph Lister isolou a primeira cultura bacteriana pura, *L. lactis* (Franz et al., 2010). Com o tempo, os métodos tradicionais de fermentação foram sendo gradualmente substituído por processos industriais padronizados, resultando em avanço na produção de culturas bacterianas puras e específicas. Essas inovações proporcionaram maior previsibilidade e controle sobre a qualidade e segurança dos alimentos fermentados, permitindo uma produção em larga escala mais eficiente (Mukherjee et al., 2022). No entanto, com o aumento do uso industrial dessas culturas, surgiu a necessidade de regulamentações mais rigorosas para garantir a segurança dessas bactérias para o consumo humano. Como resposta, surgiram sistemas de regulamentação, como o GRAS nos Estados Unidos, o QPS na Europa e as normativas específicas, como a da Anvisa no Brasil.

Nos Estados Unidos, as BAL começaram a ser reconhecidas como seguras com a introdução do conceito "GRAS" (Generally Recognized as Safe) pela *Food and Drug Administration* (FDA). Esse conceito foi consolidado pelo *Food Additives Amendment* de 1958, que estabeleceu critérios para classificar substâncias como seguras com base em seu histórico de uso ou em evidências científicas robustas. Ingredientes alimentares, incluindo microrganismos, podem ser aprovados pela FDA como aditivos alimentares ou reconhecidos como GRAS. O status GRAS pode ser formalizado pela FDA ou estabelecido independentemente por especialistas, possibilitando que a lista oficial de substâncias GRAS

não esteja necessariamente completa. Microrganismos e seus derivados também podem ser incluídos nesta categoria, sendo regulamentados pelo Título 21 do Código de Regulamentos Federais (21 CFR), que detalha os critérios de segurança e uso (FDA, 2024).

De acordo com as regulamentações da FDA (21 CFR Parte 170, Subparte E, 2023), o processo de submissão GRAS envolve, inicialmente, uma revisão científica rigorosa conduzida pela empresa ou indivíduo para determinar que a substância é segura para o uso pretendido, com base em evidências científicas ou histórico de uso seguro. A notificação à FDA para obter reconhecimento oficial, deve incluir a identificação da substância, seu uso pretendido, base científica de segurança e relatórios completos. A submissão é feita eletronicamente por meio do portal da FDA, seguindo diretrizes específicas. A FDA revisa a notificação e, caso concorde com a avaliação, reconhece o status GRAS; caso contrário, pode solicitar mais informações ou rejeitar a notificação (FDA, 2023).

O conceito de segurança para BAL na Europa é regido por uma série de legislações da União Europeia e coordenado pela *European Food Safety Authority* (EFSA). A EFSA é a responsável por avaliar a segurança de agentes biológicos em produtos regulamentados, como aditivos alimentares, rações, novos alimentos, suplementos alimentares e enzimas alimentares. Em 2007, foi introduzido o conceito de *Qualified Presumption of Safety* (QPS), que oferece um status de segurança simplificado para microrganismos intencionalmente utilizados na cadeia alimentar e de rações. Este conceito facilita a avaliação e aprovação de microrganismos que apresentem um histórico comprovado de uso seguro (EFSA, 2007).

O processo de avaliação QPS é acionado pela EFSA após a recepção de uma solicitação de autorização de mercado, conforme estipulado no Regulamento 258/97/EC para novos alimentos. A EFSA avalia microrganismos usados em alimentos e rações com base em quatro critérios principais: identificação taxonômica, corpo de conhecimento, potencial patogênico (incluindo conhecimento de resistência antimicrobiana adquirida) e uso final. Se uma unidade taxonômica (UT) atender a esses critérios e não apresentar riscos de segurança, ela pode receber o status QPS, isentando cepas dessa UT de avaliações de segurança adicionais, desde que requisitos específicos sejam cumpridos (EFSA, 2007). A lista de microrganismos com status QPS é publicada na EFSA Knowledge Junction, e contém duas listas principais: lista atualizada de microrganismos recomendados pelo QPS para avaliações de risco de segurança realizadas pela EFSA e agentes microbiológicos notificados à EFSA, por meio de um pedido de autorização de comercialização. Essas listas são atualizadas semestralmente após a emissão de uma Declaração do Painel de Riscos Biológicos (BIOHAZ), que revisa a literatura científica e avalia novas notificações. A cada três anos, a EFSA também publica uma Opinião Científica

mais detalhada, fornecendo uma revisão abrangente sobre o status e a segurança das UTs na lista QPS (EFSA, 2024).

Por outro lado, o processo QPS não inclui a avaliação de fatores como exposição do usuário, potencial alergenicidade ou riscos relacionados à formulação. Esses aspectos são considerados separadamente durante a análise de segurança para a autorização de mercado. Embora o status QPS simplifique a avaliação de segurança, ele não garante automaticamente a comercialização. Cepas pertencentes a UTs com status QPS ainda devem passar por uma verificação de identidade taxonômica e atender a qualificações específicas durante o processo de avaliação (EFSA, 2024).

Regulamentações específicas para o uso de BAL, incluindo probióticos, são implementadas em vários países. No Brasil, essa regulamentação é conduzida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). A Anvisa adota uma abordagem que harmoniza diretrizes internacionais, como as da FDA dos Estados Unidos e da EFSA, adaptando-as ao contexto brasileiro. O reconhecimento da segurança das BAL no Brasil segue um processo rigoroso, que exige a submissão de dados científicos baseados em estudos toxicológicos e clínicos. Esses requisitos são estabelecidos na Resolução RDC Nº 241, de 2018, que regulamenta novos alimentos e ingredientes. A resolução determina que qualquer novo ingrediente ou alimento, incluindo probióticos, deve apresentar comprovação de segurança antes de ser autorizado ao mercado, garantindo, assim, a proteção da saúde pública (Brasil, 2018).

Desta forma, essas diferentes abordagens refletem como cada país desenvolve regulamentos específicos à medida que a ciência avança e surgem novas demandas por controle de qualidade e segurança alimentar. Enquanto os EUA e a Europa possuem sistemas formalizados, como o GRAS e o QPS o Brasil adota uma abordagem híbrida, combinando normas internacionais com adaptações locais.

5. APLICAÇÕES

O interesse dos consumidores por uma alimentação mais saudável e natural cresceu nos últimos anos, impulsionando a demanda por produtos funcionais que proporcionem benefícios à saúde (Ağagündüz et al., 2022; Bibi et al., 2021). Paralelamente, os mesmos permanecem atentos à presença de ingredientes menos saudáveis, como aditivos artificiais e componentes desconhecidos por eles, vinculando alimentos saudáveis à categoria de alimentos "*clean label*",

que contém o teor reduzido de aditivos e substâncias químicas (Guimarães et al., 2020; Moradi et al., 2021).

A produção de alimentos e bebidas fermentadas com BAL é uma tendência na indústria alimentícia (Wu et al., 2021). As BAL trazem características únicas a esses produtos, que vão desde melhorias no valor nutricional e funcional até a incorporação de propriedades antimicrobianas (Abdel-Nasser et al., 2023; De Pasquale et al., 2020; Kavitate et al., 2018). Isso faz com que as BAL sejam amplamente utilizadas como culturas iniciadoras em produtos fermentados que se destacam pela alta qualidade e segurança (Abarquero et al., 2022, 2023; Huang et al., 2023; Zhao et al., 2023). A seleção cuidadosa dessas culturas desempenha um papel vital no gerenciamento do processo de fermentação, ajudando a minimizar o risco de falhas, reduzir o tempo necessário para a fermentação e melhorar o valor final do produto (Kavitate et al., 2018). O histórico comprovado de segurança das BAL garante seu reconhecimento como *Generally Recognized As Safe* (GRAS), possibilitando sua utilização em alimentos tanto na forma de culturas iniciadoras quanto como cepas probióticas, além da aplicação de seus metabólitos (Hosken et al., 2023; Rathod et al., 2021).

5.1. FERMENTAÇÃO POR BAL E SEUS METABÓLITOS

A fermentação de alimentos por BAL pode proporcionar vários benefícios, incluindo melhorias nas características sensoriais e funcionais dos alimentos (Liu et al., 2023; Zhang et al., 2023). Durante esse processo, as BAL e seus metabólitos degradam componentes complexos, resultando na liberação ou síntese de substâncias bioativas que trazem benefícios para a saúde humana, além de prolongar o prazo de validade do alimento (Tang et al., 2023). As duas vias metabólicas exercidas por BAL dão origem a diferentes metabólitos: ácido láctico, principal produto gerado por elas, é produzido pela via homofermentativa e as cepas que seguem esse caminho são frequentemente utilizadas como culturas iniciadoras, uma vez que promovem rápida acidificação dos alimentos, como é o caso de cepas dos gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus*. Cepas que seguem a via heterofermentativa, produtoras de acetato, lactato, dióxido de carbono e etanol, são aplicadas com o objetivo de desenvolver características sensoriais devido às suas atividades glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, como *Wiessella*, *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus* (Ayivi & Ibrahim, 2022; Hosken et al., 2023; Meruvu & Harsa, 2022; Raj et al., 2022; Rathod et al., 2021). A fermentação por cepas de BAL é responsável pela produção de uma variedade de metabólitos, que incluem o ácido láctico e seu derivado, o ácido polilático, bem como diversos ácidos orgânicos, como o ácido acético, ácido

fenil lático, ácido butírico, ácido fórmico, ácido propiônico e ácido succínico. Além desses compostos, as BAL também geram aminas, bacteriocinas, peptídeos antifúngicos e antibacterianos, ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas, precursores de sabor, substâncias antioxidantes, diacetil, acetoína, polióis e peróxidos de hidrogênio (Meruvu & Harsa, 2022; Raj et al., 2022).

Os exopolissacarídeos (EPS) também são produzidos por BAL e têm atraído considerável atenção devido à sua aplicabilidade na indústria alimentar (Korcz & Varga, 2021), como resumido na Tabela 2. Os EPS interagem com outros componentes dos alimentos e possibilitam a melhora de características reológicas e sensoriais, podendo ser aplicado tanto como agentes texturizantes quanto como estabilizantes, resultando em aumento na viscosidade e na melhora de sabor do alimento (Erginkaya & Konuray-Altun, 2022; Korcz & Varga, 2021; Raj et al., 2022). Além disso, é possível notar um crescente interesse na produção de EPS devido às suas outras propriedades, como atividades antitumorais, antivirais, imunomoduladoras, antioxidantes e a capacidade de redução do colesterol (Erginkaya & Konuray-Altun, 2022; Rahbar Saadat et al., 2019).

Tabela 2. Exopolissacarídeos (EPS) produzidos por BAL.

Microrganismo	Fonte de isolamento	Rendimento	Potencial biotecnológico	Referência
<i>Enterococcus faecium</i> MC-5	Tripa de peixe	16,48 g/L	Absorvente e termoestável, com atividade antioxidante e antibiofilme	Tilwani et al. (2021)
<i>L. hircilactis</i> CH4, <i>L. delbrueckii</i> GRIPUMSK, <i>L. johnsonii</i> PUMSKGRI e <i>L. leichmannii</i> SKGRIPUM.	Queijo, coalhada, água de arroz fermentada, iogurte e leite de diferentes regiões da Índia	196.4 U/mL - 217.9 U/mL	Atividade probiótica, emulsificante, antimicrobiana, antibiofilme, antioxidante e anticancerígenos	Srinivash et al. (2023)
<i>W. cibaria</i> NC516.11	Grãos de destilaria de Fen jiu	3,10 g/kg	Melhoria das propriedades reológicas e viscoelásticas de massa fermentada	Zhang et al. (2023)
<i>E. durans</i> K48, <i>E. faecium</i> R114 e <i>E. faecium</i> T52	Kishk iraniano	2,07 g/L - 2,68 g/L	Atividade antioxidante e antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Vosough et al. (2021)
<i>L. mesenteroides</i> B3	Queijo italiano semiduro	1,06 g/L	Capacidade antimicrobiana, antibiofilme, antioxidante, promovendo o crescimento de bifidobactérias	Bisson et al. (2023)
<i>L. paraplantarum</i> NCCP 962	Dahi	0,910 g/L	Capacidade de redução do colesterol	Afreen et al. (2023)

<i>Lactiplantibacillus</i> sp. ME2b, <i>Lactococcus</i> sp. ME7, <i>Lacticaseibacillus</i> sp. ME17 e <i>Lactobacillus</i> sp. ME27a	Leite bovino	0.98 g/L - 2.68 g/L	Atividades antioxidantes, antibacterianas (<i>B. cereus</i> , <i>Salmonella</i> Typhi, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>), antibiofilme, antiinflamatórias e emulsificantes	Tarannum et al. (2023)
<i>L. helveticus</i> LZ-R-5	Kefir tibetano	128,07 mg/L	Atividade imunoestimulatória	You et al. (2020)
<i>L. plantarum</i> MY04	Pimentões em conserva, chucrute, leques de leite, presunto, sopa azeda, molho de pimenta, feijão azedo, brotos de bambu azedos, picles e molho de soja	1,15 g/L	Atividade probiótica	Lu et al. (2023)
<i>W. confusa</i> YKDIA1 e <i>W. confusa</i> YKDIA4	Bebida fermentada nigeriana	11,93 g/L - 11,70 g/L	Melhora das propriedades reológicas, como aumento da viscosidade e da capacidade de retenção de água	Ogunremi et al. (2022)
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> KCTC 14626BP	Leite materno humano	0,611 g/L	Capacidade antimicrobiana, antioxidantes e prebióticos	Vijayalakshmi et al. (2023)
<i>L. rhamnosus</i> SHA113	Leite materno humano	$4,9 \times 10^4$ Da	Previne e trata a úlcera gástrica alcoólica, regulando o equilíbrio da flora da mucosa gástrica	Yang et al. (2023)

Outros metabólitos gerados por BAL merecem destaque, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor (Galli et al., 2022; Sharma et al., 2021; Zhuo et al., 2023). Este ácido tem ganhado atenção devido aos seus potenciais benefícios, pois pode exercer efeitos positivos no sistema cardiovascular e nervoso, auxiliar no controle da asma e exibir propriedades com potencial ação antidiabética (Diez-Gutiérrez et al., 2020).

Adicionalmente, a atividade lipolítica das BAL é de extrema relevância no que diz respeito à produção de metabólitos, pois promove a liberação de ácidos graxos livres, precursores de sabor (Hosken et al., 2023), além de inibir a peroxidação lipídica, melhorando a qualidade do produto (Xia et al., 2023). Por outro lado, a alta atividade proteolítica desses microrganismos pode influenciar as características funcionais dos alimentos devido à produção de peptídeos bioativos, mas também consegue modificar o perfil sensorial do produto, já que os aminoácidos livres liberados durante esse processo podem ser transformados em outros compostos, como álcoois, aldeídos, ácidos ou ésteres (Chai et al., 2020; Fidan et al., 2022; Hosken et al., 2023).

5.2. PROBIÓTICOS E SAÚDE INTESTINAL

A microbiota intestinal, composta por uma vasta quantidade de microrganismos, que colonizam e mantêm um sistema estável no intestino (Tang et al., 2023; Zielińska & Kolożyn-Krajewska, 2018). Quando essa estabilidade é perturbada por antibióticos, patógenos ou outros fatores, pode causar desequilíbrios na microbiota, afetando funções fisiológicas como o sistema endócrino e o digestivo (Tang et al., 2023). Portanto, o consumo adequado de probióticos, como BAL, é essencial, já que estes são capazes de restaurar o equilíbrio da microbiota intestinal, alterando a sua composição e promovendo a sua estabilidade (Hosken et al., 2023; Mora-Villalobos et al., 2020; Raj et al., 2022; Tang et al., 2023; Wieërs et al., 2020; Zielińska & Kolożyn-Krajewska, 2018). Diversas cepas de BAL são usadas comercialmente como probióticas e são conhecidas por apresentarem efeitos benéficos à saúde dos consumidores (Erginkaya & Konuray-Altun, 2022).

Os metabólitos antimicrobianos produzidos pelos probióticos, como exopolissacarídeo, biosurfactantes, bacteriocinas e ácidos orgânicos, auxiliam na redução do número de bactérias patogênicas na microbiota intestinal. Ainda, os ácidos orgânicos gerados durante a fermentação no organismo tornam o ambiente mais ácido, o que ajuda a inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (Mora-Villalobos et al., 2020; Tang et al., 2023). Não se limitando apenas às suas propriedades antimicrobianas, os probióticos também são conhecidos por

estimulem o sistema imunológico, promovendo a secreção de anticorpos nas células hospedeiras. A resposta imune pode ser avaliada por meio da co-cultura de probióticos com células animais, permitindo a detecção e medição de citocinas, quimiocinas, e outros marcadores inflamatórios (Mora-Villalobos et al., 2020; Yang et al., 2023).

Nos últimos anos, o potencial probiótico das BAL foi demonstrado por diversos estudos com diversas propriedades benéficas à saúde. Soleimani et al. (2023), apresentaram quatro cepas isoladas de Duimaj, um lanche à base de cereais que é popular nas regiões noroeste do Irã, incluindo *L. plantarum* Z3, *L. plantarum* Z10, *L. plantarum* Z25 e *L. pentosus* Z21, exibindo propriedades probióticas interessantes, como atividade antagônica, agregação, hidrofobicidade e propriedades de absorção e redução do colesterol. Em estudo feito por Zhao et al. (2023a), foi verificado que o *L. fermentum* NCU003018 pode ser usado como um candidato promissor na prevenção e tratamento da hiperuricemia, um fator de risco para gota, doença renal crônica, doenças cardiovasculares e diabetes. Enquanto Li et al. (2023a), demonstraram que *L. rhamnosus* S51, *L. plantarum* S184 e *L. fermentum* S7 são cepas probióticas de BAL que apresentaram potencial antiobesidade e antioxidante. Outros resultados também apontaram que BAL probióticas aumentam a imunidade (Jeong et al., 2023; Lee et al., 2022).

5.3. POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIFÚNGICO

Os avanços na biopreservação são resultado da crescente preocupação dos consumidores com a segurança e a qualidade dos alimentos, levando à rejeição de aditivos químicos (Bangar et al., 2021; Barcenilla et al., 2022). Antimicrobianos naturais, como bactérias benéficas e seus metabólitos, estão sendo estudados como formas potenciais de melhorar a segurança alimentar e prolongar a vida útil (Barcenilla et al., 2022). As BAL destacam-se pela sua capacidade de produzir metabólitos com atividade antimicrobianas, incluindo ácidos orgânicos, ácidos graxos, ácidos carboxílicos, diacetil, peptídeos bioativos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, lactonas, álcoois e reuterina (3-hidroxi-propionaldeído) (Fidan et al., 2022).

Os peptídeos bioativos sintetizados ribossomicamente, produzidos e liberados extracelularmente por BAL são denominados de bacteriocinas (Raj et al., 2022). Estas possuem uma notável atividade antimicrobiana, sendo capazes de inibir uma ampla gama de bactérias, incluindo microrganismos taxonomicamente próximos ou aqueles não relacionados taxonomicamente (Hosken et al., 2023). As bacteriocinas atuam na membrana citoplasmática

das bactérias, causando a ruptura das vesículas membranosas, uma função que pode ser vantajosa quando se utilizam LAB para direcionar um patógeno sensível específico (Tang et al., 2023). Nisina, bacteriocina mais estudada e frequentemente empregada, é produzida por cepas de *L. lactis* e é reconhecida como um conservante amplamente utilizado na indústria alimentícia, devido ao seu amplo espectro de ação antimicrobiana e sua capacidade de degradação por enzimas digestivas (Hosken et al., 2023; Qiao et al., 2022; Tang et al., 2023).

Produzindo metabólitos com efeitos antimicrobianos, as BAL têm efeito bacteriostático e bactericida, pois desestabilizam a membrana celular do patógeno, inibe a síntese enzimática, interfere nos gradientes de prótons e induz a formação de espécies reativas de oxigênio durante o crescimento e a fermentação. Consequentemente, a alteração do pH do meio, resultante da produção de ácidos durante o metabolismo das BAL, causa uma permeabilidade da membrana que leva ao extravasamento do conteúdo celular e à lise celular, resultando na morte do patógeno (Coban, 2020; Mgomi et al., 2023; Zapašnik et al., 2022). Recentemente, estudos demonstraram o efeito dos diversos compostos antimicrobianos produzidos pelas BAL, como destacado na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana e antifúngica de sobrenadantes livres de células e compostos produzidos por BAL

Microrganismo	Matriz alimentar	Composto antimicrobiano	Microrganismo alvo	Referência
<i>L. lactis</i>	Quesillo e queijo cremoso duplo	Sobrenadantes livres de células	<i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Durango-Zuleta et al. (2022)
<i>L. plantarum</i> PAN01 e UFG 121	Kiwi recém cortado	Sobrenadantes livres de células	<i>Botrytis cinerea</i> CECT 20973	De Simone et al. (2021)
<i>Lactobacillus brevis</i> 2-392, <i>L. plantarum</i> 1-399 e <i>Enterococcus faecalis</i> (1-37, 2-49, 2-388 e 1-400)	Microqueijos artesanais Minas frescos e semiduros	Células como cultura adjunta	<i>L. monocytogenes</i> e <i>S. enterica</i>	Campagnollo et al. (2022)
<i>L. plantarum</i> NRRL B-4496	Carne bovina fresca	Sobrenadantes livres de células	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i>	Arrijoja-Bretón et al. (2020)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 147	Queijo fresco	Revestimentos de quitosana mais sobrenadante parcialmente purificado e livre de células	<i>L. monocytogenes</i>	Jutinico-Shubach et al. (2020)

<i>L. lactis</i> L54	Queijo Beyaz	Nisina L54	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644, Zhang et al. (2023) <i>S. aureus</i> ATCC 43300 e <i>B. cereus</i> ATCC 33019	
<i>Weissella confusa</i> W5, W8, <i>Weissella paramesenteroides</i> W9, <i>Weissella cibaria</i> W25 e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Q4C3	Matriz de queijo simulada	Sobrenadantes livres de células	<i>Aspergillus niger</i> IOC 207 e <i>Penicillium chrysogenum</i> IOC 132	Souza et al. (2023)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> B2 e <i>Lactiplantibacillus</i> B4	Queijo macio	Células como cultura adjunta	<i>L. monocytogenes</i>	Martín et al. (2022)
<i>L. lactis</i> A17	Leite pasteurizado	Bacteriocina RSQ01	<i>Salmonella</i> Enteritidis CMCC(B)50335, <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 13312, <i>L. monocytogenes</i> CICC54002 e <i>S. aureus</i> CICC10145	
<i>Carnobacterium divergens</i> 468 e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 68	Salmão fresco	Sobrenadantes livres de células	<i>L. innocua</i>	Stupar et al. (2023)

<i>Latilactobacillus sakei</i> 205	Alimentos tradicionais amadurecidos	Bacteriocina	<i>L. monocytogenes</i>	Martín et al. (2023)
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917	Carne moída	Nanocelulose bacteriana com célula BAL liofilizada	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	Yordshahi et al. (2020)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> S61	Azeitona verde fermentada tradicional	Ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, etanol, peróxido de hidrogênio e diacetil	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Candida pelliculosa</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>A. niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117, <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar. <i>Enteritidis</i> ATCC 14028, <i>S. aureus</i> ATCC 6538 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 49189	Abouloifa et al. (2022)
<i>L. paracasei</i> XLK 401	Fermentos de mirtilo Aodong produzidos em Jilin, China	33 ácidos orgânicos	<i>S. aureus</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> B, <i>E. coli</i> O157 e <i>Shigella flexneri</i>	Xin et al. (2024)
<i>Lactococcus hircilactis</i> CH4, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> GRIPUMSK, <i>Lactobacillus johnsonii</i> PUMSKGRI e	Queijo, coalhada, água de arroz fermentada, iogurte e	Exopolissacarídeos peróxido de hidrogênio e β -galactosidase	<i>Streptococcus pyogenes</i> (MTCC 442), <i>Enterococcus faecalis</i> (MTCC 439), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (MTCC 432) e	Srinivash et al. (2023)

Lactobacillus leichmannii
SKGRIPUM

leitelho de diferentes
regiões da Índia

Shigella flexneri (MTCC 1457) e
dois patógenos fúngicos, como
Candida albicans (MTCC 3017)
e *Aspergillus fumigatus* (MTCC
2550)

6. PERSPECTIVAS

Diversos alimentos são considerados fontes de BAL, principalmente alimentos fermentados ou derivados lácteos (Mora-Villalobos et al., 2020; Woraprayote et al., 2023), representando opções potenciais para exploração industrial. A utilização de BAL como culturas iniciadoras na produção de alimentos tem incentivado pesquisas voltadas para o isolamento, identificação e caracterização, uma vez que esses microrganismos possibilitam a otimização das características físico-químicas e a qualidade dos produtos (Zhao et al., 2023).

Apesar disso, ainda existem desafios a serem superados no que diz respeito a essas etapas. Para um crescimento ideal, as BAL demonstram especificidade em relação às condições do meio em que são cultivadas, graças à sua natureza fastidiosa, requerendo um ambiente rico em nutrientes e que satisfaça seus requisitos essenciais durante o seu isolamento. Com isso, os meios começaram a ser suplementados com fontes de nitrogênio, minerais e tampões, além de fontes de carbono, o que ocasiona um aumento nos custos e acaba envolvendo etapas específicas de preparação (Hayek et al., 2019). Uma solução inteligente é investigar o uso de ingredientes inovadores nos meios de cultivo que reduzam despesas e promovam a sustentabilidade através da reutilização de produtos descartados.

Em relação à etapa de identificação, foram desenvolvidas diversas ferramentas destinadas a essa finalidade. Além dos métodos fenotípicos tradicionais, o uso de técnicas moleculares ampliou as opções de tipagem. No entanto, ferramentas de tipagem mais sofisticadas só estão disponíveis em laboratórios bem equipados e bem treinados, o que dificulta o acesso a quem possui menos recursos (Sharma et al., 2020). Assim, nos próximos anos, é fundamental avançar no desenvolvimento de técnicas que sejam mais acessíveis, rápidas, econômicas e que proporcionem alta precisão na identificação de BAL.

Ademais, para que uma determinada cepa de BAL se transforme em um produto para a indústria, outras etapas críticas relacionadas à sua caracterização devem ser realizadas, como a detecção de propriedades promotoras da saúde e a avaliação da segurança (Abarquero et al., 2023; Grujović et al., 2022). As BAL são fortemente conhecidas pela sua função probiótica, mas os metabólitos bioativos liberados nos alimentos também estão ganhando espaço devido aos benefícios proporcionados à saúde dos consumidores. A expansão do conhecimento sobre a diversidade de compostos produzidos por novas cepas de BAL pode ser viabilizada através de seu isolamento e caracterização, gerando novas perspectivas para aplicações.

A realização de ensaios clínicos randomizados em seres humanos é essencial e necessita receber maior ênfase no futuro para estabelecer as condições ideais de utilização desses microrganismos e seus metabólitos, incluindo níveis/doses de consumo, escolha das cepas e da matriz alimentar, já que os dados relacionados a esse tópico ainda parecem estar predominantemente baseados em estudos experimentais e modelos (Ağagündüz et al., 2022). Em contrapartida, estudos relacionados à prevenção e tratamento de doenças quando as BAL são utilizadas como probióticos devem acontecer com maior frequência nos próximos anos, como é o caso da COVID-19 (Olaimat et al., 2020), de alergias alimentares (Guo et al., 2023) ou distúrbios gastrointestinais (Aburjaile et al., 2022).

A aplicação de BAL e seus metabólitos como bioprotetores e bioconservantes é outra área aberta ao desenvolvimento. Pesquisas que foquem na aplicação sinérgica ou aditiva de compostos produzidos por esses microrganismos com diferentes agentes antimicrobianos devem ser aprofundadas, assim como a análise de seus efeitos em combinação com diferentes sistemas de embalagem, visando melhorar a segurança alimentar de muitos produtos alimentares e prolongar a vida útil dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- Abarquero, D., Bodelón, R., Flórez, A. B., Fresno, J. M., Renes, E., Mayo, B., & Tornadijo, M. E. (2023). Technological and safety assessment of selected lactic acid bacteria for cheese starter cultures design: Enzymatic and antimicrobial activity, antibiotic resistance and biogenic amine production. *LWT*, *180*, 114709. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114709>
- Abarquero, D., Renes, E., Combarros-Fuertes, P., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2022). Evaluation of technological properties and selection of wild lactic acid bacteria for starter culture development. *LWT*, *171*, 114121. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.114121>
- Abdel-Nasser, A., Hathout, A. S., Badr, A. N., Barakat, O. S., & Fathy, H. M. (2023). Extraction and characterization of bioactive secondary metabolites from lactic acid bacteria and evaluating their antifungal and antiaflatoxic activity. *Biotechnology Reports*, *38*, e00799. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2023.E00799>
- Abdullah, D., Poddar, S., Rai, R. P., Purwati, E., Dewi, N. P., & Pratama, Y. E. (2021). Molecular identification of lactic acid bacteria an approach to sustainable food security. *Journal of public health research*, *10*(s2). <https://doi.org/10.4081/jphr.2021.2508>
- Abouloifa, H., Rokni, Y., Hasnaoui, I., Bellaouchi, R., Gaamouche, S., Ghabbour, N., Karboune, S., Ben Salah, R., Brasca, M., D'hallewin, G., Saalaoui, E., & Asehrou, A. (2022). Characterization of antimicrobial compounds obtained from the potential probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* S61 and their application as a biopreservative agent. *Brazilian Journal of Microbiology*, *53*(3), 1501–1513. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00791-5>
- Aburjaile, F. F., de Jesus, L. C. L., da Silva, T. F., Drumond, M. M., de Oliveira Carvalho, R. D., Azevedo, V., & Mancha-Agresti, P. D. C. (2022). Lactic acid bacteria in gut microbiota, probiotics and disease prevention. *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology: Innovations and Functional Aspects*, 207–219. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89875-1.00001-8>
- Adikari, A. M. M. U., Priyashantha, H., Disanayaka, J. N. K., Jayatileka, D. V., Kodithuwakku, S. P., Jayatilake, J. A. M. S., & Vidanarachchi, J. K. (2021). Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus* species diversity from Meekiri: traditional fermented buffalo milk gels in Sri Lanka. *Heliyon*, *7*(10), e08136. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E08136>
- A dugna, M., & Andualem, B. (2023). Isolation, characterization and safety assessment of probiotic lactic acid bacteria from metata ayib (Traditional spiced cottage cheese). *Food and Humanity*, *1*, 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.FOOHUM.2023.05.002>
- Afreen, A., Ahmed, Z., Khalid, N., Ferheen, I., & Ahmed, I. (2023). Optimization and cholesterol-lowering activity of exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus paraplantarum* NCCP 962. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *107*(4), 1189–1204. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12372-z>
- Ağgündüz, D., Şahin, T. Ö., Ayten, Ş., Yılmaz, B., Güneşliol, B. E., Russo, P., Spano, G., & Özogul, F. (2022). Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-

- promoting cultures in the dairy food industry. *Food Bioscience*, *47*, 101617. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101617>
- Aka, S., Dridi, B., Bolotin, A., Yapo, E. A., Koussemon-Camara, M., Bonfoh, B., & Renault, P. (2020). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a traditional Ivoirian beer process to develop starter cultures for safe sorghum-based beverages. *International Journal of Food Microbiology*, *322*, 108547. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108547>
- Akman, P. K., Ozulku, G., Tornuk, F., & Yetim, H. (2021). Potential probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented gilaburu and shalgam beverages. *LWT*, *149*, 111705. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111705>
- Albayrak, Ç. B., & Duran, M. (2021). Isolation and characterization of aroma producing lactic acid bacteria from artisanal white cheese for multifunctional properties. *LWT*, *150*, 112053. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112053>
- Altakhis, M., Pillidge, C. J., Osborn, A. M., Torley, P. J., & Kaur, M. (2021). Assessment of the potential use of MALDI-TOF MS for the identification of bacteria associated with chilled vacuum-packaged lamb meat. *Meat Science*, *177*, 108508. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2021.108508>
- Aman, M., Aneeqha, N., Bristi, K., Deeksha, J., Afza, N., Sindhuja, V., & Shastry, R. P. (2021). Lactic acid bacteria inhibits quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* strain JUPG01 isolated from rancid butter. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *36*, 102115. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2021.102115>
- Aplakidou, E., Vergoulidis, N., Chasapi, M., Venetsianou, N. K., Kokoli, M., Panagiotopoulou, E., Iliopoulos, I., Karatzas, E., Pafilis, E., Georgakopoulos-Soares, I., Kyripides, N. C., Pavlopoulos, G. A., & Baltoumas, F. A. (2024). Visualizing metagenomic and metatranscriptomic data: A comprehensive review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *23*, 2011–2033. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2024.04.060>
- Arrijoja-Bretón, D., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control*, *115*, 107286. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2020.107286>
- Ashfaq, M. Y., Da'na, D. A., & Al-Ghouti, M. A. (2022). Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, *305*, 114359. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.114359>
- Ayivi, R. D., & Ibrahim, S. A. (2022). Lactic acid bacteria: an essential probiotic and starter culture for the production of yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*, *57*(11), 7008–7025. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16076>
- Ayivi, R. D., Ibrahim, S. A., Krastanov, A., Somani, A., & Siddiqui, S. A. (2022). The impact of alternative nitrogen sources on the growth and viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, *105*(10), 7986–7997. <https://doi.org/10.3168/JDS.2022-21971>

- Bangar, S. P., Sharma, N., Kumar, M., Ozogul, F., Purewal, S. S., & Trif, M. (2021). Recent developments in applications of lactic acid bacteria against mycotoxin production and fungal contamination. *Food Bioscience*, *44*, 101444. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.101444>
- Barcenilla, C., Ducic, M., López, M., Prieto, M., & Álvarez-Ordóñez, A. (2022). Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Science*, *183*, 108661. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2021.108661>
- Belleggia, L., Ferrocino, I., Rita Corvaglia, M., Cesaro, C., Milanović, V., Cardinali, F., Garofalo, C., Cocolin, L., Aquilanti, L., & Osimani, A. (2022). Profiling of autochthonous microbiota and characterization of the dominant lactic acid bacteria occurring in fermented fish sausages. *Food Research International*, *154*, 110990. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.110990>
- Bibi, A., Xiong, Y., Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Radicetti, E., Umair, M., Shoukat, M., Khan, M. K. I., & Aadil, R. M. (2021). Recent Advances in the Production of Exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus* spp. and Its Application in the Food Industry: A Review. *Sustainability*, *13*(22), 12429. <https://doi.org/10.3390/su132212429>
- Bisson, G., Comuzzi, C., Giordani, E., Poletti, D., Boaro, M., & Marino, M. (2023). An exopolysaccharide from *Leuconostoc mesenteroides* showing interesting bioactivities versus foodborne microbial targets. *Carbohydrate Polymers*, *301*, 120363. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2022.120363>
- BRASIL. (2018). Resolução RDC N° 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança de alimentos novos e novos ingredientes. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 30 jul. 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018>.
- Çakır, E., Arıcı, M., & Durak, M. Z. (2020). Biodiversity and techno-functional properties of lactic acid bacteria in fermented hull-less barley sourdough. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *130*(5), 450–456. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2020.05.002>
- Caldeira, L. A., Valente, G. L. C., Barbosa, C. D., Braga, D. E., Monção, F. P., Fonseca, L. M., Souza, M. R., & Gloria, M. B. A. (2024). Profile of lactic acid bacteria (MALDI-TOF-MS) and physico-chemical and microbiological characteristics of the raw milk and fresh artisanal cheese from Serra Geral, Minas Gerais, Brazil. *Food Research International*, *176*, 113831. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2023.113831>
- Campagnollo, F. B., Pedrosa, G. T. S., Kamimura, B. A., Furtado, M. M., Baptista, R. C., Nascimento, H. M., Alvarenga, V. O., Magnani, M., & Sant'Ana, A. S. (2022). Growth potential of three strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in Frescal and semi-hard artisanal Minas microcheeses: Impact of the addition of lactic acid bacteria with antimicrobial activity. *LWT*, *158*, 113169. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.113169>
- Chai, K. F., Voo, A. Y. H., & Chen, W. N. (2020). Bioactive peptides from food fermentation: A comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(6), 3825–3885. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12651>

- Chen, H., Ju, H., Wang, Y., Du, G., Yan, X., Cui, Y., Yuan, Y., & Yue, T. (2021). Antifungal activity and mode of action of lactic acid bacteria isolated from kefir against *Penicillium expansum*. *Food Control*, *130*, 108274. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108274>
- Chen, O., Hong, Y., Ma, J., Deng, L., Yi, L., & Zeng, K. (2021). Screening lactic acid bacteria from pickle and cured meat as biocontrol agents of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. *Biological Control*, *158*, 104606. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2021.104606>
- Chourasia, R., Kumari, R., Singh, S. P., Sahoo, D., & Rai, A. K. (2022). Characterization of native lactic acid bacteria from traditionally fermented chhurpi of Sikkim Himalayan region for the production of chhurpi cheese with enhanced antioxidant effect. *LWT*, *154*, 112801. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112801>
- Coban, H. B. (2020). Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *43*(4), 569–591. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>
- Daba, G. M., & Elkhateeb, W. A. (2020). Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *28*, 101750. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101750>
- De Pasquale, I., Pontonio, E., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2020). Nutritional and functional effects of the lactic acid bacteria fermentation on gelatinized legume flours. *International Journal of Food Microbiology*, *316*, 108426. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108426>
- De Simone, N., Capozzi, V., de Chiara, M. L. V., Amodio, M. L., Brahim, S., Colelli, G., Drider, D., Spano, G., & Russo, P. (2021). Screening of Lactic Acid Bacteria for the Bio-Control of *Botrytis cinerea* and the Potential of *Lactiplantibacillus plantarum* for Eco-Friendly Preservation of Fresh-Cut Kiwifruit. *Microorganisms*, *9*(4), 773. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040773>
- Demirci, T., Akin, N., Sözeri Atik, D., Rabia Özkan, E., Dertli, E., & Akyol, İ. (2021). Lactic acid bacteria diversity and dynamics during ripening of traditional Turkish goatskin Tulum cheese produced in Mut region assessed by culturing and PCR-DGGE. *LWT*, *138*, 110701. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110701>
- Dentice Maidana, S., Aristimuño FicoSeco, C., Bassi, D., Cocconcelli, P. S., Puglisi, E., Savoy, G., Vignolo, G., & Fontana, C. (2020). Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented chia sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, *316*, 108425. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108425>
- Diez-Gutiérrez, L., San Vicente, L., Luis, L. J., Villarán, M. del C., & Chávarri, M. (2020). Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market. *Journal of Functional Foods*, *64*, 103669. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.103669>

- Dimitrov, Zh. (2019). Assessment of lactobacillus bulgaricus strain in human intestinal samples by denaturation gradient gel electrophoresis. *Trakia Journal of Sciences*, 17(4), 312–317. <https://doi.org/10.15547/tjs.2019.04.003>
- Durango-Zuleta, M. M., Fuentes-Vanegas, M., Sepúlveda-Valencia, J. U., & Moreno Herrera, C. X. (2022). Isolation, identification, and antimicrobial activity of lactic acid bacteria associated with two traditional Colombian types of cheese: Quesillo and double-cream cheese. *LWT*, 171, 114119. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.114119>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2007). Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA J*, 516. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587>
- EFSA (European Food Safety Authority). Qualified presumption of safety (QPS). Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/applications/qps-assessment>. Acesso em 14 de setembro de 2024.
- Erginkaya, Z., & Konuray-Altun, G. (2022). Potential biotherapeutic properties of lactic acid bacteria in foods. *Food Bioscience*, 46, 101544. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101544>
- European Union. (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Consolidated version as of 26 July 2019). Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02003R1831-20190726>
- Fidan, H., Esatbeyoglu, T., Simat, V., Trif, M., Tabanelli, G., Kostka, T., Montanari, C., Ibrahim, S. A., & Özogul, F. (2022). Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: Facts and gaps. *Food Bioscience*, 47, 101741. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101741>
- Fiocco, D., Longo, A., Arena, M. P., Russo, P., Spano, G., & Capozzi, V. (2020). How probiotics face food stress: They get by with a little help. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), 1552–1580. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1580673>
- Fossi, B. T., Ekabe, D. E., Toukam, L. L., Tatsilong Pambou, H. O., Gagneux-Brunon, A., Nkenfou Nguefeu, C., & Bongue, B. (2022). Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional cameronian palm wine and corn beer exhibiting cholesterol lowering activity. *Heliyon*, 8(11), e11708. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2022.E11708>
- Food and Drug Administration (FDA). Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). Disponível em: <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list>. Acesso em 14 de setembro de 2024.
- Food and Drug Administration (FDA). (2023). Generally Recognized as Safe (GRAS) – 21 CFR Part 170, Subpart E. 21 C.F.R. § 170.203-285 (2023). <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>

- Franz, C. M. A. P., Cho, G., Holzapfel, W. H., & Gálvez, A. (2010). Safety of Lactic Acid Bacteria. Em *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch19>
- Galli, V., Venturi, M., Mari, E., Guerrini, S., & Granchi, L. (2022). Gamma-aminobutyric acid (GABA) production in fermented milk by lactic acid bacteria isolated from spontaneous raw milk fermentation. *International Dairy Journal*, *127*, 105284. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2021.105284>
- Gantzias, C., Lappa, I. K., Aerts, M., Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Papadimitriou, K., De Brandt, E., Tsakalidou, E., & Vandamme, P. (2020). MALDI-TOF MS profiling of non-starter lactic acid bacteria from artisanal cheeses of the Greek island of Naxos. *International Journal of Food Microbiology*, *323*, 108586. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108586>
- Gnanaprakash, J., Jabastin, J., Vijayasarathy, M., Rajendran, S., & Devi, P. B. (2023). Functional traits of Selenium accumulating lactic acid bacteria as a probiont from fermented foods of an Indian tribal community. *Journal of Agriculture and Food Research*, *12*, 100601. <https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2023.100601>
- Goa, T., Beyene, G., Mekonnen, M., & Gorems, K. (2022). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermented Milk Produced in Jimma Town, Southwest Ethiopia, and Evaluation of their Antimicrobial Activity against Selected Pathogenic Bacteria. *International Journal of Food Science*, *2022*, 2076021. <https://doi.org/10.1155/2022/2076021>
- Gopal, P. K. (2022). Bacteria, Beneficial: Probiotic Lactic Acid Bacteria: An Overview. Em *Encyclopedia of Dairy Sciences* (p. 32–33). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00018-0>
- Grujović, M. Ž., Mladenović, K. G., Semedo-Lemsaddek, T., Laranjo, M., Stefanović, O. D., & Kocić-Tanackov, S. D. (2022). Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: Potential use as starters or probiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *21*(2), 1537–1567. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12897>
- Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Silva, R., Rocha, R. S., Graça, J. S., Esmerino, E. A., Silva, M. C., Sant’Ana, A. S., Duarte, M. C. K. H., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G. (2020). Impact of probiotics and prebiotics on food texture. *Current Opinion in Food Science*, *33*, 38–44. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2019.12.002>
- Güley, Z., Fallico, V., & Beresford, T. (2022). Modification of fast-slow differential agar medium for selective isolation of potential starter lactic acid bacteria from cheese. *MethodsX*, *9*, 101922. <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2022.101922>
- Güley, Z., Fallico, V., Cabrera-Rubio, R., Cotter, P. D., & Beresford, T. (2022). Identification of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* as the species primarily responsible for acid production in Izmir Brined Tulum Cheese from the Aegean Region of Türkiye. *Food Research International*, *160*, 111707. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111707>

- Guo, Z. H., Wang, Q., Zhao, J. H., Xu, Y. P., Mu, G. Q., & Zhu, X. M. (2023). Lactic acid bacteria with probiotic characteristics in fermented dairy products reduce cow milk allergy. *Food Bioscience*, *55*, 103055. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.103055>
- Gupta, S., Mohanty, U., & Majumdar, R. K. (2021). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented fish product Shidal of India with reference to their probiotic potential. *LWT*, *146*, 111641. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111641>
- Hayek, S. A., Gyawali, R., Aljaloud, S. O., Krastanov, A., & Ibrahim, S. A. (2019). Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Em Journal of Dairy Research* (Vol. 86, Número 4). <https://doi.org/10.1017/S002202991900075X>
- Hosken, B. de O., Melo Pereira, G. V., Lima, T. T. M., Ribeiro, J. B., Magalhães Júnior, W. C. P. de, & Martin, J. G. P. (2023). Underexplored Potential of Lactic Acid Bacteria Associated with Artisanal Cheese Making in Brazil: Challenges and Opportunities. *Fermentation*, *9*(5), 409. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050409>
- Hu, Y., Tian, Y., Zhu, J., Wen, R., Chen, Q., & Kong, B. (2022). Technological characterization and flavor-producing potential of lactic acid bacteria isolated from traditional dry fermented sausages in northeast China. *Food Microbiology*, *106*, 104059. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2022.104059>
- Huang, W., Dong, A., Pham, H. T., Zhou, C., Huo, Z., Wätjen, A. P., Prakash, S., Bang-Berthelsen, C. H., & Turner, M. S. (2023). Evaluation of the fermentation potential of lactic acid bacteria isolated from herbs, fruits and vegetables as starter cultures in nut-based milk alternatives. *Food Microbiology*, *112*, 104243. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2023.104243>
- Islam, M. Z., Uddin, M. E., Rahman, M. T., Islam, M. A., & Harun-ur-Rashid, M. (2021). Isolation and characterization of dominant lactic acid bacteria from raw goat milk: Assessment of probiotic potential and technological properties. *Small Ruminant Research*, *205*, 106532. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2021.106532>
- Javed, G. A., Arshad, N., Munir, A., Khan, S. Y., Rasheed, S., & Hussain, I. (2022). Signature probiotic and pharmacological attributes of lactic acid bacteria isolated from human breast milk. *International Dairy Journal*, *127*, 105297. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2021.105297>
- Jeong, H., Kim, S., Hwang, U.-S., Choi, H., & Park, Y.-S. (2023). Immunostimulatory Activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CAB701 Isolated from Jeju Cabbage. *Microorganisms*, *11*(7), 1718. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071718>
- Jeong, S., Kwon, A., Jeong, H., & Park, Y.-S. (2023). Synergistic Immunostimulatory Activities of Probiotic Strains, *Leuconostoc lactis* and *Weissella cibaria*, and the Prebiotic Oligosaccharides They Produce. *Microorganisms*, *11*(5), 1354. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051354>
- Jin, Y., Luo, B., Cai, J., Yang, B., Zhang, Y., Tian, F., & Ni, Y. (2021). Evaluation of indigenous lactic acid bacteria of raw mare milk from pastoral areas in Xinjiang, China, for potential use in probiotic fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, *104*(5), 5166–5184. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-19398>

- Jitpakdee, J., Kantachote, D., Kanzaki, H., & Nitoda, T. (2021). Selected probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented foods for functional milk production: Lower cholesterol with more beneficial compounds. *LWT*, *135*, 110061. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110061>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications*, *10*(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jutinico-Shubach, A., Gutiérrez-Cortés, C., & Suarez, H. (2020). Antilisterial activity of chitosan-based edible coating incorporating cell-free supernatant from *Pediococcus pentosaceus* 147 on the preservation of fresh cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(9). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14715>
- Kang, W., Pan, L., Peng, C., Dong, L., Cao, S., Cheng, H., Wang, Y., Zhang, C., Gu, R., Wang, J., & Zhou, H. (2020). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk. *Journal of Dairy Science*, *103*(11), 9980–9991. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-18704>
- Kavitake, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., & Shetty, P. H. (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. *Food Bioscience*, *21*, 34–44. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2017.11.003>
- Korcz, E., & Varga, L. (2021). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 375–384. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.02.014>
- Lee, J., Kim, S., & Kang, C.-H. (2022). Screening and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria with Potential Immunostimulatory Activity Isolated from Kimchi. *Fermentation*, *9*(1), 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010004>
- Lee, M., Kim, D., Ji Choi, E., Hee Song, J., Yong Kang, J., Won Lee, K., & Yoon Chang, J. (2023). Transcriptome responses of lactic acid bacteria isolated from kimchi under hydrogen peroxide exposure. *Food Research International*, *168*, 112681. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2023.112681>
- Lee, Y., Cho, Y., Kim, E., Kim, H.-J., & Kim, H.-Y. (2018). Identification of lactic acid bacteria in galchi- and myeolchi-jeotgalby 16S rRNA sequencing, MALDI TOF mass spectrometry, and PCR-DGGE. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(7), 1112–1121. <https://doi.org/10.4014/jmb.1803.03034>
- Łepecka, A., Szymański, P., Okoń, A., & Zielińska, D. (2023). Antioxidant activity of environmental lactic acid bacteria strains isolated from organic raw fermented meat products. *LWT*, *174*, 114440. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114440>
- Li, K., Gu, Q., Yang, W., & Yu, X. (2023). In vitro screening and probiotic evaluation of anti-obesity and antioxidant lactic acid bacteria. *Food Bioscience*, *54*, 102844. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102844>

- Li, L., Zhang, L., Zhang, T., Liu, Y., Lü, X., Kuipers, O. P., & Yi, Y. (2023). (Meta)genomics - assisted screening of novel antibacterial lactic acid bacteria strains from traditional fermented milk from Western China and their bioprotective effects on cheese. *LWT*, *175*, 114507. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114507>
- Liu, S., Li, Y., Song, X., Hu, X., He, Y., Yin, J., Nie, S., & Xie, M. (2023). Changes in volatile and nutrient components of mango juice by different Lactic acid bacteria fermentation. *Food Bioscience*, 103141. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.103141>
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. *Em Lactic Acid Bacteria* (p. 103–203). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0_2
- Lu, J., Mao, Y., Ma, T., Liu, X., Cheng, X., Bai, Y., & Li, S. (2023). Screening and genome analysis of lactic acid bacteria with high exopolysaccharide production and good probiotic properties. *Food Bioscience*, *56*, 103211. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.103211>
- Mala, A., Bhassu, S., Taufek, N. M., Sadali, N. M., Wang, S., Mohamed, E., & Nor, A. M. (2023). Review: Potential of using lactic acid bacteria as inoculant for seaweed silage towards sustainable aquaculture. *Aquaculture Reports*, *28*, 101440. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2022.101440>
- Manovina, M., Thamarai Selvi, B., Prathiviraj, R., & Selvin, J. (2022). Potential probiotic properties and molecular identification of lactic acid Bacteria isolated from fermented millet porridge or ragi koozh and jalebi batter. *Animal Gene*, *26*, 200134. <https://doi.org/10.1016/J.ANGEN.2022.200134>
- Mantegazza, G., Dalla Via, A., Licata, A., Duncan, R., Gardana, C., Gargari, G., Alamprese, C., Arioli, S., Taverniti, V., Karp, M., & Guglielmetti, S. (2023). Use of kefir-derived lactic acid bacteria for the preparation of a fermented soy drink with increased estrogenic activity. *Food Research International*, *164*, 112322. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.112322>
- Margalho, L. P., Feliciano, M. D. E., Silva, C. E., Abreu, J. S., Piran, M. V. F., & Sant'Ana, A. S. (2020). Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis. *Journal of Dairy Science*, *103*(9), 7908–7926. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-18194>
- Margalho, L. P., Kamimura, B. A., Brexó, R. P., Alvarenga, V. O., Cebeci, A. S., Janssen, P. W. M., Dijkstra, A., Starrenburg, M. J. C., Sheombarsing, R. S., Cruz, A. G., Alkema, W., Bachmann, H., & Sant'Ana, A. S. (2021). High throughput screening of technological and biopreservation traits of a large set of wild lactic acid bacteria from Brazilian artisanal cheeses. *Food Microbiology*, *100*, 103872. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2021.103872>
- Martín, I., Barbosa, J., Pereira, S. I. A., Rodríguez, A., Córdoba, J. J., & Teixeira, P. (2023). Study of lactic acid bacteria isolated from traditional ripened foods and partial characterization of their bacteriocins. *LWT*, *173*, 114300. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.114300>

- Martín, I., Rodríguez, A., Alía, A., Martínez, R., & Córdoba, J. J. (2022). Selection and characterization of lactic acid bacteria with activity against *Listeria monocytogenes* from traditional RTE ripened foods. *LWT*, *163*, 113579. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.113579>
- Martín, I., Rodríguez, A., Alía, A., Martínez-Blanco, M., Lozano-Ojalvo, D., & Córdoba, J. J. (2022). Control of *Listeria monocytogenes* growth and virulence in a traditional soft cheese model system based on lactic acid bacteria and a whey protein hydrolysate with antimicrobial activity. *International Journal of Food Microbiology*, *361*, 109444. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2021.109444>
- Meruvu, H., & Harsa, S. T. (2022). Lactic acid bacteria: isolation–characterization approaches and industrial applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–20. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2054936>
- Mgomi, F. C., Yang, Y. ran, Cheng, G., & Yang, Z. quan. (2023). Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. *Biofilm*, *5*, 100118. <https://doi.org/10.1016/J.BIOFLM.2023.100118>
- Mkadem, W., Belguith, K., Oussaief, O., ElHatmi, H., Indio, V., Savini, F., De Cesare, A., & Boudhrioua, N. (2023). Systematic approach to select lactic acid bacteria from spontaneously fermented milk able to fight *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Bioscience*, *51*, 102275. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.102275>
- Mohamad, N., Manan, H., Sallehuddin, M., Musa, N., & Ikhwanuddin, M. (2020). Screening of Lactic Acid Bacteria isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) as potential probiotics. *Aquaculture Reports*, *18*, 100523. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2020.100523>
- Mohammed, S., & Çon, A. H. (2021). Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from traditional cheese. *LWT*, *152*, 112319. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112319>
- Moradi, M., Molaei, R., & Guimarães, J. T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, *143*, 109722. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2020.109722>
- Morales Estrada, A., González Olivares, L. G., Contreras López, E., & Rodríguez Serrano, G. (2020). SelA and SelD genes involved in selenium absorption metabolism in lactic acid bacteria isolated from Mexican cheeses. *International Dairy Journal*, *103*, 104629. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2019.104629>
- Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., & López-Gómez, J. P. (2020). Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation*, *6*(1), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>
- Mukherjee, A., Gómez-Sala, B., O'Connor, E. M., Kenny, J. G., & Cotter, P. D. (2022). Global Regulatory Frameworks for Fermented Foods: A Review. *Frontiers in Nutrition*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.902642>

- Murindangabo, Y. T., Kopecký, M., Perná, K., Nguyen, T. G., Konvalina, P., & Kavková, M. (2023). Prominent use of lactic acid bacteria in soil-plant systems. *Applied Soil Ecology*, *189*, 104955. <https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2023.104955>
- Mushtaq, M., Gani, A., Noor, N., & Masoodi, F. A. (2021). Phenotypic and probiotic characterization of isolated LAB from Himalayan cheese (Kradi/Kalari) and effect of simulated gastrointestinal digestion on its bioactivity. *LWT*, *149*, 111669. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111669>
- Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D., & Flahaut, C. (2017). MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology*, *247*, 2–8. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.07.005>
- Nakibapher Jones Shangpliang, H., & Tamang, J. P. (2021). Phenotypic and genotypic characterisation of lactic acid bacteria isolated from exotic naturally fermented milk (cow and yak) products of Arunachal Pradesh, India. *International Dairy Journal*, *118*, 105038. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2021.105038>
- Nero, L. A., De Freitas, C. F., Carvalho, L. M. V. F., & Constantino, C. (2020). 3M Petrifilm Lactic Acid Bacteria Count Plate Is a Reliable Tool for Enumerating Lactic Acid Bacteria in Bacon. *Journal of Food Protection*, *83*(10), 1757–1763. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-155>
- Nguyen, N.-N., & Nguyen, Q.-D. (2024). Evolution of Kombucha Tea from Isolated Acetic Acid Bacteria, Lactic Acid Bacteria and Yeast in Single- and Mixed-Cultures: Characteristics, Bioactivities, Fermentation Performance and Kinetics. *Food Biotechnology*, *38*(1), 86–117. <https://doi.org/10.1080/08905436.2024.2306505>
- Nwamaioha, N. O., & Ibrahim, S. A. (2018). A selective medium for the enumeration and differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, *101*(6), 4953–4961. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-14155>
- Ogunremi, O. R., Ganz, G., Freimüller Leischtfeld, S., & Miescher Schwenninger, S. (2024). MALDI-TOF MS profiling and antifungal activity of lactic acid bacteria from kunu aya, a tiger nut traditional beverage of Nigeria. *Food Bioscience*, *61*, 104581. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2024.104581>
- Ogunremi, O. R., Leischtfeld, S. F., & Schwenninger, S. M. (2022). MALDI-TOF MS profiling and exopolysaccharide production properties of lactic acid bacteria from Kunu-zaki - A cereal-based Nigerian fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology*, *366*, 109563. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.109563>
- Olaimat, A. N., Aolymat, I., Al-Holy, M., Ayyash, M., Abu Ghoush, M., Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T., Apostolopoulos, V., Liu, S.-Q., & Shah, N. P. (2020). The potential application of probiotics and prebiotics for the prevention and treatment of COVID-19. *npj Science of Food*, *4*(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41538-020-00078-9>

- Papadopoulou, E., Rodriguez de Evgrafov, M. C., Kalea, A., Tsapekos, P., & Angelidaki, I. (2023). Adaptive laboratory evolution to hypersaline conditions of lactic acid bacteria isolated from seaweed. *New Biotechnology*, *75*, 21–30. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2023.03.001>
- Patil, A., Disouza, J., & Pawar, S. (2019). Shelf life stability of encapsulated lactic acid bacteria isolated from sheep milk thrived in different milk as natural media. *Small Ruminant Research*, *170*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.09.014>
- Plavec, T. V., & Berlec, A. (2020). Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, *8*(2), 297. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020297>
- Psomas, E., Sakaridis, I., Boukouvala, E., Karatzia, M.-A., Ekateriniadou, L. V., & Samouris, G. (2023). Indigenous Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Graviera Cheese and Evaluation of Their Most Important Technological Properties. *Foods*, *12*(2), 370. <https://doi.org/10.3390/foods12020370>
- Qayyum, N., Shuxuan, W., Yantin, Q., Ruiling, W., Wang, S., Ismael, M., & Lü, X. (2023). Characterization of Short-chain fatty acid-producing and cholesterol assimilation potential probiotic Lactic acid bacteria from Chinese fermented rice. *Food Bioscience*, *52*, 102404. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102404>
- Qiao, W., Qiao, Y., Gao, G., Liao, Z., Wu, Z., Saris, P. E. J., Xu, H., & Qiao, M. (2022). A novel co-cultivation strategy to generate low-crystallinity bacterial cellulose and increase nisin yields. *International Journal of Biological Macromolecules*, *202*, 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.038>
- Rahbar Saadat, Y., Yari Khosroushahi, A., & Pourghassem Gargari, B. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, *217*, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>
- Rahnama Vosough, P., Habibi Najafi, M. B., Edalatian Dovom, M. R., Javadmanesh, A., & Mayo, B. (2021). Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of exopolysaccharide from *Enterococcus* strains isolated from traditional Iranian Kishk. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*(6), 5221–5230. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01092-5>
- Raj, T., Chandrasekhar, K., Kumar, A. N., & Kim, S.-H. (2022). Recent biotechnological trends in lactic acid bacterial fermentation for food processing industries. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, *2*(1), 14–40. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00044-w>
- Rama, G. R., Kuhn, D., Beux, S., Maciel, M. J., & Volken de Souza, C. F. (2019). Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal*, *98*, 25–37. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2019.06.012>
- Ramos-Pereira, J., Mareze, J., Fernández, D., Rios, E. A., Santos, J. A., & López-Díaz, T. M. (2021). Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from milk against *Penicillium commune*, *P. nordicum*, and *P. verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*, *355*, 109331. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2021.109331>

- Rathod, N. B., Phadke, G. G., Tabanelli, G., Mane, A., Ranveer, R. C., Pagarkar, A., & Ozogul, F. (2021). Recent advances in bio-preservatives impacts of lactic acid bacteria and their metabolites on aquatic food products. *Food Bioscience*, *44*, 101440. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.101440>
- Renschler, M. A., Wyatt, A., Anene, N., Robinson-Hill, R., Pickerill, E. S., Fox, N. E., Griffith, J. A., & McKillip, J. L. (2020). Using nitrous acid-modified de Man, Rogosa, and Sharpe medium to selectively isolate and culture lactic acid bacteria from dairy foods. *Journal of Dairy Science*, *103*(2), 1215–1222. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17041>
- Rezaei, M., Noori, N., Shariatifar, N., Gandomi, H., Akhondzadeh Basti, A., & Mousavi Khaneghah, A. (2020). Isolation of lactic acid probiotic strains from Iranian camel milk: Technological and antioxidant properties. *LWT*, *132*, 109823. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109823>
- Rhoades, J., Anastasiou, I., Michailidou, S., Koinidis, A., Doulgerakis, C., Alexa, E. A., Alvarez-Ordóñez, A., Argiriou, A., & Likotrafiti, E. (2021). Microbiological analysis of Greek Protected Designation of Origin cheeses and characterisation of the isolated lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, *123*, 105183. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2021.105183>
- Rimoldi, S. G., Tamoni, A., Rizzo, A., Longobardi, C., Pagani, C., Salari, F., Matinato, C., Vismara, C., Gagliardi, G., Cutrera, M., & Gismondo, M. R. (2024). Evaluation of 16S-Based Metagenomic NGS as Diagnostic Tool in Different Types of Culture-Negative Infections. *Pathogens*, *13*(9), 743. <https://doi.org/10.3390/pathogens13090743>
- Riolo, M., Luz, C., Santilli, E., Meca, G., & Cacciola, S. O. (2023). Antifungal activity of selected lactic acid bacteria from olive drupes. *Food Bioscience*, *52*, 102422. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102422>
- Rivas, G. A., Valdés La Hens, D., Delfederico, L., Olguin, N., Bravo-Ferrada, B. M., Tymczynszyn, E. E., Semorile, L., & Brizuela, N. S. (2022). Molecular tools for the analysis of the microbiota involved in malolactic fermentation: from microbial diversity to selection of lactic acid bacteria of enological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *38*(2), 19. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03205-0>
- Sharma, A., Lavania, M., Singh, R., & Lal, B. (2021). Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(3), 1622–1632. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.11.062>
- Sharma, A., Lee, S., & Park, Y.-S. (2020). Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, *29*(10), 1301–1318. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00802-x>
- Sharma, P., Sharma, A., Singh, J., Singh, N., Singh, S., Tomar, G. S., Nain, P. K. S., Khare, S. K., & Nain, L. (2021). Co-production of gamma amino butyric acid (GABA) and lactic acid using *Lactobacillus plantarum* LP-9 from agro-residues. *Environmental Technology & Innovation*, *23*, 101650. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2021.101650>

- Shimodate, K., & Honda, H. (2022). Isolation and identification of psychrotrophic lactic acid bacteria in godo, the traditional fermented soy food in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 68(5), 2022.04.002. <https://doi.org/10.2323/jgam.2022.04.002>
- Skotniczny, M., & Satora, P. (2023). Molecular Detection and Identification of Plant-Associated *Lactiplantibacillus plantarum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4853. <https://doi.org/10.3390/ijms24054853>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Soleimani, H., Shokri, R., Nami, Y., Khandaghi, J., & Panahi, B. (2023). Potential probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from Duimaj, an Iranian traditional snack food, using biochemical, molecular and computational approaches. *LWT*, 184, 115091. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115091>
- Souza, L. V., Rodrigues da Silva, R., Falqueto, A., Fusieger, A., Martins, E., Caggia, C., Randazzo, C. L., & Carvalho, A. F. de. (2023). Evaluation of antifungal activity of lactic acid bacteria against fungi in simulated cheese matrix. *LWT*, 182, 114773. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114773>
- Srinivash, M., Krishnamoorthi, R., Mahalingam, P. U., Malaikozhundan, B., & Keerthivasan, M. (2023). Probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from homemade fermented food products. *Journal of Agriculture and Food Research*, 11, 100517. <https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2023.100517>
- Stupar, J., Hoel, S., Strømseth, S., Lerfall, J., Rustad, T., & Jakobsen, A. N. (2023). Selection of lactic acid bacteria for biopreservation of salmon products applying processing-dependent growth kinetic parameters and antimicrobial mechanisms. *Heliyon*, 9(9), e19887. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E19887>
- Sun, J., Silander, O., Rutherford-Markwick, K., Wen, D., Davy, T. P. P., & Mutukumira, A. N. (2022). Phenotypic and genotypic characterisation of *Lactobacillus* and yeast isolates from a traditional New Zealand Māori potato starter culture. *Current Research in Food Science*, 5, 1287–1294. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2022.08.004>
- Suwannaphan, S. (2021). Isolation, identification and potential probiotic characterization of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented food. *AIMS Microbiology*, 7(4), 431–446. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2021026>
- Tang, H., Huang, W., & Yao, Y.-F. (2023). The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microbial Cell*, 10(3), 49–62. <https://doi.org/10.15698/mic2023.03.792>
- Tarannum, N., Hossain, T. J., Ali, F., Das, T., Dhar, K., & Nafiz, I. H. (2023). Antioxidant, antimicrobial and emulsification properties of exopolysaccharides from lactic acid bacteria of bovine milk: Insights from biochemical and genomic analysis. *LWT*, 186, 115263. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115263>

- Terzaghi, B. E., & Sandine, W. E. (1975). Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. *Applied Microbiology*, *30*(2), 341–341. <https://doi.org/10.1128/am.30.2.341-341b.1975>
- Tilwani, Y. M., Lakra, A. K., Domdi, L., Yadav, S., Jha, N., & Arul, V. (2021). Optimization and physicochemical characterization of low molecular levan from *Enterococcus faecium* MC-5 having potential biological activities. *Process Biochemistry*, *110*, 282–291. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2021.08.021>
- Trindade, D. P. de A., Barbosa, J. P., Martins, E. M. F., & Tette, P. A. S. (2022). Isolation and identification of lactic acid bacteria in fruit processing residues from the Brazilian Cerrado and its probiotic potential. *Food Bioscience*, *48*, 101739. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101739>
- Valencia-Hernández, L. J., López-López, K., Gómez-López, E. D., Sernacook, L., & Aguilar, C. N. (2021). In-vitro assessment for the control of *Fusarium* species using a lactic acid bacterium isolated from yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel Moran)). *Journal of Integrative Agriculture*, *20*(1), 159–167. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63284-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63284-1)
- Valletta, M., Campolattano, N., De Chiara, I., Marasco, R., Singh, V. P., Muscariello, L., Pedone, P. V., Chambery, A., & Russo, R. (2023). A robust nanoLC high-resolution mass spectrometry methodology for the comprehensive profiling of lactic acid bacteria in milk kefir. *Food Research International*, *173*, 113298. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2023.113298>
- Van Reckem, E., De Vuyst, L., Weckx, S., & Leroy, F. (2021). Next-generation sequencing to enhance the taxonomic resolution of the microbiological analysis of meat and meat-derived products. *Current Opinion in Food Science*, *37*, 58–65. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2020.09.004>
- Vasudha, M., Prashantkumar, C., Bellurkar, M., Kaveeshwar, V., & Gayathri, D. (2023). Probiotic potential of β -galactosidase-producing lactic acid bacteria from fermented milk and their molecular characterization. *Biomedical Reports*, *18*(3), 23. <https://doi.org/10.3892/br.2023.1605>
- Verma, D., Joshi, S., Ghimire, P., Mishra, A., & Kumar, V. (2024). Developments in extremophilic bacterial genomics: A post next generation sequencing era. *Ecological Genetics and Genomics*, *32*, 100255. <https://doi.org/10.1016/J.EGG.2024.100255>
- Veselá, K., Kumherová, M., Klojdová, I., Solichová, K., Horáčková, Š., & Plocková, M. (2019). Selective culture medium for the enumeration of *Lactobacillus plantarum* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT*, *114*, 108365. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108365>
- Viesser, J. A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Vandenberghe, L. P. de S., Azevedo, V., Brenig, B., Rogez, H., Góes-Neto, A., & Soccol, C. R. (2020). Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: Isolation, selection and

- evaluation. *Food Research International*, 136, 109478. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109478>
- Vijayalakshmi, S., Kim, J.-R., Chelliah, R., Barathikannan, K., Tyagi, A., Aloo, S.-O., Chen, X., Yan, P., Shan, L., & Oh, D.-H. (2023). Encapsulating potential and functional properties of exopolysaccharide from *Limosilactobacillus reuteri* KCTC 14626BP isolated from human breast milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127330. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.127330>
- Vinderola, G., Reinheimer, J., & Salminen, S. (2019). The enumeration of probiotic issues: From unavailable standardised culture media to a recommended procedure? *International Dairy Journal*, 96, 58–65. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2019.04.010>
- Wafula, E. N., Kuja, J. O., Wekesa, T. B., & Wanjala, P. M. (2023). Isolation and Identification of Autochthonous Lactic Acid Bacteria from Commonly Consumed African Indigenous Leafy Vegetables in Kenya. *Bacteria*, 2(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/bacteria2010001>
- Walsh, A. M., Leech, J., Huttenhower, C., Delhomme-Nguyen, H., Crispie, F., Chervaux, C., & Cotter, P. D. (2023). Integrated molecular approaches for fermented food microbiome research. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(2). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad001>
- Wang, S., Li, C., Xu, Q., Wang, Y., Wang, S., Zou, Y., Yang, Z., & Yuan, L. (2024). Addition of lactic acid bacteria modulates microbial community and promotes the flavor profiles of Kombucha. *Food Bioscience*, 60, 104340. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2024.104340>
- Wang, Y., Li, B., Liu, Y., Huang, X., Zhang, N., Yang, Y., Xiao, Z., Yu, Q., Chen, S., He, L., Liu, A., Liu, S., Zou, L., & Yang, Y. (2021). Investigation of diverse bacteria encoding histidine decarboxylase gene in Sichuan-style sausages by culture-dependent techniques, polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis, and high-throughput sequencing. *LWT*, 139, 110566. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110566>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Wieërs, G., Belkhir, L., Enaud, R., Leclercq, S., Philippart de Foy, J.-M., Dequenne, I., de Timary, P., & Cani, P. D. (2020). How Probiotics Affect the Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454>
- Won, S. M., Chen, S., Park, K. W., & Yoon, J. H. (2020). Isolation of lactic acid bacteria from kimchi and screening of *Lactobacillus sakei* ADM14 with anti-adipogenic effect and potential probiotic properties. *LWT*, 126, 109296. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109296>
- Woraprayote, W., Janyaphisan, T., Adunphatcharaphon, S., Sonhom, N., Showpanish, K., Rumjuankiat, K., Visessanguan, W., Elliott, C. T., & Petchkongkaew, A. (2023). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria from Thai fermented foods: Potential food applications. *Food Bioscience*, 52, 102385. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102385>

- Xia, A. N., Meng, X. S., Tang, X. J., Zhang, Y. Z., Lei, S. M., & Liu, Y. G. (2021). Probiotic and related properties of a novel lactic acid bacteria strain isolated from fermented rose jam. *LWT*, *136*, 110327. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110327>
- Xia, L., Qian, M., Cheng, F., Wang, Y., Han, J., Xu, Y., Zhang, K., Tian, J., & Jin, Y. (2023). The effect of lactic acid bacteria on lipid metabolism and flavor of fermented sausages. *Food Bioscience*, 103172. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.103172>
- Xin, W. G., Li, X. D., Zhou, H. Y., Li, X., Liu, W. X., Lin, L. B., & Wang, F. (2024). Isolation, antibacterial characterization, and alternating tangential flow-based preparation of viable cells of *Lacticaseibacillus paracasei* XLK 401: Potential application in milk preservation. *Journal of Dairy Science*, *107*(3), 1355–1369. <https://doi.org/10.3168/JDS.2023-23622>
- Xu, Y., Zhou, T., Tang, H., Li, X., Chen, Y., Zhang, L., & Zhang, J. (2020). Probiotic potential and amylolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods. *Food Control*, *111*, 107057. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.107057>
- Yalmanci, D., İspirli, H., & Dertli, E. (2022). Identification of Lactic Acid Bacteria (LAB) from pre-fermented liquids of selected cereals and legumes and characterization of their exopolysaccharides (EPS). *Food Bioscience*, *50*, 102014. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.102014>
- Yang, Q., Rutherford-Markwick, K., & Mutukumira, A. N. (2021). Identification of dominant lactic acid bacteria and yeast in rice sourdough produced in New Zealand. *Current Research in Food Science*, *4*, 729–736. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.10.002>
- Yang, R., Li, J., Jiang, C., & Shi, J. (2023). Preventive and therapeutic effects of an exopolysaccharide produced by *Lacticaseibacillus rhamnosus* on alcoholic gastric ulcers. *International Journal of Biological Macromolecules*, *235*, 123845. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123845>
- Yang, S., Xu, X., Peng, Q., Ma, L., Qiao, Y., & Shi, B. (2023). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, as an alternative to antibiotics, on regulation of intestinal health and the immune system. *Animal Nutrition*, *13*, 78–89. <https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2023.02.004>
- Yoon, J.-H., Kim, J.-Y., Yoo, J.-H., & Lee, S.-Y. (2023). Development of a selective medium for the enumeration of lactic acid bacteria and bifidobacteria in food products. *Food Science and Biotechnology*, *32*(5), 713–721. <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01202-z>
- Yordshahi, A. S., Moradi, M., Tajik, H., & Molaei, R. (2020). Design and preparation of antimicrobial meat wrapping nanopaper with bacterial cellulose and postbiotics of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *321*, 108561. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108561>
- You, X., Li, Z., Ma, K., Zhang, C., Chen, X., Wang, G., Yang, L., Dong, M., Rui, X., Zhang, Q., & Li, W. (2020). Structural characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* LZ-R-5. *Carbohydrate Polymers*, *235*, 115977. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.115977>

- Yu, Y., Xu, Y., Li, L., Chen, S., An, K., Yu, Y., & Xu, Z. L. (2023). Isolation of lactic acid bacteria from Chinese pickle and evaluation of fermentation characteristics. *LWT*, *180*, 114627. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114627>
- Zapaśnik, A., Sokołowska, B., & Bryła, M. (2022). Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods*, *11*(9), 1283. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>
- Zhang, C., Chen, X., Guo, X., Guo, R., Zhu, L., Qiu, X., Yu, X., Chai, J., Gu, C., & Feng, Z. (2023). A novel strategy for improving the antioxidant, iridoid, and flavor properties of Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit juice by lactic acid bacteria fermentation. *LWT*, *184*, 115075. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115075>
- Zhang, J., Yao, Y., Li, J., Ju, X., & Wang, L. (2023). Impact of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria on the chemical, rheological properties of buckwheat sourdough and the quality of buckwheat bread. *Food Chemistry*, *425*, 136369. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.136369>
- Zhang, Y. M., Yang, L. Y., Ying, J. P., Fu, C. M., Wu, G., Li, X. R., & Zhang, Q. L. (2023). A novel bacteriocin RSQ01 with antibacterial activity and its application and metabolomic mechanism in milk preservation. *Food Control*, *151*, 109823. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109823>
- Zhao, X., Peng, F., Liu, Z., Peng, Z., Guan, Q., Cai, P., Xiong, S., Yu, Q., Xie, M., & Xiong, T. (2023). Lactic acid bacteria with anti-hyperuricemia ability: Screening in vitro and evaluating in mice. *Food Bioscience*, *52*, 102411. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102411>
- Zhao, X., Tang, F., Cai, W., Peng, B., Zhang, P., & Shan, C. (2023). Effect of fermentation by lactic acid bacteria on the phenolic composition, antioxidant activity, and flavor substances of jujube–wolfberry composite juice. *LWT*, *184*, 114884. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114884>
- Zhao, Y., Zhao, Z., Gao, Y., Yang, G., Liu, X., Huang, R., Liang, W., & Li, S. (2023). Assessment of autochthonous lactic acid bacteria as starter culture for improving traditional Chinese Dongbei Suancai fermentation. *LWT*, *178*, 114615. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114615>
- Zhao, Z., Mu, T., & Sun, H. (2019). Microbial characterization of five Chinese traditional sourdoughs by high-throughput sequencing and their impact on the quality of potato steamed bread. *Food Chemistry*, *274*, 710–717. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.08.143>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhuo, J., Xuan, J., Chen, Y., Tu, J., Mu, H., Wang, J., & Liu, G. (2023). Increase of γ -aminobutyric acid content and improvement of physicochemical characteristics of mulberry leaf powder by

fermentation with a selected lactic acid bacteria strain. *LWT*, 187, 115250.
<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115250>

Zielińska, D., & Kolożyn-Krajewska, D. (2018). Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *BioMed Research International*, 2018, 1–15.
<https://doi.org/10.1155/2018/5063185>

CAPÍTULO 2

ARTIGO

Uso de bactérias do ácido lático isoladas de soro-fermento de queijo Porungo na fabricação e no controle de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Padrão

Formatado de acordo com as normas da revista *International Dairy Journal*

Fabiana França¹ & Natan de Jesus Pimentel-Filho²

¹Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba. Rod. João Leme dos Santos, km 110 - SP-264, Bairro Itinga, 18052-780, Sorocaba/SP, Brasil

²Universidade Federal de São Carlos *campus* Lagoa do Sino. Rod. Lauri Simões de Barros SP-189, Km 12, Bairro Aracaçú, 18290-000, Buri/SP, Brasil

RESUMO

A demanda por alimentos mais saudáveis e com menos ingredientes sintéticos tem impulsionado a formulação de produtos contendo bactérias do ácido lático (BAL), que oferecem benefícios significativos à saúde e características únicas aos alimentos. Essas bactérias desempenham um papel crucial na fermentação, prolongando a vida útil dos produtos e produzindo metabólitos importantes. Queijos artesanais, como o queijo Porungo produzido em São Paulo no Brasil, são ricos em BAL. Este estudo teve como objetivos avaliar o potencial biotecnológico de oito BAL isoladas de soro-fermento de queijo Porungo *in vitro* e no controle de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Padrão. Os isolados foram identificados por meio da Espectrometria de Massa por Ionização com Dessorção à Laser Assistido por Matriz e Analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) e testados quanto à suscetibilidade a 12 antibióticos e à produção de diacetil. O potencial antibacteriano dos isolados foi avaliado contra *Lactococcus lactis* ATCC 19435 e *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 utilizando sobrenadantes livres de células neutralizados (SLC). O efeito da temperatura na cinética de crescimento dos isolados e a mudança no pH do leite integral foram avaliados ao longo de 48 h. Os isolados *Enterococcus faecium* QP60 e *Streptococcus infantarius* QP6 foram avaliados como culturas coadjuvantes e iniciadoras na produção de queijo Minas Padrão e no controle do

crescimento de *S. aureus* nesta matriz alimentar. Este estudo identificou dois isolados como *S. infantarius*, dois como *Streptococcus lutetiensis*, três como *L. lactis* e um como *E. faecium*. A maioria das BAL demonstrou sensibilidade a múltiplos antibióticos, com seis delas produzindo diacetil. Apenas o SLC obtido de *E. faecium* QP60 exibiu atividade antibacteriana contra *L. lactis*, mas não contra *S. aureus*. O potencial biotecnológico dos isolados revelou que as espécies de *Streptococcus* se adaptam rapidamente e apresentam alta taxa de crescimento em leite integral incubado entre 30 e 40 °C, com destaque para *S. infantarius* QP6. Os tratamentos utilizando as diferentes combinações de BAL não mostraram eficácia significativa sobre o crescimento *S. aureus* ao longo de 60 dias. Além disso, o processo de maturação do queijo Minas Padrão e os diferentes tratamentos aplicados causaram mudanças significativas nas características físico-químicas do produto. Os resultados sugerem que *E. faecium* QP60 e *S. infantarius* QP6 requerem estudos adicionais e podem ser considerados potenciais culturas coadjuvantes e bioprotetoras.

Palavras-chave: Cultura endógena; Queijo artesanal de leite cru; Cultura iniciadora; Controle de patógenos.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias do ácido láctico (BAL) apresentam-se na forma de cocos ou bastonetes, Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase-negativas, fermentativas e anaeróbicas facultativas (Souza et al., 2023; Hosken et al., 2023; Murindangabo et al., 2023; Raj et al., 2022). Durante o processo fermentativo, as BAL têm a capacidade de gerar grandes quantidades de ácido láctico e outros compostos que irão determinar sua classificação em homofermentativas, onde o ácido láctico é o único produto; ou em heterofermentativas, onde o ácido láctico, gás carbônico (CO₂), etanol e outros compostos são gerados através da via da hexose monofosfato ou pentose (Hosken et al., 2023; Meruvu & Harsa, 2022; Raj et al., 2022; Rathod et al., 2021).

O grupo das BAL é composto por uma variedade de microrganismos que, atualmente, contempla mais de 60 gêneros de microrganismos, incluindo *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Daba & Elkhateeb, 2020; Plavec & Berlec, 2020; Y. Wang et al., 2021). Recentemente, a comunidade científica aceitou a proposta de fusão das famílias *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae* em uma única família, *Lactobacillaceae*. Além disso, o gênero *Lactobacillus* foi reclassificado em 25 gêneros diferentes. Esta reorganização levou em consideração vários marcadores genéticos, incluindo a filogenia do genoma central, identidade de aminoácidos e nucleotídeos, critérios metabólicos e genes de assinatura (Zheng et al., 2020).

Muitas BAL são consideradas seguras para seu uso e de seus metabólitos em alimentos, já que parte delas recebe o *status* de Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) e Presunção de Segurança Qualificada (QPS) (Abedin et al., 2023; Ağagündüz et al., 2022; W. Chen et al., 2019; Mora-Villalobos et al., 2020). Para serem consideradas probióticas, essas bactérias devem atender aos critérios estabelecidos pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) que incluem serem seguras para consumo humano, não serem hemolíticas, resistirem ao pH ácido do estômago, aos sais biliares e aos sucos gástricos, serem sensíveis aos antibióticos, demonstrarem atividade antagônica contra patógenos, além de exibirem características como autoagregação, hidrofobicidade e adesão ao epitélio intestinal (Roldán-Pérez et al., 2023). Além do potencial probiótico de algumas BAL (Suissa et al., 2022), elas também são conhecidas por apresentarem atividade antimicrobiana (Hernández Figueroa et al., 2024), antitumoral (Macharia et al., 2023), antioxidante (Feng & Wang, 2020), imunomoduladora (Mojgani et al., 2020), redução do colesterol sérico (Nazir et al., 2018), entre outras atividades.

BAL atuam como culturas iniciadoras em processos de fermentação industrial em diversos setores alimentícios, incluindo laticínios, panificação, produção de carnes, leguminosas e até mesmo bebidas (Abedin et al., 2023). A fermentação é um processo fundamental na conservação dos alimentos, prolongando sua vida útil e resultando na formação de metabólitos bioativos essenciais. A otimização desses processos pelas BAL é fortemente influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos. Fatores intrínsecos, como atividade de água, pH, composição nutricional e presença de inibidores naturais, são cruciais para determinar o crescimento e a atividade das BAL. Já os fatores extrínsecos, como temperatura, aeração e umidade do ambiente de processamento, afetam diretamente o desenvolvimento microbiano e a formação de metabólitos desejáveis (de Souza et al., 2023; Rolfe & Daryaei, 2020). Os antimicrobianos naturais oriundos da fermentação são vistos como alternativas mais orgânicas e facilmente discerníveis em comparação com o uso de conservantes convencionais, tais como propionatos, sorbatos ou benzoatos (Hernández Figueroa et al., 2024). Os sobrenadantes livres de células (SLC) provenientes das BAL têm sido amplamente explorados como antimicrobianos, devido à presença de metabólitos resultantes da fermentação e/ou subprodutos microbianos secundários do metabolismo (Arrijoja-Bretón et al., 2020; Durango-Zuleta et al., 2022; Hernández Figueroa et al., 2024).

A demanda por alimentos saudáveis, com redução na lista de ingredientes, tem emergido como uma tendência inovadora tanto no âmbito da produção alimentícia quanto entre os consumidores (Bibi et al., 2021). Observa-se um aumento significativo na formulação de alimentos e bebidas contendo BAL, impulsionado pela capacidade dessas bactérias e de seus metabólitos em conferir características únicas a esses produtos, bem como uma infinidade de benefícios à saúde do hospedeiro (Leal Maske et al., 2024; Y. Wang et al., 2021)

Embora estudos recentes confirmem que as BAL são comumente encontradas em uma variedade de alimentos, os produtos lácteos são tradicionalmente as principais fontes de isolamento dessas bactérias (Fidan et al., 2022; Gupta et al., 2021; Huang et al., 2021; Lepecka et al., 2023). Em queijos são encontradas linhagens de BAL com potencial para sintetizar bacteriocinas, as quais desempenham um papel crucial na redução do risco de crescimento e persistência de microrganismos patogênicos (Coelho et al., 2022). Nos queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, as BAL são fundamentais na complexa microbiota, exercendo influência significativa em várias etapas de sua produção e maturação (Blaya et al., 2018; Nero et al., 2021). Além disso, as BAL presentes nestes queijos também podem possuir propriedades benéficas à saúde, uma vez que parte delas são potencialmente reconhecidas como probióticos (Erginkaya & Konuray-Altun, 2022).

O queijo Porungo, um tipo de queijo artesanal de massa filada, é elaborado por agricultores familiares em determinados municípios da região Sudoeste Paulista no Brasil. O seu nome, “Porungo”, homenageia o seu formato único, que lembra o porungo, fruto da videira *Lagenaria siceraria*. Na produção deste queijo, emprega-se leite cru a 35 °C, coalho e o soro-fermento obtido do soro drenado da produção do dia anterior, conhecido como "repique" ou soro-fermento, que contém as culturas microbianas autóctones essenciais para o processo. Ao permitir que o fermento permaneça à temperatura ambiente durante a noite, o crescimento BAL é estimulado (Nogueira Silva et al., 2020).

As BAL, abundantes na microbiota de queijos artesanais, produzem uma variedade de compostos antimicrobianos que podem interferir no crescimento de patógenos, além de apresentarem alto potencial probiótico. Portanto, este estudo teve como objetivos avaliar o potencial biotecnológico de oito BAL isoladas de soro-fermento de queijo Porungo in vitro e no controle de *S. aureus* em queijo Minas Padrão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Oito BAL, isoladas do soro-fermento do queijo Porungo e caracterizadas em estudos prévios conduzidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Estudos Avançados em Microbiologia de Alimentos (FoMAS) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Lagoa do Sino foram utilizadas neste estudo. Quatro delas pertencentes ao gênero *Streptococcus* (QP6, QP13, QP29 e QP32), três ao gênero *Lactococcus* (QP40, QP79 e QP83) e uma ao gênero *Enterococcus* (QP60). Os isolados de *Streptococcus* foram incubados a 37 °C e os de *Lactococcus* e *Enterococos* a 30 °C, ambos cultivados em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS; Kasvi, Brasil) por 24 h.

Lactococcus lactis ATCC 19435, foi cultivado em caldo MRS a 30 °C por 24 h.

Staphylococcus aureus INCQS 285 (ATCC 13565), produtor da enterotoxina A, e *S. aureus* INCQS 015 (ATCC 25923), cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro) foram cultivados em caldo tripton de soja (TSB; Merck, Alemanha) por 18 a 20 h a 37 °C.

Culturas estoques dos microrganismos foram mantidas a -20 °C nos respectivos meios citados anteriormente acrescidos de 20% (v/v) de glicerol.

2.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA POR IONIZAÇÃO COM DESSORÇÃO À LASER ASSISTIDO POR MATRIZ E ANALISADOR DE TEMPO DE VOO (MALDI-TOF MS)

2.2.1. Protocolos de extração padrão e em placa

A identificação dos isolados utilizando espectrometria de massa por ionização com deissorção à laser assistido por matriz e analisador de tempo de voo (MALDI-TOF MS) foi realizada conforme descrito por Barcelos et al. (2019). Após o cultivo dos isolados em ágar MRS, uma colônia foi transferida para o ponto na placa de aço (MSP 384; Bruker Daltonik, Alemanha) com o auxílio de um palito. Em seguida, 1 µL de ácido fórmico a 70% foi adicionado ao ponto e deixado secar à temperatura ambiente. Depois da secagem, 1 µL da solução de matriz composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) dissolvido em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético. Após a aplicação da matriz, os pontos foram novamente secos à temperatura ambiente para posterior análise por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Inc. Billerica, MA, EUA).

2.2.2. Etapa final da preparação da placa

Para calibração do MALDI-TOF MS, utilizou-se uma solução padrão de proteína Bacterial Test Standard (BTS; Bruker, Alemanha). Em cada placa, foram analisados um controle positivo (*Escherichia coli*) e um controle negativo (ácido fórmico e matriz). A análise MALDI-TOF MS foi conduzida no software FlexControl 3.4 (Bruker Daltonik, Alemanha), operando no modo linear com um laser de nitrogênio de 337 nm. Os espectros de massa foram coletados automaticamente na faixa de 2000 a 20.000 m/z, com 3000 disparos de laser para gerar cada espectro. A leitura das placas seguiu as especificações para identificação por extração de proteínas (Bruker Daltonik, Alemanha) e os dados espectrais foram processados usando o software MALDI Biotyper 4.1.70 (Bruker Daltonik, Alemanha) para identificação microbiana por meio da biblioteca MPS versão 7311 do MBT.

2.3. ANTIBIOGRAMA

A análise de antibiograma foi conduzida em duplicata conforme o método de difusão em disco de suscetibilidade antimicrobiana, com modificações (Charteris et al., 1998). Os isolados de BAL foram inicialmente cultivados em caldo MRS a 37 °C. Após a coleta das

células bacterianas, por centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4 °C, estas foram lavadas em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85% (p/v). O pellet foi transferido para tubos contendo 1 mL de solução de NaCl a 0,85% e a turbidez da cultura ajustada para 0,5 na escala de McFarland, aproximadamente 10⁸ UFC/mL. Em seguida, *swabs* esterilizados foram utilizados para inoculação dos microrganismos na superfície de ágar MRS contido em placas de Petri. Discos contendo os antimicrobianos (Sensibiodisc, Cecon, Brasil): clindamicina (20 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg), norfloxacina (10 µg), rifampicina (5 µg), ampicilina (10 µg), benzilpenicilina (1 U.I.) e cefepime (30 µg) foram dispostos sobre as placas e incubadas a 37 °C por 24 h. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro e os microrganismos foram classificados qualitativamente como sensíveis (S), moderadamente sensíveis (I) ou resistentes (R) aos antimicrobianos testados, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2024).

2.4. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para obtenção do sobrenadante livre de células neutralizado (SLC), os isolados foram cultivados por 24 e 48 h em 10 mL de caldo MRS a 37 °C para aqueles identificados como *Streptococcus* e em caldo M17 adicionado de glicose (GM17) a 30 °C para os isolados identificados como *Lactococcus* ou *Enterococcus*. Posteriormente, as culturas foram submetidas à centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram neutralizados para pH 6,5 com hidróxido de sódio (NaOH) a 10 M e, em seguida, filtrados em membrana de polietersulfona (PSE) de 0,22 µm (Kasvi, Brasil). Os SLC foram armazenados a -20 °C para análises posteriores. A atividade inibitória dos SLC de cada isolado foi avaliada pelo método de difusão em ágar com algumas modificações (Tagg et al., 1976) contra *L. lactis* ATCC 19435, bactéria utilizada em testes de susceptibilidade à antimicrobianos (Elliott & Facklam, 1996; O' Connor et al., 2020), e *S. aureus* ATCC 25923. Uma alíquota de 50 µL de SLC foi adicionada em orifícios com 5 mm de diâmetro feitos em placas contendo 20 mL de ágar MRS ou ágar tripton de soja (TSA) e, aproximadamente, 10⁵ UFC/mL de *L. lactis* ou *S. aureus*, respectivamente. Como controle, foi utilizado nisina A (Sigma-Aldrich, EUA) a 1000 µM. As placas foram mantidas a 4 °C por 12 h para difusão do SLC e, posteriormente, incubadas a 30 °C para *L. lactis* e a 37 °C para *S. aureus*. Após 24 h, o diâmetro dos halos de inibição foi medido com auxílio de um paquímetro.

2.5. PRODUÇÃO DE DIACETIL

Para avaliar a produção de diacetil, os isolados foram cultivados em caldo MRS por 18 h a 30 °C. Após crescimento, foram centrifugados a 4000 x g por 15 min à temperatura ambiente. Os pellets obtidos foram ressuspensos em 5 mL de água peptonada tamponada e inoculados a uma concentração de 1% (p/v) em 10 mL de leite integral UHT, seguido de incubação a 30 °C por 24 h. Posteriormente, 1 mL da cultura foi combinado com 0,5 mL de uma solução composta por α -naftol a 1% (p/v) e hidróxido de potássio (KOH) a 16% (p/v), sendo a mistura incubada a 37 °C por 10 min. A formação de um anel vermelho nos tubos indicou a produção de diacetil (King, 1948). Os resultados foram classificados como fraco (+), médio (++) , forte (+++) ou ausente (-), dependendo da intensidade da coloração observada. Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.6. EFEITO DA TEMPERATURA NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E ACIDIFICAÇÃO DO LEITE INTEGRAL POR BAL

Para avaliar o efeito da temperatura na cinética de crescimento e na capacidade de acidificação do leite, os oito isolados de BAL foram cultivados em leite em pó desnatado reconstituído (LDR) a 12% por 20 h a 37 °C para os isolados de *Streptococcus* e a 30 °C para os isolados de *Lactococcus* e *Enterococcus*. Então, 1% (v/v) de cada isolado foi inoculado em 20 mL de leite integral UAT adquirido no comércio local e incubado em 4 diferentes temperaturas: 8, 25, 30 e 40 °C. Nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 30 e 48 h, alíquotas foram coletadas, diluídas, plaqueadas pela técnica de microgotas na superfície de ágar GM17 e incubadas por 24 h a 37 °C para os isolados de *Streptococcus* e a 30 °C para os isolados de *Lactococcus* e *Enterococcus*. A variação do pH ao longo do tempo de incubação foi monitorada, nos mesmos tempos supracitados, utilizando potenciômetro digital (Jenway 3510, Reino Unido). As análises foram realizadas em duplicata.

2.7. APLICAÇÃO DE BAL ISOLADAS DO SORO-FERMENTO DE QUEIJO PORUNGO COMO CULTURAS COADJUVANTE E INICIADORAS EM QUEIJO MINAS PADRÃO

2.7.1. Preparo do inóculo

Alíquotas de LDR 12% foram inoculadas separadamente com *L. lactis* ATCC 19435, *Lactococcus cremoris*, *Enterococcus faecium* QP60 e *Streptococcus infantarius* QP6 e incubadas a 30 °C por 24 h. *S. aureus* ATCC 13565, cepa produtora de enterotoxina A, foi cultivada em TSB a 37 °C por 18 a 20 h.

2.7.2. Fabricação de queijo Minas Padrão

O leite empregado na fabricação do queijo, coletado em uma fazenda situada no município de Angatuba, São Paulo, Brasil, apresentou a seguinte composição: 4,1% de gordura, 3,2% de proteína, densidade de 1031,00, extrato seco desengordurado de 8,89% e extrato seco total de 13,23%.

Queijo Minas Padrão foi produzido no Laboratório de Alimentos do Centro de Ciências da Natureza (CCN-UFSCar) de acordo com Andrade et al. (2019), com algumas modificações. Após a pasteurização a 65 °C por 30 min, o leite foi resfriado a 35 °C e inoculado com as culturas de BAL, seguido de um período de pré-maturação de 30 min. Foram realizadas três bateladas com diferentes tratamentos. No tratamento controle (C), foi inoculado 1% de cultura tipo O, composta por 50% de *L. lactis* e 50% de *L. cremoris*. Para testar o potencial de *E. faecium* QP60 como cultura coadjuvante e bioprotetora, 1% da cultura tipo O e 1% de *E. faecium* QP60 foram adicionadas ao leite (CQP60). Para avaliar os isolados *S. infantarius* QP6 e *E. faecium* QP60 como culturas iniciadoras alternativas, 1% de cultura mista composta por 50% de QP6 e 50% de QP60 foi adicionada ao leite (QP6QP60).

A coagulação do leite foi realizada a 33 ± 1 °C, com a adição de 1 mL de solução de cloreto de cálcio a 40% (p/v) (Bela Vista Produtos Enzimáticos, Santa Catarina, Brasil) e 3,3 mL de coalho líquido (Chr. Hansen, São Paulo, Brasil). Após 40 min, os géis resultantes foram cortados e agitados por 40 min a 38 ± 1 °C. O soro foi então removido, e a massa dos queijos foi pesada, fracionada e transferida para o FoMAS da UFSCar. Metade da massa foi acondicionada em formas cilíndricas de 300 g, equipadas com dessoradores. A outra metade foi inoculada com células de *S. aureus* diluídas em soro obtido na produção dos queijos para uma população de, aproximadamente, 10^4 UFC/g. A massa foi manualmente homogeneizada por 2 min e transferida para formas cilíndricas contendo dessorador. Os queijos foram prensados por 30 min com um peso equivalente a 10 vezes o peso do queijo. Em seguida, foram virados nas formas e recolocados na prensa por mais 60 min. A salga foi realizada em salmoura

a 20% (p/v) de NaCl, a uma temperatura de 10 °C, por 1 h. Os queijos foram armazenados em câmara fria a 10 °C com 65% de umidade por até 60 dias. Após 10 dias, os queijos foram embalados à vácuo individualmente em embalagens gofradas de Nylon Poli.

Durante o processo, a variação do pH foi monitorada em diferentes etapas: após a pasteurização, após a pré-maturação, após o corte (soro) e após a mexedora (soro).

2.7.2.1. Análises físico-químicas

Nos tempos 10 e 30 dias, os queijos não inoculados com *S. aureus* foram analisados quanto aos parâmetros físico-químicos.

O pH foi determinado pelo método potenciômetro (FIL-IDF, 115a:1989), a umidade pelo método gravimétrico em estufa a 102 ± 2 °C (FIL-IDF 4:2004) e a atividade de água utilizando-se medidor digital Aqualab 4TE (Decagon Devices, EUA).

2.7.2.2. Análise reológica

A análise de perfil de textura foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pinto et al. (2011), com algumas modificações, em texturômetro TA-XT Plus (Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido). Um probe cilíndrico de 3,6 cm de diâmetro (Probe SMS P/36R) foi utilizado, movido perpendicularmente através das amostras cilíndricas dos queijos com 20 mm de diâmetro e 10 mm de altura que foram colhidas a partir do centro do queijo. As condições de trabalho foram pré-teste, teste e pós-teste com velocidade de 1 mm/s, com uma compressão de 40 % da parte superior da amostra. Os parâmetros analisados foram: dureza (N), gomosidade, mastigabilidade, elasticidade e coesividade.

2.7.2.3. Cor instrumental

A cor instrumental foi determinada em colorímetro (Delta Color, Colorium 7, São Leopoldo, Brasil), utilizando iluminante D65, ângulo de observação de 10° e abertura de medição de 8 mm. O equipamento foi calibrado em porcelana branca padrão e os parâmetros L* (luminosidade), a* (intensidade de vermelho/verde) e b* (intensidade de amarelo/azul) do sistema CIELab foram determinados nos queijos, tanto na superfície (casca) quanto na parte interna, após os mesmos terem atingido a temperatura ambiente, com 8 leituras em cada parte do queijo.

2.7.2.4. Análises Microbiológicas

Amostras de 10 g, em duplicata, dos queijos Minas Padrão foram analisadas nos tempos 1, 10, 30 e 60 dias. Nos queijos não inoculados com *S. aureus* foi determinada a contagem de BAL, enquanto nos queijos inoculados com *S. aureus*, avaliou-se tanto a contagem de BAL quanto a contagem de *S. aureus*. A contagem de BAL foi realizada pelo plaqueamento em ágar MRS acrescido de púrpura de bromocresol, de acordo com a norma FIL-IDF 143:1990. A contagem de *S. aureus* foi feita em ágar Sal Manitol (AMS; Biolog, Brasil) segundo norma FIL 145:1990.

2.7.2.5. Análise de dados

Foi realizado um delineamento de blocos ao acaso, com dois blocos (dois processamentos independentes). Os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi realizada através do teste de Tukey, a 5% de significância. As análises foram realizadas em software R (RStudio 2024.04.2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BAL POR MALDI-TOF MS

A Tabela 1 apresenta a identificação dos isolados realizada pela análise MALDI-TOF MS, destacando uma predominância de espécies dos gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus*, além de um isolado pertencente ao gênero *Enterococcus*.

Tabela 1. Identificação dos isolados de BAL por MALDI-TOF MS

Isolado	Identificação
QP6	<i>Streptococcus infantarius</i>
QP13	<i>Streptococcus infantarius</i>
QP29	<i>Streptococcus lutetiensis</i>
QP32	<i>Streptococcus infantarius</i>
QP40	<i>Lactococcus lactis</i>
QP60	<i>Enterococcus faecium</i>
QP79	<i>Lactococcus lactis</i>
QP83	<i>Lactococcus lactis</i>

Dentre os quatro isolados pertencentes ao gênero *Streptococcus*, três foram identificados como *Streptococcus infantarius* e um como *Streptococcus lutetiensis*. *S. infantarius* é reconhecido por sua associação com produtos lácteos fermentados, especialmente em leite cru e em processos de fermentação natural, onde contribui significativamente para o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis. *S. lutetiensis* também tem sido encontrado em contextos semelhantes, compondo a microbiota de produtos fermentados (Jans et al., 2017; Özkan et al., 2021; Sioziou et al., 2024). Contudo, ambas as espécies são conhecidas por pertencerem ao complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (SBSEC). A maioria dos membros do SBSEC são considerados patógenos oportunistas, causando doenças graves em humanos e animais (Gboko et al., 2019).

Um estudo realizado por Jans et al. (2013), demonstrou que o genoma do isolado de *S. infantarius* CJ18, proveniente de laticínios africanos, era distinto do isolado humano *S. infantarius* ATCC BAA-102, evidenciando uma adaptação metabólica específica ao ambiente dos laticínios. Güley et al. (2022) também observaram variações genômicas significativas em *S. infantarius* subsp. *infantarius* AYB210 quando comparado tanto ao isolado lácteo africano quanto ao isolado humano ATCC BAA-102. As diferenças encontradas, especialmente modificações do operon da lactose, sugerem uma possível adaptação evolutiva ao ambiente específico dos produtos lácteos fermentados. Por outro lado, apenas um gene de virulência putativo, *hasC*, que codifica a UDP-glicose pirofosforilase, foi detectado no genoma de *S. infantarius* subsp. *infantarius* AYB210. Essas descobertas ressaltam a importância de realizar estudos mais aprofundados sobre as cepas identificadas para garantir sua segurança e adequação ao uso. Embora muitas espécies de *Streptococcus* sejam conhecidas por seu potencial patogênico, *Streptococcus thermophilus* se destaca como uma exceção. Considerada segura

com base na QPS, essa bactéria tem sido amplamente utilizada como cultura iniciadora na produção de iogurtes e outros produtos lácteos fermentados, como queijos duros, sem relatos de problemas de segurança (Uriot et al., 2017). Pesquisas genômicas revelaram que *S. thermophilus* perdeu uma parte significativa de seu genoma, especialmente aqueles genes relacionados à especificidade ecológica, como resultado de sua adaptação ao ambiente leiteiro (dos Santos et al., 2020).

Três isolados foram identificados como *L. lactis*, uma espécie amplamente utilizada na indústria de laticínios. *L. lactis* é conhecida por sua capacidade de acidificar o ambiente e produzir compostos de sabor, como o diacetil, que contribuem significativamente para o perfil sensorial de produtos fermentados, como queijos e iogurtes (Li et al., 2020). Essa espécie é frequentemente escolhida como cultura iniciadora devido à sua robustez e eficácia em melhorar a qualidade e estabilidade dos produtos lácteos fermentados (Kondrotiene et al., 2023).

Apenas um isolado foi identificado como *E. faecium*, microrganismos comumente encontrados em diversos ambientes, incluindo produtos vegetais. Embora algumas cepas sejam associadas a riscos patogênicos, muitas têm propriedades tecnológicas (M'hir et al., 2012). Esse gênero é conhecido por sua resistência a condições adversas, como alta salinidade, temperaturas elevadas e baixos níveis de pH, demonstrando uma forte adaptabilidade a matrizes alimentares como queijos. Desempenham um papel crucial no desenvolvimento do sabor característico do queijo, promovendo a degradação de proteínas e lipídios, além de produzir compostos como o diacetil (Terzić-Vidojević et al., 2021). Diversas cepas de *E. faecium* foram identificadas como produtoras de bacteriocinas, conhecidas como enterocinas, agentes antimicrobianos que inibem o crescimento de patógenos nos alimentos (Meral-Aktaş, 2024; Sonei et al., 2024; Toplu & Tuncer, 2023).

3.2. SUSCEPTIBILIDADE DAS BAL A ANTIBIÓTICOS

Bactérias utilizadas na produção de alimentos devem ser isentas de genes de resistência a antibióticos adquiridos ou transferíveis, garantindo a segurança dos alimentos e a prevenção da disseminação de resistência antimicrobiana (Campedelli et al., 2019). Desta forma, oito isolados de BAL obtidos a partir do soro-fermento do queijo Porungo foram testados quanto à suscetibilidade a 12 antibióticos (Tabela 2). De modo geral, os isolados demonstraram uma alta sensibilidade à maioria dos antibióticos avaliados. Especificamente, todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos responsáveis pela inibição da síntese da parede celular (ampicilina e

vancomicina) e síntese proteica (cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina) (Charteris et al., 1998).

Tabela 2. Antibiograma de isolados de BAL

Antibiótico	Diâmetro da zona de inibição (mm)								
	QP6	QP13	QP29	QP32	QP40	QP60	QP79	QP83	
AMP10	22,0 S ³	21,5 S ³	22,0 S ³	26,0 S ³	22,0 S ³	22,0 S ³	26,5 S ³	25,0 S ³	
CLI2	20,5 S ¹	22,5 S ¹	22,5 S ¹	21,5 S ¹	19,5 I ²	11,7 R ²	24,0 S ²	24,5 S ²	
CLO30	24,0 S ¹	24,0 S ¹	23,5 S ¹	24,0 S ¹	25,0 S ¹	22,0 S ³	27,0 S ¹	27,0 S ¹	
CPM30	23,0 I ¹	26,5 S ¹	23,0 I ¹	22,0 I ¹	26,5 S ¹	24,5 S ¹	28,5 S ¹	30,5 S ¹	
ERI15	24,5 S ¹	23,5 S ¹	23,5 S ¹	24,0 S ¹	25,0 S ²	22,0 I ³	27,0 S ²	27,0 S ²	
GEN10	11,0 R ²	11,0 R ²	11,5 R ²	10,5 R ²	15,5 S ²	13,0 I ²	16,5 S ²	19,5 S ²	
NOR10	13,5 I ²	11,5 R ²	14,0 I ²	15,0 I ²	11,5 R ²	18,0 S ³	15,5 I ²	27,0 S ²	
OXA1	17,3 I ²	16,5 R ²	17,3 I ²	18,5 S ²	16,0 R ²	19,0 S ²	15,5 R ²	16,0 R ²	
PEN1	17,0 I ⁴	16,5 I ⁴	16,0 I ⁴	15,5 I ⁴	16,0 I ⁴	16,0 I ⁴	16,0 I ⁴	21,0 I ⁴	
RIF5	21,5 S ²	22,0 S ²	20,5 S ²	21,5 S ²	12,0 R ²	30,0 S ³	14,0 R ²	10,3 R ²	
TET30	27,0 S ¹	26,0 S ¹	25,5 S ¹	27,0 S ¹	25,0 S ¹	28,0 S ³	31,0 S ¹	24,0 S ¹	
VAN30	19,0 S ¹	18,5 S ¹	20,5 S ¹	19,0 S ¹	18,5 S ¹	23,0 S ³	21,0 S ¹	21,5 S ¹	

AMP10: ampicilina (10 µg); CLI1: clindamicina (1 µg); CLO30: cloranfenicol (30 µg); CPM30: cefepime (30 µg); ERI15: eritromicina (15 µg); GEN10: gentamicina (10 µg); NOR10: norfloxacin (10 µg); oxacilina (1 µg); PEN1: benzilpenicilina (1 U.I.); RIF5: rifampicina (5 µg); TET30: tetraciclina (30 µg) e VAN30: vancomicina (30 µg).

Suscetibilidade expressa como resistente (R), suscetível (S) e intermediária (I).

¹Critérios interpretativos adaptados daqueles para *Streptococcus* spp. Grupo Viridans, conforme publicado no documento CLSI M100.

²Critérios interpretativos adaptados daqueles para *Staphylococcus* spp., conforme publicado no documento CLSI M100.

³Critérios interpretativos adaptados daqueles para *Enterococcus* spp., conforme publicado no documento CLSI M100.

⁴Critérios interpretativos adaptados daqueles para *Streptococcus* spp. Grupo Viridans, conforme publicado no documento EUCAST (2024).

No entanto, todos os isolados pertencentes ao gênero *Streptococcus* exibiram resistência à gentamicina. Este resultado é consistente com a literatura, uma vez que *Streptococcus* é frequentemente descrito como intrinsecamente resistente a aminoglicosídeos, como a gentamicina, devido à incapacidade desses antibióticos de penetrar na membrana bacteriana de maneira eficaz (dos Santos et al., 2020; Glajzner et al., 2023). Adicionalmente, todos os isolados do gênero demonstraram algum nível de resistência à norfloxacin, oxacilina e benzilpenicilina, enquanto três deles exibiram resistência intermediária ao cefepime.

Em um estudo realizado com *S. thermophilus* FUA329, os resultados dos ensaios fenotípicos mostraram que essa cepa foi suscetível a 12 tipos de antibióticos, mas apresentaram resistência à oxacilina e benzilpenicilina (Liu et al., 2023). Além disso, tanto cepas de *S. thermophilus* (Wang et al., 2019; Zhou et al., 2012), quanto de *S. infantarius* (Güley et al., 2022; Özkan et al., 2021) e *S. lutetiensis* (Özkan et al., 2021) demonstraram resistência à gentamicina. Em concordância com nossos dados, a maioria dos estudos encontraram que *Streptococcus* é susceptível à vancomicina (Ammor et al., 2007; Gad et al., 2014; Güley et al., 2022; Nawaz et al., 2011; Özkan et al., 2021).

Todos os isolados de *Lactococcus* demonstraram resistência a pelo menos um antibiótico. Os isolados QP79 e QP83 mostraram resistência à oxacilina e rifampicina, enquanto o isolado QP40 foi resistente a três diferentes antibióticos, oxacilina, rifampicina e norfloxacin. Hamdaoui et al. (2024) reportaram três cepas de *L. lactis* isoladas de leite cru resistentes à rifampicina. Por outro lado, essas cepas apresentaram sensibilidade a antibióticos como ampicilina, vancomicina, gentamicina, tetraciclina e cloranfenicol. Outros estudos também encontraram cepas de *Lactococcus* sensíveis a eritromicina, gentamicina e cloranfenicol, mas resistentes a outros antibióticos, como clindamicina (Ramalho et al., 2019; Sylvere et al., 2023).

O isolado QP60, *E. faecium*, mostrou resistência exclusiva à clindamicina e resistência intermediária à eritromicina, gentamicina e benzilpenicilina. Esses resultados são consistentes com os resultados de Toplu & Tuncer (2023), onde *E. faecium* BT29.11, isolado do queijo turco Beyaz, foi suscetível à ampicilina, cloranfenicol, norfloxacin, tetraciclina e vancomicina, mas apresentou resistência intermediária à eritromicina. Em outro estudo, Kim & Koo (2020) relataram uma alta incidência de resistência em isolados de *E. faecium*, com 80% dos isolados resistentes à eritromicina e 50% resistentes à clindamicina. De forma semelhante, Meral-Aktaş (2024) encontrou que *E. faecium* H108 isolado de queijo Beyaz é resistente à eritromicina e gentamicina.

E. faecium QP60 foi susceptível à vancomicina. Ressalta-se que a sensibilidade dos enterococos aos glicopeptídeos, como a vancomicina, é um critério fundamental para avaliar sua segurança. Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) é um problema significativo na área da saúde, uma vez que a vancomicina é frequentemente utilizada como última linha de defesa no tratamento de infecções nosocomiais causadas por enterococos multirresistentes (Terzić-Vidojević et al., 2021).

A crescente preocupação com a resistência aos antibióticos decorre da capacidade da microbiota adquirir e transferir genes de resistência para bactérias patogênicas (Sylvere et al.,

2023). A resistência aos antibióticos observada em alguns isolados de BAL deste estudo gera preocupações significativas sobre a viabilidade de seu uso como cultura na fabricação de produtos lácteos e também como probióticos. Entretanto, os resultados apresentados devem ser considerados preliminares, pois a susceptibilidade ou resistência a antibióticos observada *in vitro* nos isolados pode não refletir o comportamento *in vivo* (Giuliano et al., 2019; Pinchao et al., 2024), já que a resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência adquirida é transferida horizontalmente entre bactérias através de elementos genéticos móveis, como os plasmídeos. Em contraste, a resistência intrínseca é codificada no DNA cromossômico e não se transfere entre bactérias (Hamdaoui et al., 2024). Assim, a análise genômica com ferramentas de bioinformática pode confirmar a ausência ou a presença de genótipos e fenótipos associados à resistência aos antibióticos (Sylvere et al., 2023). Desse modo, são necessárias análises adicionais para investigar os mecanismos de resistência e as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos antibióticos.

3.3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

SLC foram obtidos a partir do crescimento das BAL em dois meios de cultivo, MRS e GM17, após 24 e 48 h de incubação. A atividade antibacteriana dos SLC foi avaliada por meio do ensaio de difusão em ágar contra *L. lactis* ATCC 1935 e *S. aureus* ATCC 25923. Apenas os SLC obtidos a partir do cultivo do isolado *E. faecium* QP60 em caldo MRS por 24 e 48 h e em caldo GM17 por 24 h apresentaram halos de inibição de 12, 11 e 8 mm, respectivamente (Figura 1). Os maiores halos foram observados após 24 h de incubação em ambos os meios avaliados.

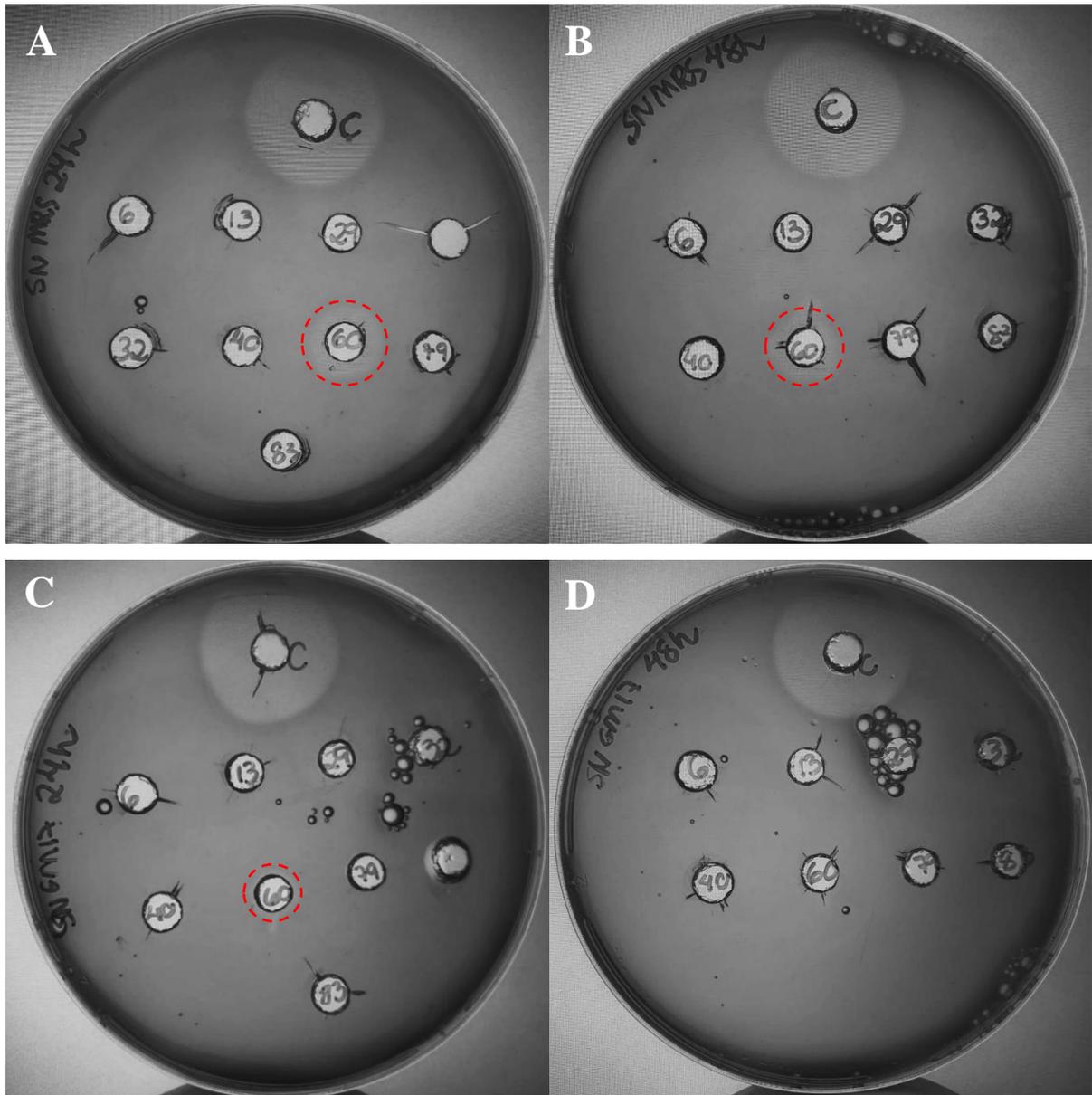


Figura 1. Atividade antibacteriana dos sobrenadantes livres de células neutralizados (SLC) dos oito isolados de bactérias lácticas (BAL) contra *L. lactis* ATCC 19435, pelo método de difusão em ágar: A) SN obtido a partir do cultivo dos isolados em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) após 24 h; B) SN obtido a partir do cultivo dos isolados em MRS após 48 h; C) SN obtido a partir do cultivo dos isolados em caldo M17 com glicose (GM17) após 24 h; e D) SN obtido a partir do cultivo dos isolados em GM17 após 48 h. Controle (C): nisina A a 1000 μ M. 6 = QP6; 13 = QP13; 29 = QP29; 32 = QP32; 40 = QP40; 60 = QP60; 79 = QP79 e 83 = QP83.

Os SLC obtidos a partir do cultivo de *E. faecium* QP60 em caldo MRS apresentaram os melhores resultados de atividade antibacteriana. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Yang et al. (2018), onde quatro cepas de BAL cultivadas em caldo MRS produziram níveis mais elevados de bacteriocinas quando comparado ao cultivo em caldo infusão de cérebro e coração (BHI). No mesmo estudo, foi citado que a produção de bacteriocina por BAL não foi detectada após 16 h de incubação em meio M17 em pesquisas anteriores do grupo (Yang et al.,

2018). Outros estudos também demonstraram que o meio MRS proporciona melhores resultados para a produção de bacteriocina em relação ao meio M17 (De Kwaadsteniet et al., 2005; Moraes et al., 2010; Todorov & Dicks, 2004).

O único isolado com atividade inibitória contra a cepa indicadora, QP60, foi identificado como pertencente ao gênero *Enterococcus*. Esses microrganismos são conhecidos pela produção de enterocinas, peptídeos de baixo peso molecular resistentes ao calor, geralmente incluídas nas bacteriocinas da classe II (Terzić-Vidojević et al., 2021). Diversos estudos identificaram cepas de *Enterococcus* capazes de produzir bacteriocinas que inibem o crescimento de bactérias indicadoras, como *L. lactis* HP, conhecida por sua sensibilidade a bacteriocinas como nisina e lacticina 481 (Alegria et al., 2010; Bravo et al., 2009; Fusieger et al., 2020; Perin et al., 2012; Ribeiro et al., 2016).

Nenhum SLC apresentou atividade inibitória contra *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 2).

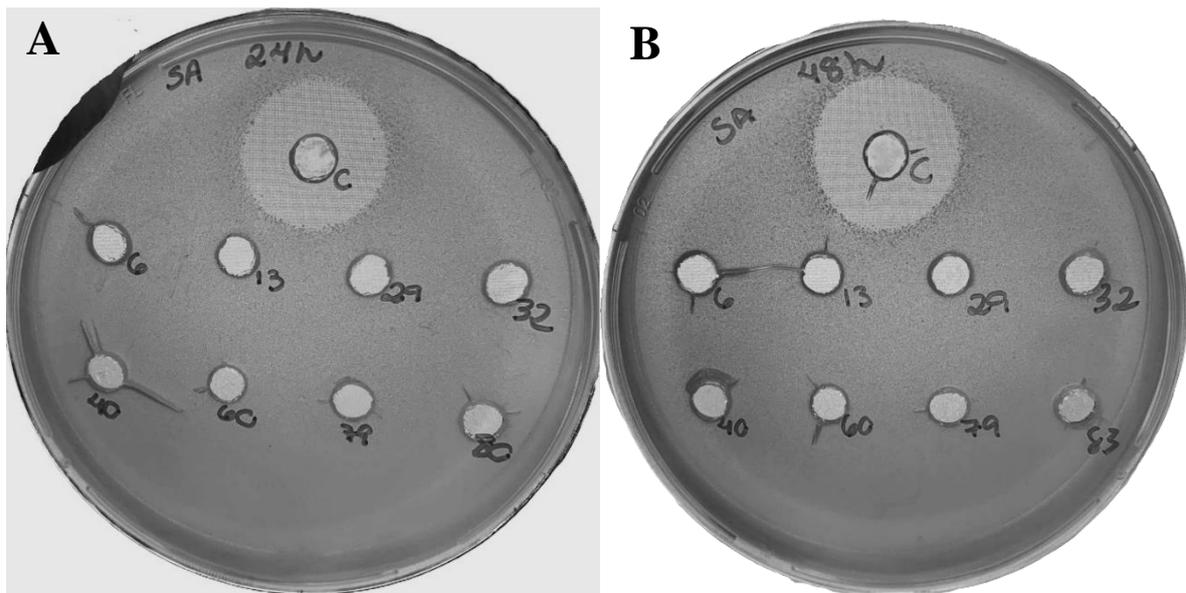


Figura 2. Atividade antibacteriana dos sobrenadantes livres de células neutralizados (SLC) de oito isolados de bactérias lácticas (BAL) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pelo método de difusão em ágar: A) SN obtido a partir do cultivo dos isolados em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) após 24 h; B) SN obtido a partir do cultivo dos isolados em MRS após 48 h. Controle (C): nisina A a 1000 µM.

Em um estudo realizado por Ribeiro et al. (2016), a cepa *L. lactis* L3A21M1 foi avaliada pelo ensaio de difusão em poços. Essa cepa produtora de bacteriocina demonstrou um amplo espectro de atividade, inibindo todas as outras cepas de BAL testadas, incluindo *L. lactis* HP, porém não teve efeito contra *S. aureus* ATCC 6553 e ATCC 29523. Por outro lado, a cepa conseguiu inibir cepas patogênicas de *Listeria monocytogenes*, sugerindo que novos testes

contra outros patógenos são necessários para avaliar o potencial antimicrobiano do isolado QP60.

3.4. PRODUÇÃO DE DIACETIL

A capacidade de produção de diacetil pelos isolados de BAL é apresentada na Tabela 3 e na Figura 3. Dentre os oito isolados, seis demonstraram a produção deste composto em diferentes intensidades, que variaram de fraca a forte. O diacetil é um composto volátil amplamente valorizado em produtos lácteos fermentados, como manteiga, queijos e iogurtes, por conferir um aroma e sabor característicos de manteiga fresca, essenciais para a qualidade sensorial desses alimentos (Mallia et al., 2008; Smit et al., 2005). A produção desse composto ocorre naturalmente durante a fermentação, sendo mediada por BAL que metabolizam o citrato presente no leite (Hosken et al., 2023).

Tabela 3. Produção de diacetil pelas BAL

Isolado	Produção de diacetil
<i>Streptococcus infantarius</i> QP6	++
<i>Streptococcus infantarius</i> QP13	++
<i>Streptococcus lutetiensis</i> QP29	++
<i>Streptococcus infantarius</i> QP32	++
<i>Lactococcus lactis</i> QP40	-
<i>Enterococcus faecium</i> QP60	+++
<i>Lactococcus lactis</i> QP79	+
<i>Lactococcus lactis</i> QP83	-

Coloração dos anéis classificada como fraco (+), médio (++), forte (+++) ou ausente (-).

Os quatro isolados de *Streptococcus* apresentaram média produção de diacetil. Em um estudo realizado por Dias et al. (2019), foi observado que, entre os gêneros identificados, *Streptococcus* teve o maior número de isolados produtores de diacetil, com uma taxa de 80%. Tsuda e Kodama (2021) relataram que a cepa *S. lutetiensis* PUHM1034 exibiu a maior produção de diacetil-acetoína entre as cepas analisadas e Engels et al. (2022) demonstraram que os níveis de diacetil aumentaram quando fermentações de proteínas vegetais ocorreram com *Streptococcus*.

O isolado *E. faecium* QP60 destacou-se pela intensa produção de diacetil. O gênero *Enterococcus* é frequentemente associado à produção de diacetil em queijos (Sanlibaba & Senturk, 2018). El Hatmi et al. (2018) observaram que o leite fermentado de dromedário apresentou maior conteúdo de diacetil quando fermentado por *E. faecium*, enquanto o leite de vaca fermentado com *Streptococcus macedonicus* teve um conteúdo superior de diacetil. Abedini et al. (2023) também observaram que *E. faecium* 96B4 produziu alta quantidade de diacetil (44,49 μmol) em leite UHT durante 24 h a 37 °C. Outras cepas de *Enterococcus*, como *Enterococcus durans* LAB280 e *E. faecium* GM75, foram reconhecidas por sua elevada capacidade de produzir diacetil (da Cunha et al., 2024; Martino et al., 2016).

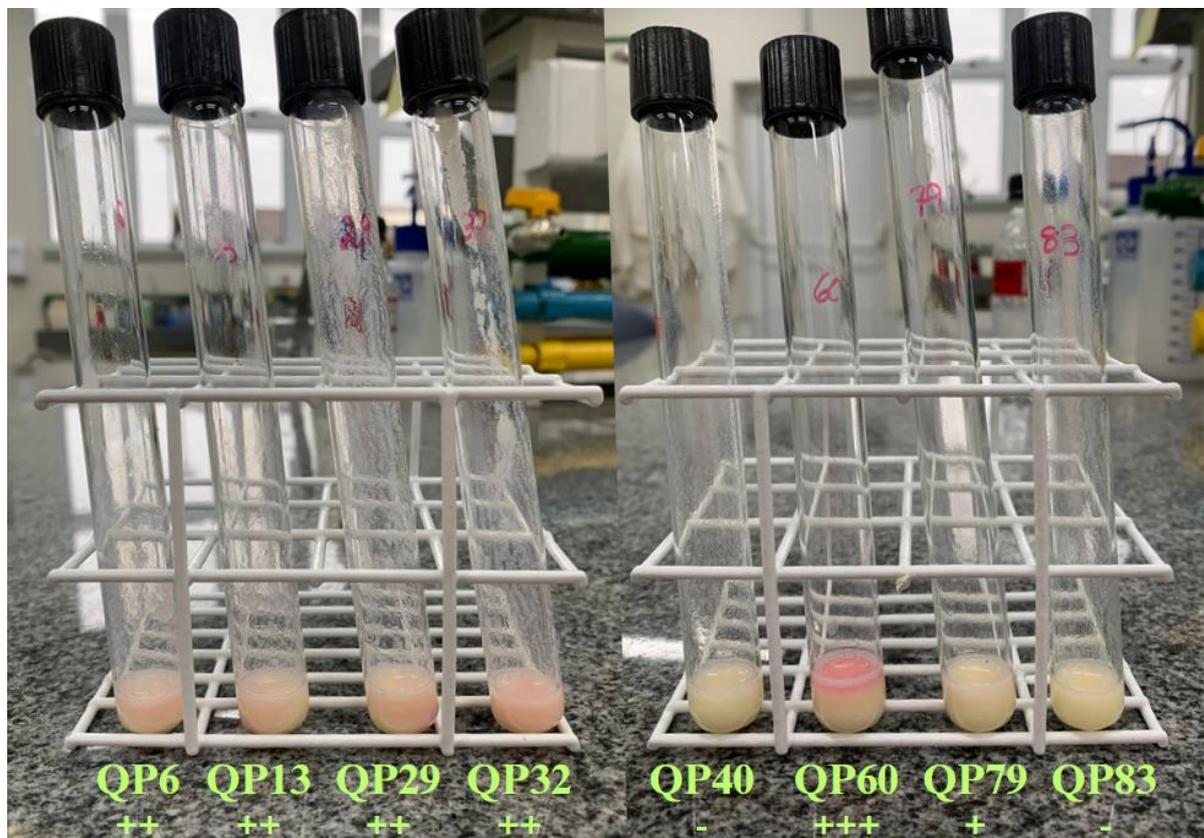


Figura 3. Formação de diacetil de acordo com a intensidade da coloração dos anéis formados no tubo que foram classificados como fraco (+), médio (++) , forte (+++) ou ausente (-).

Entre os isolados do gênero *Lactococcus*, apenas um foi capaz de produzir diacetil, porém em baixa quantidade, *L. lactis* QP79. Cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* são conhecidas pela capacidade de fermentar citrato produzindo diacetil e acetoína, compostos de sabor desejáveis em queijos curados específicos (Fusieger et al., 2020; Hamdaoui et al., 2024). O resultado encontrado neste estudo difere dos encontrados por Fusieger et al. (2020),

onde 17 isolados de *L. lactis* mostraram ser capazes de fermentar citrato e 20 foram capazes de produzir diacetil.

3.5. EFEITO DA TEMPERATURA NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E ACIDIFICAÇÃO DO LEITE INTEGRAL PELAS BAL

Os isolados bacterianos dos gêneros *Streptococcus* sp. (QP6, QP13, QP29 e QP32), *Lactococcus* sp. (QP40, QP79 e QP83) e *Enterococcus* sp. (QP60) foram avaliados quanto à cinética de crescimento e alteração do pH do leite integral ao longo de 48 h (Figura 4).

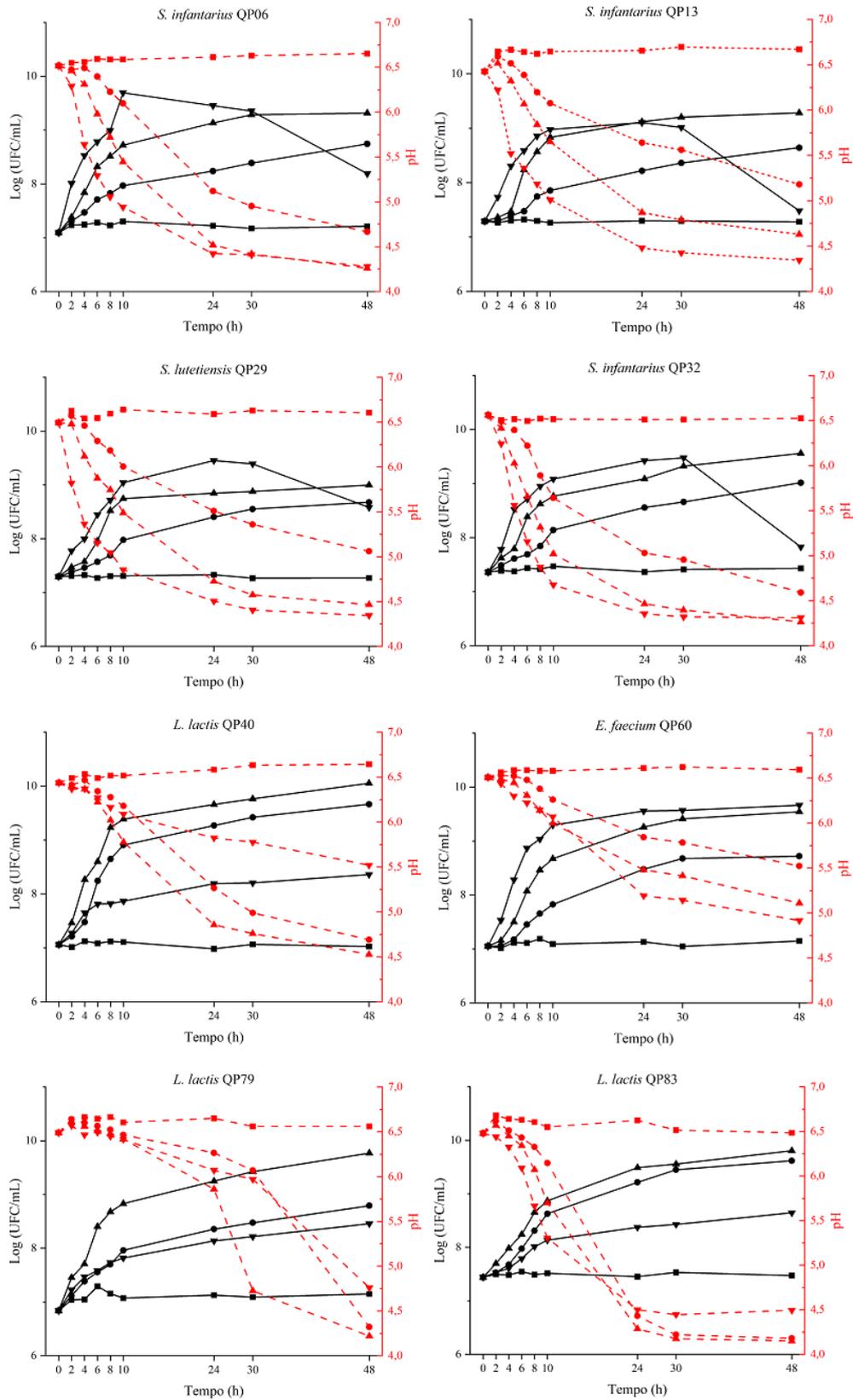


Figura 4. Cinética de crescimento e variação do pH do leite integral na presença de BAL isoladas do soro-fermento de queijo Porungo sob diferentes temperaturas: 8 °C (quadrado), 25 °C (círculo), 30 °C (triângulo) e 40 °C (triângulo invertido). A linha contínua preta representa os valores de log (UFC/mL) e a linha tracejada vermelha os valores de pH.

A velocidade específica de crescimento (μ) foi calculada a partir das contagens obtidas nas primeiras 6, 8 e 10 h de cultivo a 25, 30 e 40 °C (Tabela 3).

Tabela 4. Velocidade específica de crescimento (μ) e coeficiente de determinação (R^2) dos isolados em leite integral a 25, 30 e 40 °C.

Isolado	Temperatura (°C)	Tempo de incubação (h)					
		6		8		10	
		μ (h ⁻¹)	R^2	μ (h ⁻¹)	R^2	μ (h ⁻¹)	R^2
QP6	25	0,4607	0,9949	0,4268	0,9908	0,4048	0,9902
	30	0,9546	0,9878	0,8720	0,9839	0,7907	0,9752
	40	1,2866	0,9338	1,0532	0,9074	1,0662	0,9460
QP13	25	0,1505	0,8927	0,2527	0,8439	0,2819	0,9046
	30	0,6795	0,7560	0,7910	0,8780	0,7966	0,9273
	40	1,0289	0,9846	0,9179	0,9761	0,7950	0,9519
QP29	25	0,2061	0,9952	0,2254	0,9908	0,2924	0,9318
	30	0,4801	0,9267	0,6762	0,9058	0,7087	0,9462
	40	0,8465	0,9829	0,8090	0,9884	0,7903	0,9923
QP32	25	0,3321	0,9507	0,2684	0,9927	0,2562	0,9885
	30	0,7473	0,9285	0,7573	0,9637	0,6996	0,9668
	40	1,1049	0,9575	0,9465	0,9449	0,8096	0,9228
QP40	25	0,8777	0,8774	0,9688	0,9379	0,9416	0,9605
	30	1,2497	0,9745	1,2626	0,9873	1,1368	0,9752
	40	0,6088	0,9788	0,4745	0,9108	0,3838	0,8620
QP60	25	0,3048	0,8184	0,3692	0,9041	0,3910	0,9450
	30	0,7841	0,9137	0,8614	0,9549	0,8294	0,9699
	40	1,4272	0,9937	1,2213	0,9683	1,0727	0,9526
QP79	25	0,5552	0,9891	0,4965	0,9796	0,4948	0,9881
	30	1,1386	0,9731	1,0651	0,9798	0,9421	0,9636
	40	0,5710	0,9448	0,4946	0,9409	0,4980	0,9277
QP83	25	0,4027	0,9310	0,5031	0,9402	0,5647	0,9572
	30	0,6171	0,9997	0,6842	0,9904	0,6756	0,9941
	40	0,2577	0,9573	0,3223	0,9484	0,3345	0,9703

Com base nos resultados apresentados, é possível verificar que os quatro isolados de *Streptococcus* sp. (QP6, QP13, QP29 e QP32) apresentaram a fase lag mais curta entre nas temperaturas de 30 e 40 °C, indicando uma rápida adaptação ao novo ambiente (Figura 4). Nessas temperaturas, observou-se também maiores valores de velocidade específica de crescimento (μ) nos tempos de 6, 8 e 10 h (Tabela 4). Comportamento semelhante foi demonstrado por Vaningelgem et al. (2004), onde *S. thermophilus* ST 111 teve um crescimento ótimo na faixa de temperatura de 32 a 46 °C, com a μ variando de 1,00 a 1,51 h⁻¹, e um crescimento mais lento a 25 °C com μ igual a 0,33 h⁻¹.

Em fermentações industriais, um fator significativo na síntese de ácido lático é a temperatura operacional adequada, influenciando tanto o crescimento dos microrganismos quanto a eficiência do processo fermentativo (Qin et al., 2012). Assim, microrganismos com alta taxa de crescimento e capacidade de redução rápida do pH são fortemente desejados pela indústria. Entre os isolados de *Streptococcus*, o QP6 teve a maior μ em 6 h a 40 °C (1,2866 h⁻¹) (Tabela 4), alcançando 8,78 log UFC/mL e um pH 5,29 (Figura 4). Essas características reforçam o caráter termofílico desse grupo de microrganismo (Kort et al., 2015; Min et al., 2020). Aghababaie et al. (2015) obtiveram μ estimadas a partir de dados de biomassa em g/L de 1,18 h⁻¹ para a mesma espécie a 42,8 °C. Salmazo et al. (2023) demonstraram que a μ para *S. thermophilus* incubado a 41 °C foi próxima de 1,24 h⁻¹. Contrastando com tais resultados, os valores de μ encontrados neste estudo podem ser considerados promissores, uma vez que uma μ mais rápida pode reduzir o tempo necessário para atingir uma população celular desejada, potencialmente diminuindo os custos de produção e aumentando a eficiência do processo.

Todos os isolados de *Streptococcus*, apesar de exibirem crescimento acelerado a 40 °C, mostraram uma redução na viabilidade celular ao longo do tempo, resultando em contagens mais baixas nessa temperatura em períodos mais longos. O declínio na curva de crescimento pode ser atribuído a acidificação do meio (Min et al., 2020; Papadimitriou et al., 2016; Qin et al., 2012), já que as maiores reduções de pH foram à 40 °C para os quatro isolados de *Streptococcus* sp.. Esses resultados são consistentes com os dados de um estudo sobre *S. thermophilus* St20, que mostrou uma μ de 2,2 h⁻¹ a 44 °C em um meio complexo contendo lactose, triptona, extrato de levedura, macro e microelementos, e tween 80. No entanto, *S. thermophilus* St20 revelou ser particularmente sensível à acidificação, com uma rápida redução em sua μ à medida que o pH do meio diminui (Adamberg et al., 2003). Wu et al. (2023) obtiveram contagens de células viáveis de cepas de *S. thermophilus* significativamente maiores em 37 °C do que em 42 °C em leite fermentado. Em estudo feito por Tarrah et al. (2018),

também foi observado uma diminuição generalizada no desempenho de crescimento a 42 °C ao longo de 24 h para duas espécies investigadas, *S. macedonicus* e *S. thermophilus*, ambas de origem láctea, quando cultivadas em meio M17 contendo 0,5% de lactose.

S. infantarius QP6 foi o único isolado de *Streptococcus* sp. que demonstrou as maiores μ , tanto em 30 °C quanto em 40 °C. Isso sugere que o isolado pode ser uma boa cultura iniciadora para processos como a fabricação de queijos, onde se trabalha com essa faixa de temperaturas e não se deseja uma acidificação excessiva, evitando um sabor ácido desagradável no produto final (Tidona et al., 2020).

Por outro lado, *S. lutetiensis* QP29 e *S. infantarius* QP32 destacaram-se por reduzir o pH do leite mais rapidamente, atingindo valores de 5,16 e 5,15 após 6 h e 4,85 e 4,67 após 10 h de incubação a 40 °C, respectivamente (Figura 4). No entanto, eles apresentaram as menores μ nessa temperatura. A temperatura está relacionada com a produção de ácido láctico, uma vez que afeta a atividade de enzimas essenciais. Por exemplo, um aumento na temperatura de 37 °C para 42 °C estimula a atividade da β -galactosidase, uma enzima crucial na síntese de ácido láctico (Guo et al., 2021; Ustok et al., 2010). Estudos com *Streptococcus* mostraram que ao aumentar a temperatura para 42 °C houve uma redução de 2 h para que o processo de fermentação fosse concluído, considerando o pH final de 4,6 (Guo et al., 2021). Khanal e Lucey (2018) observaram que a redução do pH do leite até 4,5 por duas cepas de *S. thermophilus*, DGCC7785 e St-143, também foi mais rápida entre 39 e 45 °C do que a 33 °C.

Além da produção de ácido, a temperatura de incubação pode interferir em propriedades físicas importantes do iogurte, como o aumento da separação do soro em temperaturas mais altas. O aumento da temperatura resulta em uma rede proteica mais frágil e um gel menos firme, prejudicando a viscosidade e as características sensoriais ideais (Nguyen et al., 2014). Apesar do aumento nos custos e tempos de produção, a redução da temperatura de 43 a 45 °C para 32 a 39 °C melhora a viscosidade, suavidade e maciez do iogurte devido à formação de uma matriz proteica mais densa (Guo et al., 2021; S. Wu et al., 2009). Outros produtos obtidos durante a fermentação por *Streptococcus* também são favorecidos em temperaturas mais altas, como a síntese de exopolissacarídeos a temperaturas próximas a 40 °C (Khanal & Lucey, 2018; Zisu & Shah, 2003) e bacteriocinas, tendo sua maior produção em uma faixa de 37 a 40 °C (Poirazi et al., 2007; Yang et al., 2018).

Quanto aos isolados QP40, QP79 e QP83, identificados com *L. lactis*, todos apresentaram melhores μ (Tabela 4) e contagem de células maiores (Figura 4) durante o processo fermentativo a 30 °C. Um resultado esperado, já que são bactérias do gênero *Lactococcus*, classificadas como mesófilas e têm seu crescimento ótimo em torno de 30 °C

(Chen et al., 2015; Miyoshi et al., 2003; Savoie et al., 2007). Adamberg et al. (2003) demonstraram que *L. lactis* subsp. *lactis* 1387 cultivado em meio contendo lactose, triptona, extrato de levedura, macro e microelementos e tween 80 teve a μ aumentada de 0,4 para 0,95 h^{-1} como resultado do aumento da temperatura de 25 para 38 °C, mas diminuiu em temperaturas acima de 38 °C.

Os isolados de *Lactococcus* também apresentaram maiores reduções de pH a 30 °C. *L. lactis* QP83 apresentou a maior e mais rápida redução do pH entre os isolados. Em um estudo feito por Fusieger et al. (2020), foram avaliadas características tecnológicas de 23 isolados de *L. lactis* subsp. *lactis* obtidos de leite e queijos. De forma semelhante a *L. lactis* QP83, foi observado que dois isolados, em especial, apresentaram alta capacidade acidificante devido à sua capacidade de reduzir mais de duas unidades de pH após 24 h. Isso é fundamental, pois a rápida queda do pH no início do processo favorece a coagulação do leite e ajuda a inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis (Yoon & Kim, 2022).

E. faecium QP60 apresentou a segunda maior μ , variando de 1,43 a 1,07 h^{-1} entre 6 e 10 h de cultivo. Além disso, apresentou uma alta contagem de células após 48 h de incubação a 40 °C (Figura 4). Esses resultados corroboram com o estudo de Zanoni et al. (1993), que desenvolveram modelos matemáticos para prever o crescimento de *E. faecium* em mortadela, apontando uma temperatura ótima de 42 °C. Da mesma forma, Berghe et al. (2006) identificaram uma temperatura ótima de crescimento de 42,7 °C, reforçando o caráter termofílico da cepa. Em um estudo feito por Gardini et al. (2001), que investigou o impacto combinado da temperatura, pH e concentração de NaCl sobre o crescimento de *E. faecalis* EF37, foi identificado que a temperatura era o fator determinante na redução da fase de latência, com a menor duração observada em torno de 38 °C. Além disso, constatou-se que o aumento da temperatura, dentro do intervalo analisado de 16 a 44 °C, resultou em um incremento na μ .

O isolado QP60 demonstrou a maior capacidade de redução do pH quando cultivado a 40 °C. Contudo, nesta temperatura, este isolado apresentou a menor redução de pH quando comparado aos outros sete isolados (Figura 4), demonstrando não ser uma bactéria acidificante eficaz. Em contraste, estudos mostraram que *E. faecium* CM4 e 2CM1, isolados de leite cru de vaca, demonstraram uma acidificação mais eficaz, com pH reduzido para 3,85–4,05 após 48 h de incubação em MRS (Banwo et al., 2013). Em outro estudo, *E. faecalis* FAIR-E 229 apresentou um pH mais alto no leite desnatado (4,8) em comparação ao MRS, o que pode ser atribuído ao metabolismo do citrato no leite, gerando dióxido de carbono que atua como tampão, resultando em uma acidificação menos intensa (Sarantinopoulos et al., 2001). No entanto, cepas de *Enterococcus* são geralmente utilizadas como co-culturas em processamento

de queijos pela sua característica termofílica, aliada à acidez suave alcançada por essas culturas no final da fabricação do queijo (Giraffa, 2003).

3.6. APLICAÇÃO DE BAL ISOLADAS DO SORO-FERMENTO DE QUEIJO PORUNGO NA ELABORAÇÃO DE QUEIJO MINAS PADRÃO E CONTROLE DE *S. aureus*

3.6.1. Características físico-químicas

A Tabela 5 apresenta os valores de pH em diversas etapas do processo de produção de queijo. No geral, a variação do pH nas diferentes fases demonstra a eficiência das culturas em promover a acidificação do meio ao longo do processamento. O tratamento QP6QP60 destacou-se por apresentar a maior redução de pH após a etapa de mexedura, onde exibiu um pH significativamente mais baixo em comparação ao tratamento controle, evidenciando capacidade acidificante.

Tabela 5. Variação do pH em diferentes etapas do processamento.

Tratamento	pH leite	pH pós-maturação	pH pós-corte (soro)	pH pós-mexedura (soro)
C	6,675	6,520	6,395	6,300 ^a
CQP60	6,610	6,495	6,370	6,180 ^{ab}
QP6QP60	6,565	6,310	6,270	5,945 ^b

C: controle com 1% de cultura tipo O (50% *L. lactis* e 50% *L. cremoris*). CQP60: 1% cultura tipo O e 1% do isolado *E. faecium* QP60. QP6QP60: 1% de culturas coadjuvantes (50% *S. infantarius* QP6 e 50% *E. faecium* QP60). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Quando nenhuma letra minúscula ou maiúscula é mostrada, significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo tempo ou entre os tempos dentro de um mesmo tratamento, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A Tabela 6 apresenta as características físico-químicas como pH, umidade e atividade de água (A_w) do queijo Minas Padrão durante o período de maturação. Esses dados são essenciais para entender como o processo de maturação e os tratamentos aplicados influenciaram as propriedades do queijo.

Tabela 6. Características físico-químicas do queijo Minas Padrão durante o período de maturação

Tempo (dias)	Tratamento	pH	Umidade (%)	Aw
10	C	5,905 ^a	31,4792 ^b	0.9250 ^b
	CQP60	5,845 ^{ab}	33,0883 ^{ab}	0.9379 ^{abB}
	QP6QP60	5,735 ^b	35,0158 ^{aA}	0.9491 ^a
30	C	6,070 ^a	30,1264 ^b	0.9412
	CQP60	5,650 ^c	31,7748 ^a	0.9519 ^A
	QP6QP60	5,785 ^b	30,3850 ^{abB}	0.9466 ^c

C: controle com 1% de cultura tipo O (50% *L. lactis* e 50% *L. cremoris*). CQP60: 1% cultura tipo O e 1% do isolado *E. faecium* QP60. QP6QP60: 1% de culturas coadjuvantes (50% *S. infantarius* QP6 e 50% *E. faecium* QP60). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em um mesmo tempo pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tempos de um mesmo tratamento pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Quando nenhuma letra minúscula ou maiúscula é mostrada, significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo tempo ou entre os tempos dentro de um mesmo tratamento, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O pH do queijo variou de 6,070 a 5,650 ao longo do período de maturação (Tabela 6). Após 10 dias de maturação, o queijo controle (C), elaborado da forma tradicional pela adição de cultura iniciadora tipo O, composta por *L. lactis* e *L. cremoris*, apresentou o pH mais elevado (5,905), não diferindo significativamente ($P > 0,05$) do queijo elaborado com a cultura tipo O combinada com o isolado QP60 (CQP60). Com 10 dias de fabricação, o queijo elaborado com a inoculação dos isolados QP6 e QP60 como culturas iniciadoras (QP6QP60) apresentou o menor valor de pH (5,735), diferindo estatisticamente de C, porém sem diferença de CQP60. Aos 30 dias, o pH de C continuou sendo o mais alto entre os tratamentos ($P < 0,05$), enquanto em QP6QP60, ocorreu um leve aumento em relação ao valor inicial, embora seja estatisticamente igual ($P > 0,05$) à média reportada para 10 dias. Os valores de pH observados neste estudo estão ligeiramente acima daqueles relatados por Felício et al. (2016), que analisaram queijos Minas Padrão ao longo de 14 dias de maturação e encontraram valores de pH variando entre 5,58 e 5,15 em amostras elaboradas com culturas de *L. lactis* e *Lactobacillus acidophilus*. Da mesma forma, Silva et al. (2023) relataram valores de pH ainda mais baixos, com uma média de 5,4 em 18 amostras de queijo Minas Padrão, produzidas a partir de leite pasteurizado e coletadas aleatoriamente em diferentes estabelecimentos no Brasil.

O aumento do pH durante o período de maturação em todos os tratamentos pode estar associada à proteólise, resultando em um efeito alcalinizante devido à liberação de aminas e amônia, subprodutos da degradação proteica ao longo desse processo (de Souza et al., 2021; Levak et al., 2023). Por outro lado, os menores valores de pH observados nos tratamentos CQP60 e QP6QP60, em comparação com C, podem estar relacionados à atividade metabólica das BAL, uma vez que a redução do pH no queijo é principalmente resultado da fermentação da lactose, durante a qual as BAL produzem ácido lático (Murtaza et al., 2024).

Em relação à umidade do queijo Minas Padrão, observa-se que, em 10 dias, o tratamento QP6QP60 apresentou o maior teor de umidade (35,0158%), diferindo significativamente ($P < 0,05$) de C (31,4792%), mas sem diferença para o tratamento CQP60. Observou-se redução no teor de umidade para todos os queijos após 30 dias de fabricação, sendo a maior variação observada para QP6QP60. Pinto et al. (2011) relataram que a umidade do queijo Minas Tradicional Serro, produzido com leite cru, apresentou uma redução significativa ao longo dos 60 dias de armazenamento, variando de 44,63% a 23,12%, o que corresponde a uma redução de aproximadamente 48%. Campos et al. (2022) também observaram uma diminuição no teor de umidade, de 53,48% para 43,87%, em queijos Minas maturados por 30 dias a temperatura variando de 10 a 12 °C e 85% de umidade relativa.

Segundo o padrão de identidade para queijo Minas Padrão estabelecido pela legislação brasileira (Brasil, 2020), todos os tratamentos analisados neste estudo estão fora do padrão de umidade, que exige um mínimo de 36%. No entanto, os queijos produzidos neste estudo eram menores em tamanho/peso em comparação com os normalmente encontrados no mercado, o que resultou em uma maior relação área de superfície e volume do queijo, promovendo maior exposição ao ambiente e, conseqüentemente, intensificando a perda de água e levando a níveis de umidade abaixo dos exigidos (Levak et al., 2023).

A A_w variou significativamente ao longo do tempo, com as maiores diferenças notadas aos 10 dias. QP6QP60 apresentou o maior valor de A_w , enquanto C mostrou o menor ($p < 0,05$). Ainda assim, esses valores permanecem próximos à média de 0,93 relatada por Silva et al. (2023) em 18 amostras de queijo Minas Padrão, produzidas a partir de leite pasteurizado e coletadas aleatoriamente em diferentes estabelecimentos no Brasil.

Aos 30 dias, todos os tratamentos apresentaram aumento na A_w , mas apenas QP6QP60 teve uma diferença estatisticamente significativa em relação aos 10 dias. Esses resultados sugerem que a embalagem à vácuo, aplicada a partir do décimo dia, pode ter contribuído para a manutenção da A_w . Em estudo feito por Franco et al. (2023), indicam que queijos espanhóis embalados à vácuo mantêm a A_w constante durante seis meses de armazenamento, ao contrário

dos queijos não embalados, que apresentaram uma redução na A_w . Em outro estudo, a aplicação de revestimentos à base de zeína foi analisada como uma opção de embalagem para queijo Minas Padrão, resultando em uma menor perda de umidade em comparação ao queijo não embalado, de forma semelhante a embalagem plástica (Pena-Serna et al., 2016).

3.6.2. Análise reológica

A Tabela 6 apresenta o perfil de textura do queijo Minas Padrão ao longo do período de maturação, com foco nas propriedades texturais dureza, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade.

Tabela 6. Perfil de textura do queijo Minas Padrão durante o período de maturação.

Tempo (dias)	Tratamento	Dureza (N)	Elasticidade	Coesividade	Gomosidade	Mastigabilidade
10	C	177,42 ^B	0,8770	0,7312 ^a	130,00 ^B	114,20
	CQP60	197,93	0,8452	0,6997 ^b	138,52	117,48
	QP6QP60	186,71 ^B	0,8575	0,7170 ^{ab}	133,92 ^B	114,91 ^B
30	C	211,31 ^{bA}	0,8575	0,7447	157,36 ^{abA}	135,10
	CQP60	204,57 ^b	0,8235	0,7212	147,37 ^b	121,32
	QP6QP60	249,97 ^{aA}	0,7902	0,7130	178,36 ^{aA}	140,89 ^A

C: controle com 1% de cultura tipo O (50% *L. lactis* e 50% *L. cremoris*). CQP60: 1% cultura tipo O e 1% do isolado *E. faecium* QP60. QP6QP60: 1% de culturas coadjuvantes (50% *S. infantarius* QP6 e 50% *E. faecium* QP60). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em um mesmo tempo pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tempos de um mesmo tratamento pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Quando nenhuma letra minúscula ou maiúscula é mostrada, significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo tempo ou entre os tempos dentro de um mesmo tratamento, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em relação à dureza, houve um aumento significativo ao longo do tempo em todos os tratamentos. No décimo dia, os valores de dureza foram relativamente próximos entre os tratamentos, com CQP60 apresentando a maior dureza, porém sem diferença estatística entre os outros dois tratamentos. No entanto, aos 30 dias, a dureza aumentou consideravelmente, especialmente para QP6QP60, que atingiu 249,97 N, indicando que este tratamento resultou em

uma textura mais firme após a maturação. As diferenças observadas foram estatisticamente significativas entre os tratamentos e demonstram que BAL podem modificar a estrutura da matriz do queijo por meio de sua ação proteolítica durante o período de armazenamento, embora o impacto dessa modificação dependa da cepa específica utilizada (Prezzi et al., 2020).

Apesar de a proteólise contribuir para a diminuição da dureza do queijo, a sinérese também foi observada no queijo embalado e resultou em uma redução do teor de umidade ao longo da maturação (Tabela 6). Essa perda de umidade, por sua vez, provocou um aumento na dureza dos queijos, corroborando com outros estudos que associam a acidificação do queijo Minas durante o armazenamento ao aumento da dureza, possivelmente devido à sinérese (Costa et al., 2019). Menores teores de umidade aumentaram os valores de dureza para queijos Minas Frescal com redução de sódio (Lima et al., 2024) e para queijo Cheddar com baixo teor de gordura (Murtaza et al., 2024).

A elasticidade, que mede a capacidade do queijo de retornar à sua forma original após compressão (Paximada et al., 2021), não diferiu estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos nos dois tempos avaliados e entre os tempos 10 e 30 dias quando se comparou as médias do mesmo tratamento.

A coesividade, que mede a resistência interna de um produto à desintegração, é um indicador crucial da sua integridade estrutural (Murtaza et al., 2024). No tratamento CQP60, observou-se que a coesividade era significativamente menor aos 10 dias de maturação em comparação com C, mas essa diferença não se manteve aos 30 dias. A coesividade pode aumentar com a diminuição da proteólise, o que é corroborado pelas menores contagens de BAL no queijo controle deste estudo. Embora as diferenças entre os tratamentos sejam sutis, elas são significativas e não apresentaram redução ao longo do tempo como demonstrado por Lima et al. (2024), em queijo Minas Frescal com teor reduzido de sódio.

Em relação à gomosidade, que resulta da combinação de dureza, coesividade e elasticidade, não houve diferença significativa no período de 10 dias. No entanto, aos 30 dias, o tratamento CQP60 mostrou uma redução significativa em comparação com o tratamento QP6QP60. Durante os 30 dias, C e QP6QP60 apresentaram um aumento significativo nesse parâmetro. Quanto à mastigabilidade, que mede a energia necessária para mastigar o queijo, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), exceto para QP6QP60, que apresentou um aumento significativo aos 30 dias. A umidade pode ter contribuído para as variações observadas na gomosidade e mastigabilidade em alguns dos tratamentos, conforme encontrado em outros estudos (Dimitreli & Thomareis, 2007; Pinto et al., 2011). De modo geral, os níveis de gomosidade e mastigabilidade estão ligados à dureza do queijo, já que uma maior

dureza sugere uma estrutura interna mais compacta, o que aumenta tanto a gomosidade quanto a mastigabilidade (Lima et al., 2024).

3.6.3. Cor instrumental

Os resultados dos parâmetros de cor do queijo Minas Padrão durante o período de maturação, avaliados tanto na superfície externa (casca) quanto no interior do queijo, podem ser observados na Tabela 7. Os parâmetros de cor medidos incluem a luminosidade (L^*), que reflete a claridade da cor, o valor de a^* , que indica a tendência ao vermelho ou verde, e o valor de b^* , que reflete a tendência ao amarelo ou azul (Maciel et al., 2022).

Tabela 7. Parâmetros de cor do queijo Minas Padrão durante o período de maturação.

Tempo (dias)	Tratamen to	Superfície externa			Interior		
		L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
10	C	64,42 ^{ab}	-2.0100 ^b	8,7325 ^A	78,78 ^A	-1,1850 ^b	9,2175 ^A
	CQP60	60,78 ^{bb}	-1.3519 ^a	9,4431	80,14 ^A	0,2737 ^{aA}	11,5819
	QP6QP60	55,31 ^{cb}	-1.2394 ^{aA}	8,8025	81,03 ^A	-0,3737 ^{abA}	10,3281 ^A
30	C	72,85 ^{aA}	-1.9569 ^b	7,3325 ^{bb}	75,32 ^{ab}	-1,8112 ^b	9,5506 ^{bb}
	CQP60	72,03 ^{abA}	-1.1281 ^a	8,6512 ^a	74,25 ^{ab}	-0,8844 ^{ab}	10,8862 ^a
	QP6QP60	69,88 ^{ba}	-1.8194 ^{bb}	7,1394 ^b	72,14 ^{bb}	-1,5225 ^{bb}	9,6056 ^{bb}

C: controle com 1% de cultura tipo O (50% *L. lactis* e 50% *L. cremoris*). CQP60: 1% cultura tipo O e 1% do isolado *E. faecium* QP60. QP6QP60: 1% de culturas coadjuvantes (50% *S. infantarius* QP6 e 50% *E. faecium* QP60). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em um mesmo tempo pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tempos de um mesmo tratamento pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Quando nenhuma letra minúscula ou maiúscula é mostrada, significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo tempo ou entre os tempos dentro de um mesmo tratamento, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A luminosidade (L^*) teve uma variação significativa entre os tratamentos e ao longo do tempo. A superfície externa de C apresentou a maior luminosidade tanto aos 10 quanto aos 30 dias de maturação, indicando uma superfície mais clara em comparação com os outros tratamentos ao longo do período de maturação. No interior do queijo, no entanto, a luminosidade diminuiu progressivamente, especialmente no tratamento QP6QP60, sugerindo

um escurecimento interno conforme a maturação avançou. De forma semelhante, estudos anteriores observaram uma diminuição no valor de L^* durante a maturação, refletindo uma redução na luminosidade das amostras coletadas de diferentes pontos dos pedaços de queijo Minas Artesanal do Serro (Pinto et al., 2011). No entanto, Centeno et al. (2022) observou que o queijo tipo Cebreiro, produzidos com uma cultura comercial de *E. faecium*, apresentou a superfície externa (90,5) ligeiramente mais escura que o interior (92,9) do queijo, além de nenhuma das partes diferenciar significativamente do controle (cultura iniciadora tipo O).

O parâmetro a^* , que indica a tendência ao vermelho (valores positivos) ou ao verde (valores negativos), mostrou diferenças significativas na superfície externa dos queijos. Aos 10 dias, C apresentou o menor valor de a^* ($P < 0,05$), indicando uma maior tendência ao verde em comparação com os demais tratamentos. Aos 30 dias, CQP60 se destacou estatisticamente em relação aos outros. Durante o período de maturação, apenas QP6QP60 apresentou um aumento na tendência ao verde na superfície externa com 30 dias. No interior do queijo, observou-se uma redução na tendência ao verde, especialmente em CQP60, que se aproxima de valores mais neutros ou levemente vermelhos.

Quanto ao parâmetro b^* , que reflete a tendência ao amarelo (valores positivos) ou ao azul (valores negativos), foi mais alto no interior do queijo em todos os tratamentos. Aos 10 dias, o tratamento CQP60 apresentou a maior tendência ao amarelo, tanto na superfície externa quanto no interior, indicando uma coloração mais amarelada. No entanto, aos 30 dias, há uma redução geral nos valores de b^* , especialmente na superfície externa de C. Em QP6QP60 também se observou uma redução, embora menos acentuada. Um aumento nos parâmetros a^* e b^* era esperado, já que demonstra o desenvolvimento da cor vermelha e amarela, respectivamente, à medida que o queijo matura (Pinto et al., 2011).

3.6.4. Análise microbiológica

Os queijos produzidos sem a inoculação de *S. aureus*, apresentaram contagens de BAL similares, em torno de 7,5 log UFC/g, não diferindo estatisticamente ($P > 0,05$) tanto entre os tratamentos para um mesmo tempo quanto entre diferentes tempos para um mesmo tratamento (Figura 5).

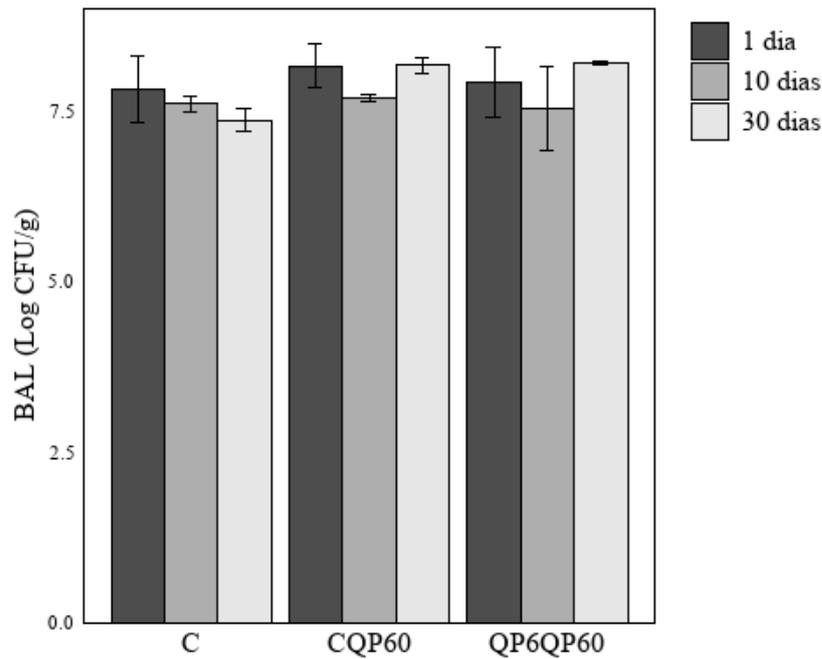


Figura 5. Contagens de BAL (log UFC/g) em queijo Minas Padrão não inoculados com *S. aureus*. C: controle com 1% de cultura tipo O (50% *L. lactis* e 50% *L. cremoris*). CQP60: 1% cultura tipo O e 1% do isolado *E. faecium* QP60. QP6QP60: 1% de culturas coadjuvantes (50% *S. infantarius* QP6 e 50% *E. faecium* QP60). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em um mesmo tempo pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tempos de um mesmo tratamento pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Quando nenhuma letra minúscula ou maiúscula é mostrada, significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo tempo ou entre os tempos dentro de um mesmo tratamento, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na Figura 6 é apresentada as contagens de BAL e *S. aureus* nos três diferentes tratamentos ao longo de 60 dias.

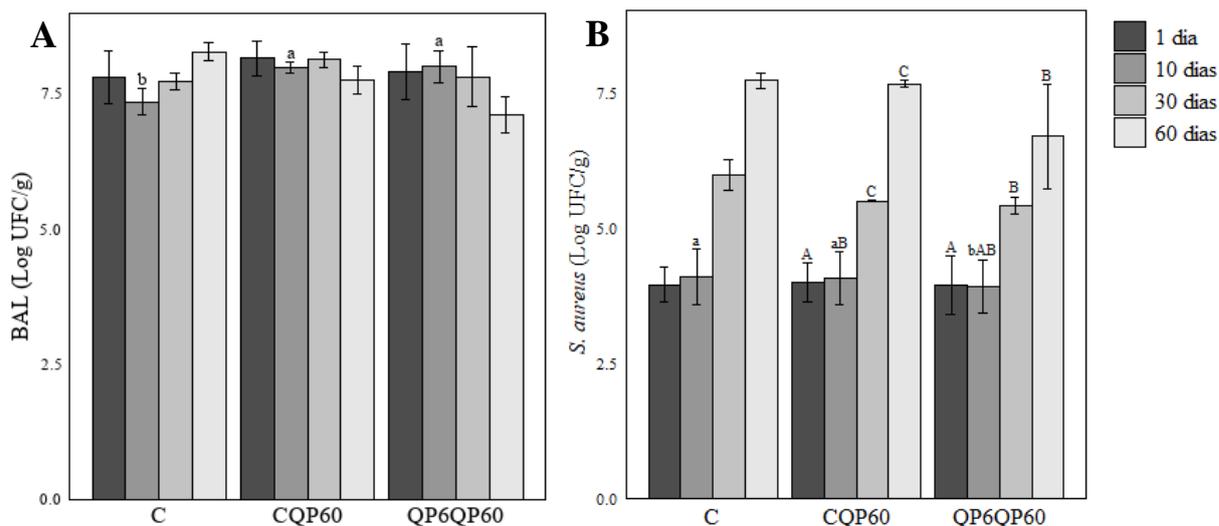


Figura 6. Contagens de bactérias do ácido lático (BAL) e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Padrão inoculados com *S. aureus*. A) Contagens de BAL (log UFC/g). B) Contagens de *S. aureus* (log UFC/g). C: controle com 1% de cultura tipo O (50% *L. lactis* e 50% *L. cremoris*). CQP60: 1% cultura tipo O e 1% do isolado *E. faecium* QP60. QP6QP60: 1% de culturas coadjuvantes (50% *S. infantarius* QP6 e 50% *E. faecium* QP60). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em um mesmo tempo pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tempos de um mesmo tratamento pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Quando nenhuma letra minúscula ou maiúscula é mostrada, significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo tempo ou entre os tempos dentro de um mesmo tratamento, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Assim como observado nos queijos não inoculados com *S. aureus* (Figura 5), não houve diferença estatística para a contagem de BAL na maioria dos tratamentos, exceto para o controle que apresentou uma contagem significativamente menor ($P < 0,05$) no tempo de 10 dias (Figura 6A). Considerando os valores obtidos ao longo do período de armazenamento, observou-se uma população com contagem estabilizada em torno de 7,5 log UFC/g. Esses dados sugerem que a presença concomitante de *S. aureus* no queijo Minas Padrão pode não ter influenciado significativamente a população de culturas de BAL nos queijos durante os 60 dias de armazenamento a 10 °C. A presença de *L. monocytogenes* e/ou *S. aureus* também não influenciou a contagem de *L. rhamnosus* em queijo Minas Frescal durante 21 dias de armazenamento a 7 °C (Prezzi et al., 2020).

A população de *S. aureus* no queijo Minas Padrão apresentou um aumento progressivo ao longo dos 60 dias de estudo em todos os tratamentos avaliados (Figura 6B), com diferenças

estatísticas significativas a partir do décimo dia, exceto para QP6QP60, que apresentou diferença estatística apenas a partir do trigésimo dia.

Quando se avaliou os três tratamentos em um mesmo tempo de maturação, observou-se diferença estatística apenas para QP6QP60 no décimo dia de armazenamento a 10 °C, com a contagem de *S. aureus* sendo significativamente menor. Embora não tenha sido encontrada uma diferença estatística entre os tratamentos nos tempos de 30 e 60 dias, neste último tempo, a presença dos isolados QP6 e QP60 promoveu a redução de 1 log UFC/g da população de *S. aureus* comparado ao controle. De forma semelhante, Prezzi et al. (2020) não observou efeito inibitório de *L. rhamnosus* sobre as contagens de *S. aureus* ($P > 0,05$) em queijo Minas Frescal. Por outro lado, efeito inibitório de *L. rhamnosus* sobre *L. monocytogenes* foi observado nos queijos com redução na população do patógeno variando de 1,1–1,6 log UFC/g, indicando que as culturas utilizadas no presente estudo podem não ter apresentado um impacto significativo sobre *S. aureus*, mas podem ser eficazes contra outros importantes patógenos alimentares.

4. CONCLUSÃO

Este estudo identificou a nível de espécie, por meio da análise MALDI-TOF MS, quatro cepas do gênero *Streptococcus*, três cepas de *L. lactis* e uma de *E. faecium*, todas obtidas a partir do soro-fermento do queijo Porungo. A maioria das BAL demonstrou sensibilidade a múltiplos antibióticos, com seis delas produtoras de diacetil. Apenas o isolado *E. faecium* QP60 apresentou atividade antibacteriana contra *L. lactis* ATCC 19435, mas não contra *S. aureus* ATCC 13565.

O potencial biotecnológico dos isolados revelou que as espécies do gênero *Streptococcus* têm rápida adaptação e alta taxa de crescimento entre 30 e 40 °C, com destaque para *S. infantarius* QP6. Além disso, o processo de maturação do queijo Minas Padrão e os diferentes tratamentos aplicados causaram mudanças significativas nas características físico-químicas do produto. Os tratamentos utilizando as diferentes combinações de BAL não mostraram eficácia significativa sobre o crescimento *S. aureus* ao longo de 60 dias. Os resultados sugerem que *E. faecium* QP60 e *S. infantarius* QP6 podem ser considerados potenciais culturas coadjuvantes e bioprotetoras, porém estudos mais aprofundados precisam ser realizados com os isolados.

REFERÊNCIAS

- Abedin, M. M., Chourasia, R., Phukon, L. C., Sarkar, P., Ray, R. C., Singh, S. P., & Rai, A. K. (2023). Lactic acid bacteria in the functional food industry: biotechnological properties and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2227896>
- Abedini, R., Zaghari, G., Jabbari, L., Salekdeh, G. H., & Hashemi, M. (2023). A potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from camel rumen, fatty acids biotransformation, antilisteria activity and safety assessment. *International Dairy Journal*, 145, 105706. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2023.105706>
- Adamberg, K., Kask, S., Laht, T. M., & Paalme, T. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1–2), 171–183. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00537-8)
- Ağagündüz, D., Şahin, T. Ö., Ayten, Ş., Yılmaz, B., Güneşliol, B. E., Russo, P., Spano, G., & Özogul, F. (2022). Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry. *Food Bioscience*, 47, 101617. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101617>
- Aghababaie, M., Khanahmadi, M., & Beheshti, M. (2015). Developing a detailed kinetic model for the production of yogurt starter bacteria in single strain cultures. *Food and Bioprocess Technology*, 94, 657–667. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2014.09.007>
- Alegría, Á., Delgado, S., Roces, C., López, B., & Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1–2), 61–66. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.07.029>
- Ammor, M. S., Belén Flórez, A., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24(6), 559–570. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2006.11.001>
- Andrade, R. P., Oliveira, D. R., Lopes, A. C. A., de Abreu, L. R., & Duarte, W. F. (2019). Survival of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii* to simulated gastrointestinal conditions and their use as single and mixed inoculum for cheese production. *Food Research International*, 125, 108620. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.108620>
- Arrijoja-Bretón, D., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control*, 115, 107286. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107286>
- Banwo, K., Sanni, A., & Tan, H. (2013). Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 229–241. <https://doi.org/10.1111/jam.12031>

- Barcelos, M. M., Martins, L., Grenfell, R. C., Juliano, L., Anderson, K. L., dos Santos, M. V., & Gonçalves, J. L. (2019). Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 849–857. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00110-5>
- Bibi, A., Xiong, Y., Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Radicetti, E., Umair, M., Shoukat, M., Khan, M. K. I., & Aadil, R. M. (2021). Recent Advances in the Production of Exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus* spp. and Its Application in the Food Industry: A Review. *Sustainability*, 13(22), 12429. <https://doi.org/10.3390/su132212429>
- Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018). Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3611–3629. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>
- Brasil. (2020). INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 66. Dispõe sobre a identidade e os requisitos de qualidade que deve apresentar o produto denominado queijo minas padrão.
- Bravo, D., Rodríguez, E., & Medina, M. (2009). Nisin and lacticin 481 coproduction by *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4805–4811. <https://doi.org/10.3168/JDS.2009-2237>
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill, C., & O'Toole, P. W. (2019). Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18>
- Centeno, J. A., Lorenzo, J. M., & Carballo, J. (2022). Effects of autochthonous *Kluyveromyces lactis* and commercial *Enterococcus faecium* adjunct cultures on the volatile profile and the sensory characteristics of short-ripened acid-curd Cebreiro cheese. *Food Microbiology*, 108, 104101. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2022.104101>
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1636–1643. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.12.1636>
- Chen, J., Shen, J., Ingvar Hellgren, L., Ruhdal Jensen, P., & Solem, C. (2015). Adaptation of *Lactococcus lactis* to high growth temperature leads to a dramatic increase in acidification rate. *Scientific Reports*, 5(1), 14199. <https://doi.org/10.1038/srep14199>
- Chen, W., Yu, L., & Shi, Y. (2019). Safety Evaluation of Lactic Acid Bacteria. Em *Lactic Acid Bacteria* (p. 371–409). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7832-4_11
- CLSI. (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
- Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. G. (2022). Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods*, 11(15), 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>

- Costa, R. G. B., Caiafa Junior, A., Gomes da Cruz, A., Sobral, D., Gonçalves Costa Júnior, L. C., Jacinto de Paula, J. C., Magalhães Machado Moreira, G., & Martins Teodoro, V. A. (2019). Effect of partial replacement of sodium chloride with potassium chloride on the characteristics of Minas Padrão cheese. *International Dairy Journal*, 91, 48–54. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2018.12.002>
- da Cunha, V. L., Leonarski, E., de Oliveira, J., Fireck, J. F., Rodrigues, M. X., da Silva, V. G., Ramos, C. J. R., & Passos Francisco, C. T. dos. (2024). Screening and characterization of *Enterococcus durans* isolates from raw organic milk in Southern Brazil: Assessing technological potential. *Food and Humanity*, 2, 100276. <https://doi.org/10.1016/J.FOOHUM.2024.100276>
- Daba, G. M., & Elkhateeb, W. A. (2020). Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101750. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101750>
- de Campos, A. C. L. P., Nandi, R. D. S., Scandorieiro, S., Gonçalves, M. C., Reis, G. F., Dibo, M., Medeiros, L. P., Panagio, L. A., Fagan, E. P., Takayama Kobayashi, R. K., & Nakazato, G. (2022). Antimicrobial effect of *Origanum vulgare* (L.) essential oil as an alternative for conventional additives in the Minas cheese manufacture. *LWT*, 157, 113063. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.113063>
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S. D., Knoetze, H., & Dicks, L. M. T. (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 433–444. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.03.021>
- de Souza, E. L., de Oliveira, K. Á., & de Oliveira, M. E. (2023). Influence of lactic acid bacteria metabolites on physical and chemical food properties. *Current Opinion in Food Science*, 49, 100981. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100981>
- de Souza, T. P., Evangelista, S. R., Passamani, F. R. F., Bertechini, R., de Abreu, L. R., & Batista, L. R. (2021). Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. *International Dairy Journal*, 120, 105085. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2021.105085>
- Dias, G. M. P., Silva, A. B. da, Granja, N. M. C., Silva, T. N. da, Lima, G. V. M., Cavalcanti, M. T. H., & Porto, A. L. F. (2019). Can Coalho cheese lactic microbiota be used in dairy fermentation to reduce foodborne pathogens? *Scientia Plena*, 15(2). <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2019.021501>
- Dimitreli, G., & Thomareis, A. S. (2007). Texture evaluation of block-type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1364–1373. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2006.04.043>
- dos Santos, K. M. O., de Matos, C. R., Salles, H. O., de Melo Franco, B. D. G., Arellano, K., Holzapfel, W. H., & Todorov, S. D. (2020). Exploring Beneficial/Virulence Properties of Two

Dairy-Related Strains of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(4), 1524–1541. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09637-8>

Durango-Zuleta, M. M., Fuentes-Vanegas, M., Sepúlveda-Valencia, J. U., & Moreno Herrera, C. X. (2022). Isolation, identification, and antimicrobial activity of lactic acid bacteria associated with two traditional Colombian types of cheese: Quesillo and double-cream cheese. *LWT*, 171, 114119. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.114119>

El Hatmi, H., Jrad, Z., Oussaief, O., Nasri, W., Sbissi, I., Khorchani, T., & Canabady-Rochelle, L. L. S. (2018). Fermentation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) milk by *Enterococcus faecium*, *Streptococcus macedonicus* as a potential alternative of fermented cow milk. *LWT*, 90, 373–380. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.12.040>

Elliott, J. A., & Facklam, R. R. (1996). Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1296–1298. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.5.1296-1298.1996>

Engels, W., Siu, J., van Schalkwijk, S., Wesselink, W., Jacobs, S., & Bachmann, H. (2022). Metabolic Conversions by Lactic Acid Bacteria during Plant Protein Fermentations. *Foods*, 11(7), 1005. <https://doi.org/10.3390/foods11071005>

Erginkaya, Z., & Konuray-Altun, G. (2022). Potential biotherapeutic properties of lactic acid bacteria in foods. *Food Bioscience*, 46, 101544. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101544>

EUCAST. (2024). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters.

Felicio, T. L., Esmerino, E. A., Vidal, V. A. S., Cappato, L. P., Garcia, R. K. A., Cavalcanti, R. N., Freitas, M. Q., Conte Junior, C. A., Padilha, M. C., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Arellano, D. B., Bollini, H. M. A., Pollonio, M. A. R., & Cruz, A. G. (2016). Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. *Food Chemistry*, 196, 628–637. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.09.102>

Feng, T., & Wang, J. (2020). Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes*, 12(1), 1801944. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>

Fidan, H., Esatbeyoglu, T., Simat, V., Trif, M., Tabanelli, G., Kostka, T., Montanari, C., Ibrahim, S. A., & Özogul, F. (2022). Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: Facts and gaps. *Food Bioscience*, 47, 101741. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101741>

Franco, I., Bargiela, V., & Tovar, C. (2023). Effect of Vacuum Packaging on the Biochemical, Viscoelastic, and Sensory Properties of a Spanish Cheese during Chilled Storage. *Foods*, 12(7), 1381. <https://doi.org/10.3390/foods12071381>

Fusieger, A., Perin, L. M., Teixeira, C. G., de Carvalho, A. F., & Nero, L. A. (2020). The ability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* strains in producing nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(5), 651–662. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01373-6>

- Gad, G. F. M., Abdel-Hamid, A. M., & Farag, Z. S. H. (2014). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Brazilian journal of microbiology*, 45(1), 25–33. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000100005>
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M. C., Galgano, F., Crudele, M. A., Favati, F., Guerzoni, M. E., & Suzzi, G. (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1–2), 105–117. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00445-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00445-1)
- Gboko, K. D. T., Traoré, S. G., Sanhoun, A. R., Kirioua, J., Otaru, N., Kurt, F., Jaeger, F. N., Isenring, J., Kaindi, D. W. M., Kreikemeyer, B., Renault, P., Hattendorf, J., Meile, L., Jans, C., Nguetta, R., & Bonfoh, B. (2019). Risk factors for the carriage of *Streptococcus infantarius* subspecies *infantarius* isolated from African fermented dairy products. *PLOS ONE*, 14(11), e0225452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225452>
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2–3), 215–222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1)
- Giuliano, C., Patel, C. R., & Kale-Pradhan, P. B. (2019). A Guide to Bacterial Culture Identification And Results Interpretation. P & T: a peer-reviewed journal for formulary management, 44(4), 192–200.
- Glajzner, P., Szewczyk, E. M., & Szemraj, M. (2023). Phenotypic and Genotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in Streptococci Isolated from Human and Animal Clinical Specimens. *Current Microbiology*, 80(7), 228. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03337-6>
- Güley, Z., Fallico, V., Cabrera-Rubio, R., Cotter, P. D., & Beresford, T. (2022). Identification of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* as the species primarily responsible for acid production in Izmir Brined Tulum Cheese from the Aegean Region of Türkiye. *Food Research International*, 160, 111707. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111707>
- Guo, S., Wu, T., Peng, C., Wang, J., Sun, T., & Zhang, H. (2021). Metabolic footprint analysis of volatile metabolites by gas chromatography-ion mobility spectrometry to discriminate between different fermentation temperatures during *Streptococcus thermophilus* milk fermentation. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 8541–8553. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-19555>
- Gupta, S., Mohanty, U., & Majumdar, R. K. (2021). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented fish product Shidal of India with reference to their probiotic potential. *LWT*, 146, 111641. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111641>
- Hamdaoui, N., Benkirane, C., Bouaamali, H., Azghar, A., Mouncif, M., Maleb, A., Hammouti, B., Mashay Al-Anazi, K., Kumar, P., Kumar Yadav, K., Ryeol Choi, J., & Meziane, M. (2024). Investigating lactic acid bacteria genus *Lactococcus lactis* properties: antioxidant activity, antibiotic resistance, and antibacterial activity against multidrug-resistant bacteria *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, e31957. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E31957>

- Hernández Figueroa, R. H., López-Malo, A., & Mani-López, E. (2024). Antimicrobial activity and applications of fermentates from lactic acid bacteria – a review. *Sustainable Food Technology*, 2(2), 292–306. <https://doi.org/10.1039/D3FB00241A>
- Hosken, B. de O., Melo Pereira, G. V., Lima, T. T. M., Ribeiro, J. B., Magalhães Júnior, W. C. P. de, & Martin, J. G. P. (2023). Underexplored Potential of Lactic Acid Bacteria Associated with Artisanal Cheese Making in Brazil: Challenges and Opportunities. *Fermentation*, 9(5), 409. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050409>
- Huang, H., Peng, F., Li, J., Liu, Z., Xie, M., & Xiong, T. (2021). Isolation and characteristics of lactic acid bacteria with antibacterial activity against *Helicobacter pylori*. *Food Bioscience*, 44, 101446. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.101446>
- Jans, C., Kaindi, D. W. M., Böck, D., Njage, P. M. K., Kouamé-Sina, S. M., Bonfoh, B., Lacroix, C., & Meile, L. (2013). Prevalence and comparison of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* in raw and fermented dairy products from East and West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.008>
- Jans, C., Meile, L., Kaindi, D. W. M., Kogi-Makau, W., Lamuka, P., Renault, P., Kreikemeyer, B., Lacroix, C., Hattendorf, J., Zinsstag, J., Schelling, E., Fokou, G., & Bonfoh, B. (2017). African fermented dairy products – Overview of predominant technologically important microorganisms focusing on African *Streptococcus infantarius* variants and potential future applications for enhanced food safety and security. *International Journal of Food Microbiology*, 250, 27–36. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2017.03.012>
- Khanal, S. N., & Lucey, J. A. (2018). Effect of fermentation temperature on the properties of exopolysaccharides and the acid gelation behavior for milk fermented by *Streptococcus thermophilus* strains DGCC7785 and St-143. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3799–3811. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13203>
- Kim, H. J., & Koo, M. (2020). Occurrence, Antimicrobial Resistance and Molecular Diversity of *Enterococcus faecium* in Processed Pork Meat Products in Korea. *Foods*, 9(9), 1283. <https://doi.org/10.3390/foods9091283>
- King, N. (1948). Modification of Vogues-Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetyl methyl carbinol plus diacetyl in butter. *Dairy Ind*, 13(9).
- Kondrotiene, K., Zavistanaviciute, P., Aksomaitiene, J., Novoslavskij, A., & Malakauskas, M. (2023). *Lactococcus lactis* in Dairy Fermentation—Health-Promoting and Probiotic Properties. *Fermentation*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010016>
- Kort, R., Westerik, N., Mariela Serrano, L., Douillard, F. P., Gottstein, W., Mukisa, I. M., Tuijn, C. J., Basten, L., Hafkamp, B., Meijer, W. C., Teusink, B., de Vos, W. M., Reid, G., & Sybesma, W. (2015). A novel consortium of *Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus thermophilus* for increased access to functional fermented foods. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0370-x>

- Leal Maske, B., Murawski de Mello, A. F., da Silva Vale, A., Prado Martin, J. G., de Oliveira Soares, D. L., De Dea Lindner, J., Soccol, C. R., & de Melo Pereira, G. V. (2024). Exploring diversity and functional traits of lactic acid bacteria in traditional vinegar fermentation: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 412, 110550. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110550>
- Łepecka, A., Szymański, P., Okoń, A., & Zielińska, D. (2023). Antioxidant activity of environmental lactic acid bacteria strains isolated from organic raw fermented meat products. *LWT*, 174, 114440. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114440>
- Levak, S., Kalit, S., Dolenčić Špehar, I., Radeljević, B., Rako, A., & Tudor Kalit, M. (2023). The influence of ripening of semi-hard goat cheese in oil on its physicochemical composition and sensory properties. *Journal of Dairy Science*, 106(12), 8493–8503. <https://doi.org/10.3168/JDS.2023-23533>
- Li, W., Ren, M., Duo, L., Li, J., Wang, S., Sun, Y., Li, M., Ren, W., Hou, Q., Yu, J., Sun, Z., & Sun, T. (2020). Fermentation Characteristics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolated From Naturally Fermented Dairy Products and Screening of Potential Starter Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01794>
- Lima Maciel, D., Castillo Vargas, J. A., Mezzomo, R., Sundfeld da Gama, M. A., Leite, L. C., Rodrigues de Castro, Í. R., Sampaio Oliveira, L. R., Costa Farias, M. L., dos Santos Luz, W. B., & Alves, K. S. (2022). Physicochemical, nutritional, and sensory attributes of Minas frescal cheese from grazing cows fed a supplement containing different levels of babassu coconut (*Orbignya speciosa*). *International Dairy Journal*, 127, 105176. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2021.105176>
- Lima, R. C., Carvalho, A. P. A. de Lelis, C. A., Faria, D. J., da Silva, B. D., da Silva de Figueiredo, M. R., Chaves, P. H. T., de Almeida, A. E. C. C., & Conte-Junior, C. A. (2024). An innovative alternative to reduce sodium in cheese: Babassu coconut byproduct improving quality and shelf-life of reduced-sodium Minas fresh cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 92, 103601. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2024.103601>
- Liu, Q., Bian, Y., Mu, S., Chen, M., Liu, S., Yang, G., Huang, Y., Hou, X., & Fang, Y. (2023). Genomic and phenotypic-based safety assessment and probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* FUA329, a urolithin A-producing bacterium of human milk origin. *Genomics*, 115(6), 110724. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2023.110724>
- Macharia, J. M., Kaposztas, Z., Varjas, T., Budán, F., Zand, A., Bodnar, I., & Bence, R. L. (2023). Targeted lactate dehydrogenase genes silencing in probiotic lactic acid bacteria: A possible paradigm shift in colorectal cancer treatment? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 160, 114371. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114371>
- Mallia, S., Escher, F., & Schlichtherle-Cerny, H. (2008). Aroma-active compounds of butter: a review. *European Food Research and Technology*, 226(3), 315–325. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0555-y>

- Martino, G. P., Quintana, I. M., Espariz, M., Blancato, V. S., & Magni, C. (2016). Aroma compounds generation in citrate metabolism of *Enterococcus faecium*: Genetic characterization of type I citrate gene cluster. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 27–37. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.11.004>
- Meral-Aktaş, H. (2024). Bacteriocin characterization of *Enterococcus faecium* isolates and evaluation of their in situ anti-Listerial activity in Beyaz cheese. *Food Bioscience*, 61, 104741. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2024.104741>
- Meruvu, H., & Harsa, S. T. (2022). Lactic acid bacteria: isolation–characterization approaches and industrial applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–20. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2054936>
- M'hir, S., Minervini, F., Di Cagno, R., Chammem, N., & Hamdi, M. (2012). Technological, functional and safety aspects of enterococci in fermented vegetable products: a mini-review. *Annals of Microbiology*, 62(2), 469–481. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0363-x>
- Min, B., Kim, K., Li, V., Cho, S., & Kim, H. (2020). Changes in Cell Membrane Fatty Acid Composition of *Streptococcus thermophilus* in Response to Gradually Increasing Heat Temperature. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 739–748. <https://doi.org/10.4014/jmb.1912.12053>
- Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadoux, J.-J., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Langella, P., & Azevedo, V. (2003). Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genetics and molecular research: GMR*, 2(4), 348–359.
- Mojgani, N., Shahali, Y., & Dadar, M. (2020). Immune modulatory capacity of probiotic lactic acid bacteria and applications in vaccine development. *Beneficial Microbes*, 11(3), 213–226. <https://doi.org/10.3920/BM2019.0121>
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Tassinari Ortolani, M. B., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1320–1324. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2010.05.005>
- Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., & López-Gómez, J. P. (2020). Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>
- Murindangabo, Y. T., Kopecký, M., Perná, K., Nguyen, T. G., Konvalina, P., & Kavková, M. (2023). Prominent use of lactic acid bacteria in soil-plant systems. *Applied Soil Ecology*, 189, 104955. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2023.104955>
- Murtaza, M. S., Sameen, A., Rehman, A., Huma, N., Hussain, F., Hussain, S., Cacciotti, I., Korma, S. A., Ibrahim, S. A., & Ma, Y. K. (2024). Physicochemical, techno-functional, and proteolytic

effects of various hydrocolloids as fat replacers in low-fat cheddar cheese. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1440310>

- Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J. E., Cherie Millar, B., & Xu, J. (2011). Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. *Current Microbiology*, 62(3), 1081–1089. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9856-2>
- Nazir, Y., Hussain, S. A., Abdul Hamid, A., & Song, Y. (2018). Probiotics and Their Potential Preventive and Therapeutic Role for Cancer, High Serum Cholesterol, and Allergic and HIV Diseases. *BioMed Research International*, 2018, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2018/3428437>
- Nero, L. A., Andretta, M., Almeida, T. T., Ferreira, L. R., Camargo, A. C., Yamatogi, R. S., Carvalho, A. F., & Call, D. R. (2021). Lactic microbiota of the minas artisanal cheese produced in the serro region, Minas Gerais, Brazil. *LWT*, 148, 111698. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111698>
- Nguyen, H. T. H., Ong, L., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2014). The Effect of Fermentation Temperature on the Microstructure, Physicochemical and Rheological Properties of Probiotic Buffalo Yoghurt. *Food and Bioprocess Technology*, 7(9), 2538–2548. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1278-x>
- Nogueira Silva, N. F., Siqueira de Aguiar, K., Pimentel Filho, N. de J., de Paula Ferreira, I. E., Lanzoni Troiani, C. A., Artigiani Lima Tribst, A., & Fernandes de Carvalho, A. (2020). Milk quality, production process and physicochemical characteristics of Porungo, an artisanal cheese from the state of Sao Paulo, Brazil. *Journal of Dairy Research*, 87(4), 480–483. <https://doi.org/10.1017/S0022029920001016>
- O' Connor, M., Field, D., Grainger, A., O' Connor, P. M., Draper, L., Ross, R. P., & Hill, C. (2020). Nisin M: a Bioengineered Nisin A Variant That Retains Full Induction Capacity but Has Significantly Reduced Antimicrobial Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(15). <https://doi.org/10.1128/AEM.00984-20>
- Özkan, E. R., Öztürk, H. İ., Demirci, T., & Akın, N. (2021). Detection of biofilm formation, virulence factor genes, antibiotic-resistance, adherence properties, and some beneficial properties of cheese origin *S. infantarius*, *S. gallolyticus*, and *S. lutetiensis* strains belonging to the *S. bovis/S. equinus* complex. *LWT*, 150, 112077. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112077>
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turrone, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837–890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>

- Paximada, P., Howarth, M., & Dubey, B. N. (2021). Double emulsions fortified with plant and milk proteins as fat replacers in cheese. *Journal of Food Engineering*, 288, 110229. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110229>
- Pena-Serna, C., Penna, A. L. B., & Lopes Filho, J. F. (2016). Zein-based blend coatings: Impact on the quality of a model cheese of short ripening period. *Journal of Food Engineering*, 171, 208–213. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2015.10.039>
- Perin, L. M., Moraes, P. M., Viçosa, G. N., Silva Júnior, A., & Nero, L. A. (2012). Identification of bacteriocinogenic *Lactococcus* isolates from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. *International Dairy Journal*, 25(1), 46–51. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2011.12.010>
- Pinchao, Y. A., Serna-Cock, L., & Mora, O. O. (2024). Probiotic capacity of commensal lactic acid bacteria from the intestine of Guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Heliyon*, 10(8), e29431. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E29431>
- Pinto, M. S., de Carvalho, A. F., Pires, A. C. D. S., Campos Souza, A. A., Fonseca da Silva, P. H., Sobral, D., de Paula, J. C. J., & de Lima Santos, A. (2011). The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *International Dairy Journal*, 21(2), 90–96. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2010.08.001>
- Plavec, T. V., & Berlec, A. (2020). Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 8(2), 297. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020297>
- Poirazi, P., Leroy, F., Georgalaki, M. D., Aktypis, A., De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2007). Use of Artificial Neural Networks and a Gamma-Concept-Based Approach To Model Growth of and Bacteriocin Production by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under Simulated Conditions of Kasserli Cheese Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 768–776. <https://doi.org/10.1128/AEM.01721-06>
- Prezzi, L. E., Lee, S. H. I., Nunes, V. M. R., Corassin, C. H., Pimentel, T. C., Rocha, R. S., Ramos, G. L. P. A., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Duarte, M. C. K. H., Freitas, M. Q., Esmerino, E. A., Silva, M. C., Cruz, A. G., & Oliveira, C. A. F. (2020). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a probiotic Minas Frescal cheese. *Food Microbiology*, 92, 103557. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2020.103557>
- Qin, H., Gong, S.-S., Ge, X.-Y., & Zhang, W.-G. (2012). The effect of temperature on *l*-lactic acid production and metabolite distribution of *Lactobacillus casei*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(6), 564–573. <https://doi.org/10.1080/10826068.2012.665114>
- Raj, T., Chandrasekhar, K., Kumar, A. N., & Kim, S.-H. (2022). Recent biotechnological trends in lactic acid bacterial fermentation for food processing industries. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2(1), 14–40. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00044-w>

- Ramalho, J. B., Soares, M. B., Spiazzi, C. C., Bicca, D. F., Soares, V. M., Pereira, J. G., da Silva, W. P., Sehn, C. P., & Cibin, F. W. S. (2019). In Vitro Probiotic and Antioxidant Potential of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL95 and Its Effect in Mice Behaviour. *Nutrients*, 11(4), 901. <https://doi.org/10.3390/nu11040901>
- Rathod, N. B., Phadke, G. G., Tabanelli, G., Mane, A., Ranveer, R. C., Pagarkar, A., & Ozogul, F. (2021). Recent advances in bio-preservatives impacts of lactic acid bacteria and their metabolites on aquatic food products. *Food Bioscience*, 44, 101440. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.101440>
- Ribeiro, S. C., O'Connor, P. M., Ross, R. P., Stanton, C., & Silva, C. C. G. (2016). An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481. *International Dairy Journal*, 63, 18–28. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2016.07.017>
- Roldán-Pérez, S., Gómez Rodríguez, S. L., Sepúlveda-Valencia, J. U., Ruiz Villadiego, O. S., Márquez Fernández, M. E., Montoya Campuzano, O. I., & Durango-Zuleta, M. M. (2023). Assessment of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an artisanal Colombian cheese. *Heliyon*, 9(11), e21558. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E21558>
- Rolfe, C., & Daryaei, H. (2020). Intrinsic and Extrinsic Factors Affecting Microbial Growth in Food Systems (p. 3–24). https://doi.org/10.1007/978-3-030-42660-6_1
- Salmazo, G. C., Dal Molin Filho, R. G., Robazza, W. da S., Schmidt, F. C., & Longhi, D. A. (2023). Modeling the growth dependence of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* as a function of temperature and pH. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 323–334. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00907-5>
- Sanlibaba, P., & Senturk, E. (2018). Prevalence, characterization and antibiotic resistance of enterococci from traditional cheeses in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1955–1963. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1489413>
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2001). Citrate Metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5482–5487. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5482-5487.2001>
- Savoie, S., Champagne, C. P., Chiasson, S., & Audet, P. (2007). Media and process parameters affecting the growth, strain ratios and specific acidifying activities of a mixed lactic starter containing aroma-producing and probiotic strains. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), 163–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03219.x>
- Silva, C. B., Ferreira, L. M., Lima, A. R., Araújo, K. G. L., Souza, R. M., Fonseca, A. B. M., & Gonzalez, A. G. M. (2023). Microbiological quality and cultivable bacterial community of fresh and ripened Minas cheeses made from raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 143, 105662. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2023.105662>
- Sioziou, E., Kakouri, A., Bosnea, L., & Samelis, J. (2024). Antilisterial activity of raw sheep milk from two native Epirus breeds: Culture-dependent identification, bacteriocin gene detection and

- primary safety evaluation of the antagonistic LAB biota. *Current Research in Microbial Sciences*, 6, 100209. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2023.100209>
- Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 591–610. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2005.04.002>
- Sonei, A., Edalatian Dovom, M. R., & Yavarmanesh, M. (2024). Evaluation of probiotic, safety, and technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from lighvan and koozeh cheeses. *International Dairy Journal*, 148, 105807. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2023.105807>
- Suissa, R., Oved, R., Jankelowitz, G., Turjeman, S., Koren, O., & Kolodkin-Gal, I. (2022). Molecular genetics for probiotic engineering: dissecting lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 30(3), 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.07.007>
- Sylvere, N., Mustopa, A. Z., Budiarti, S., Meilina, L., Hertati, A., & Handayani, I. (2023). Whole-genome sequence analysis and probiotic characteristics of *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* strain Lac3 isolated from traditional fermented buffalo milk (Dadiah). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 49. <https://doi.org/10.1186/S43141-023-00503-Y>
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews*, 40(3), 722–756. <https://doi.org/10.1128/br.40.3.722-756.1976>
- Tarrah, A., Noal, V., Treu, L., Giaretta, S., da Silva Duarte, V., Corich, V., & Giacomini, A. (2018). Short communication: Comparison of growth kinetics at different temperatures of *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains of dairy origin. *Journal of Dairy Science*, 101(9), 7812–7816. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-14731>
- Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Popović, N., Tolinački, M., & Golić, N. (2021). Enterococci from Raw-Milk Cheeses: Current Knowledge on Safety, Technological, and Probiotic Concerns. *Foods*, 10(11), 2753. <https://doi.org/10.3390/foods10112753>
- Tidona, F., Francolino, S., Ghiglietti, R., Locci, F., Carminati, D., Laforce, P., & Giraffa, G. (2020). Characterization and pre-industrial validation of *Streptococcus thermophilus* strains to be used as starter cultures for Crescenza, an Italian soft cheese. *Food Microbiology*, 92, 103599. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2020.103599>
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2004). Effect of Medium Components on Bacteriocin Production by *Lactobacillus Pentosus* ST151BR, a Strain Isolated from Beer Produced by the Fermentation of Maize, Barley and Soy Flour. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(6), 643–650. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000043196.09610.de>
- Toplu, M. S., & Tuncer, B. Ö. (2023). Evaluation of the Functional Properties and Safety of Enterocin-producing *Enterococcus faecium* BT29.11 Isolated from Turkish Beyaz Cheese and its Inhibitory Activity against *Listeria monocytogenes* in UHT Whole Milk. *Italian Journal of Food Science*, 35(2), 54–70. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v35i2.2316>

- Tsuda, H., & Kodama, K. (2021). Evaluating the technological properties of lactic acid bacteria in Wagyu cattle milk. *Journal of Dairy Research*, 88(2), 210–216. <https://doi.org/10.1017/S0022029921000339>
- Uriot, O., Denis, S., Junjua, M., Roussel, Y., Dary-Mourot, A., & Blanquet-Diot, S. (2017). *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? *Journal of Functional Foods*, 37, 74–89. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.07.038>
- Ustok, F. I., Tari, C., & Harsa, S. (2010). Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food Chemistry*, 119(3), 1114–1120. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.08.022>
- Van Den Berghe, E., De Winter, T., & De Vuyst, L. (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 159–170. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.08.027>
- Vaningelgem, F., Zamfir, M., Adriany, T., & De Vuyst, L. (2004). Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 in milk-based medium. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1257–1273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02418.x>
- Wang, K., Zhang, H., Feng, J., Ma, L., Fuente-Núñez, C. de la, Wang, S., & Lu, X. (2019). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. *Journal of Agriculture and Food Research*, 1, 100006. <https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2019.100006>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Wu, S., Li, D., Li, S., Bhandari, B., Yang, B., Chen, X. D., & Mao, Z. (2009). Effects of Incubation Temperature, Starter Culture Level and Total Solids Content on the Rheological Properties of Yogurt. *International Journal of Food Engineering*, 5(2). <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1436>
- Wu, T., Guo, S., Liu, K., Yang, Y., Wang, J., & Zhang, H. (2023). Comparison of volatile metabolic profiles in fermented milk of *Streptococcus thermophilus* during the postripening period at different incubation temperatures. *Journal of Dairy Science*, 106(4), 2303–2313. <https://doi.org/10.3168/JDS.2022-22331>
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>

- Yoon, S.-H., & Kim, G.-B. (2022). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Fresh Cheese Using a Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* CAU2013 Strain. *Food Science of Animal Resources*, 42(6), 1009–1019. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e48>
- Zanoni, B., Garzaroli, C., Anselmi, S., & Rondinini, G. (1993). Modeling the growth of *Enterococcus faecium* in bologna sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10), 3411–3417. <https://doi.org/10.1128/aem.59.10.3411-3417.1993>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhou, N., Zhang, J. X., Fan, M. T., Wang, J., Guo, G., & Wei, X. Y. (2012). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4775–4783. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5271>
- Zisu, B., & Shah, N. P. (2003). Effects of pH, Temperature, Supplementation with Whey Protein Concentrate, and Adjunct Cultures on the Production of Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science*, 86(11), 3405–3415. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(03\)73944-7](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(03)73944-7)