

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Bactérias lácticas produtoras de folato e riboflavina: Isolamento e avaliação do seu potencial de aplicação na produção de produtos lácteos caprinos com alto teor de vitaminas

Fabiana Fernanda Pacheco da Silva

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

Co – Orientador:

Prof. Dr. Jean Guy Joseph LeBlanc

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Bactérias lácticas produtoras de folato e riboflavina: Isolamento e avaliação do seu potencial de aplicação na produção de produtos lácteos caprinos com alto teor de vitaminas

Fabiana Fernanda Pacheco da Silva

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

Co – Orientador:

Prof. Dr. Jean Guy Joseph LeBlanc

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S586b Silva, Fabiana Fernanda Pacheco da
Bactérias lácticas produtoras de folato e riboflavina : isolamento e avaliação do seu potencial de aplicação na produção de produtos lácteos caprinos com alto teor de vitaminas / Fabiana Fernanda Pacheco da Silva. - São Paulo, 2015.
54p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Orientador : Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

Co-orientador: LeBlanc, Jean Guy Joseph

1. Bromatologia 2. Bactérias lácticas 3. Vitaminas I. T.
II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador. III
LeBlanc, Jean Guy Joseph, co-orientador.

641

CDD

Fabiana Fernanda Pacheco da Silva

Bactérias lácticas produtoras de folato e riboflavina: Isolamento e avaliação do seu potencial de aplicação na produção de produtos lácteos caprinos com alto teor de vitaminas

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015.

AGRADECIMENTOS

À professora Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, pelo carinho, confiança, oportunidade desse trabalho, orientação e aprendizado.

Ao professor Jean Guy Joseph LeBlanc, pela co-orientação e por todo o apoio durante a realização dos experimentos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de bolsa de estudos (FAPESP 2012/04301-2) e pelo auxílio financeiro do projeto FAPESP 2013/50603-3.

À professora Mariza Landgraf, pela oportunidade de aprendizado e pelo convívio.

À professora Maria Teresa Destro, pelo convívio e pela oportunidade de aprendizado.

Ao professor Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, Susana Marta Isay Saad e Cynthia Jurkiewicz Kunigk, pelas sugestões e críticas no exame de qualificação.

Ao CERELA - CONICET (Centro de Referência em Lactobacillus) pela doação das cepas indicadoras.

À Vanessa Bíscola, pela amizade e por toda a ajuda durante a realização dos experimentos.

À Maria Crystina Igarashi, pelo companheirismo e ajuda durante a análise dos dados estatísticos.

Aos amigos e colegas de laboratório de Microbiologia de Alimentos, Aline, Daniele Maffei, Daniele Farias, Érika, Isabela, Janaína, Karina, Maria Fernanda, Matheus, Natacha, Patrícia, Rafael, Raquel, Rubia e Vinicius, pela amizade e colaboração.

À Kátia Leani e Lúcia, pelo carinho, convívio e ajuda em todos os momentos.

À Mônica, Cleonice, Edilson e Roberta, da secretaria do Departamento de Alimentos, pelos serviços prestados.

À minha mãe, por todo o amor, carinho, compreensão, confiança e torcida.

À minha família por todo o amor, confiança e torcida.

Aos meus amigos e novos amigos de São Paulo, pelo incentivo e alegrias.

À Deus, pelas bênçãos recebidas.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

RESUMO

DA SILVA, F. F. P. **Bactérias lácticas produtoras de folato e riboflavina: Isolamento e avaliação do seu potencial de aplicação na produção de produtos lácteos caprinos com alto teor de vitaminas.** 2015. 54p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O valor nutricional e as características físico-químicas fazem com que os produtos lácteos caprinos sejam muito apreciados e tenham um alto valor agregado. Muitas bactérias lácticas (BAL) possuem a capacidade de produzir compostos com propriedades benéficas à saúde, inclusive vitaminas do grupo B, como a riboflavina (B2) e o folato (B9), que participam de importantes funções metabólicas. O presente estudo objetivou isolar e identificar BAL capazes de produzir folato e riboflavina, utilizando leite de cabra cru e de queijos de cabra como fonte, para em seguida, avaliar a produção destas vitaminas em leite de cabra UHT, para estimar uma possível aplicação na produção de derivados lácteos de cabra com teores mais altos destas vitaminas. Um total de 179 isolados de BAL, sendo 87 provenientes de leite e 92 de queijos, foram obtidas e analisados quanto à produção de folato e de riboflavina extracelular (EC) e intracelular (IC), empregando-se ensaios microbiológicos apropriados. A produção de folato em meio de cultura a 37°C foi observada em 151 isolados (84,4%) e de riboflavina em 15 isolados (8,4%), sendo que 14 produziram as duas vitaminas concomitantemente. A média da produção folato total (EC + IC) foi 138,8 µg/L, sendo que em 77 isolados (51%) a produção estava acima da média. Houve diferença significativa entre as médias de produção de folato total pelos isolados de leite e de queijo. A média da produção de riboflavina total (EC + IC) foi 363,7 µg/L, sendo que em 9 isolados (60%) a produção foi acima da média. Com base no RAPD-PCR e sequenciamento da porção 16S do rDNA, foram obtidos 19 perfis genéticos diferentes e identificadas 7 espécies, com predominância de *Streptococcus thermophilus* (7 isolados), *Weissella paramensenteroides* (6 isolados) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (4 isolados). Oito isolados produtores de folato acima da média foram selecionados e submetidos à avaliação da produção de folato em leite de cabra UHT a 37°C, sendo 7 positivas, com média da concentração de folato total de 120,55 µg/L, variando de 12,97 a 261,91 µg/L. Os melhores produtores de folato em leite de cabra UHT foram *Lc. lactis* subsp. *lactis* FP368 e *St. thermophilus* FP34v, FP170v e FP268v. A concentração de folato produzido por estes isolados foi acima da média, evidenciando seu interessante potencial de aplicação na produção de novos derivados lácteos caprinos com teores aumentados desta vitamina. Por outro lado, não foi possível detectar a produção de riboflavina em leite de cabra por nenhum dos isolados testados.

Palavras-chave: bactérias lácticas, folato, riboflavina, leite de cabra, queijo de cabra.

ABSTRACT

DA SILVA, F. F. P. **Folate and riboflavin producing lactic acid bacteria: Isolation and evaluation of their potential application for production of goat dairy products with higher vitamin content.** 2015. 54p. Thesis (Doctor's degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Due to the high nutritional value and physicochemical characteristics, goat milk and cheeses are highly appreciated. Many strains of lactic acid bacteria (LAB) are able to produce vitamins from the B complex, such as riboflavin (B2) and folate (B9). These vitamins have important metabolic roles. The present study aimed to isolate riboflavin- and folate-producing LAB strains from goat milk and cheeses, and evaluate the potential application of those strains in the production of goat dairy products with higher content of these vitamins. A total of 179 LAB isolates were obtained from milk (87) and cheese (92) samples. The isolates were evaluated for production of extra (EC) and intracellular (IC) riboflavin and folate, applying appropriate microbiological methods. Among these isolates, 151 (84.4%) were able to produce folate, while 15 (8.4%) displayed the ability to produce riboflavin, and 14 produced both vitamins. The average production of total folate (EC + IC) was 138.8 µg/L, and the amount of folates produced by 77 isolates (51%) were above this average. The differences observed for the average production of total folate from milk and cheese isolates were statistically significant. For total riboflavin (EC+ IC), the average rate was 363.7 µg/L. Nine isolates (60%) presented production rates above the average. No significant difference was observed between the average production of total riboflavin from milk or cheese isolates (319.3 µg/L and 379.8 µg/L, respectively). Based on RAPD-PCR and 16S rDNA sequencing, 19 different genetic profiles were obtained and 7 species were identified, with predominance of *Streptococcus thermophilus* (7 isolates), *Weissella paramensenteroides* (6 isolates), and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (4 isolates). Eight isolates that produced folate above the average were selected and tested for vitamins production in UHT goat milk at 37°C. Seven isolates produced an average of 120.55 µg/L of folate in the milk and concentration varied from 12.97 to 261,91 µg/L. The best folate producers were *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FP368, *Streptococcus thermophilus* FP34v, *Streptococcus thermophilus* FP170v and *Streptococcus thermophilus* FP268v. The amount of folate produced by these isolates surpassed the average, and was above the amounts described in other studies, evidencing their potential application in the production of goat dairy products with higher content of folate. None of the tested isolates was able to produce riboflavin in UHT goat milk.

Keywords: lactic acid bacteria, folate, riboflavin, goat milk, goat cheese.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Leite de cabra e suas características físico-químicas	11
1.2	Bactérias lácticas	12
1.3	Vitaminas do grupo B	13
1.3.1	Riboflavina (Vitamina B2)	13
1.3.2	Folato (Vitamina B9)	15
2	OBJETIVO	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1	Obtenção das bactérias lácticas a partir de leite de cabra cru e queijo de cabra ..	16
3.2	Seleção das bactérias lácticas produtoras de vitaminas.....	17
3.2.1	Avaliação preliminar da produção de folato	17
3.2.2	Avaliação preliminar da produção de riboflavina	18
3.3	Avaliação da produção de folato (vitamina B9) pelos isolados.....	18
3.3.1	Preparação das suspensões para determinação de folato extracelular (EC) e intracelular (IC)	18
3.3.2	Determinação da concentração de folato.....	19
3.4	Avaliação da produção de riboflavina (vitamina B2) pelos isolados	20
3.4.1	Preparação das suspensões para determinação de riboflavina extracelular (EC) e intracelular (IC)	20
3.4.2	Determinação da concentração de riboflavina	21
3.5	Pesquisa do gênero <i>Enterococcus</i> entre os isolados produtores de folato e riboflavina	22
3.6	Identificação dos isolados produtores de folato e riboflavina não pertencentes ao gênero <i>Enterococcus</i>	22
3.6.1	Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)	22
3.6.2	Sequenciamento da porção 16S do rDNA	23
3.7	Avaliação da produção de folato em leite de cabra.....	24
3.7.1	Preparação do inóculo e elaboração do leite fermentado	24
3.7.2	Determinação do pH.....	24
3.7.3	Enumeração das células viáveis.....	24
3.7.4	Determinação da concentração de folato.....	25
3.7.4.1	Preparo das amostras de sobrenadante	25
3.7.4.2	Determinação da concentração de folato	25
3.8	Avaliação da produção de riboflavina em leite de cabra	26
3.8.1	Preparação do inóculo e elaboração do leite fermentado	26
3.8.2	Determinação do pH.....	27
3.8.3	Enumeração das células viáveis.....	27
3.8.4	Determinação da concentração de riboflavina	27
3.8.4.1	Preparo das amostras.....	27
3.8.4.2	Determinação da concentração de riboflavina.....	28
3.9	Análise Estatística.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	Avaliação da produção de folato pelos isolados em meio de cultivo.....	29
4.2	Avaliação da produção de riboflavina pelos isolados em meio de cultura.....	37
4.3	Identificação dos isolados produtores de folato e riboflavina	39
4.4	Avaliação da produção de folato em leite de cabra.....	41
4.5	Avaliação da produção de riboflavina em leite de cabra	48
5	CONCLUSÕES.....	51
6	REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Contagem de células viáveis em leite de cabra UHT inoculado com as bactérias lácticas potencialmente produtoras de folato, a 37°C.	44
Figura 2: Concentração de folato em leite de cabra UHT contendo as bactérias lácticas potencialmente produtoras de folato, a 37°C.	44
Figura 3: Folato total no leite de cabra UHT contendo bactérias lácticas potencialmente produtoras de folato, após 0, 6, 8 e 24h a 37°C.	46
Figura 4: Valores de pH do leite de cabra contendo bactérias lácticas potencialmente produtoras de folato, a 37°C.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média das concentrações de folato extracelular, intracelular e total, produzido pelos isolados obtidos de leite de cabra cru e queijos de cabra	30
Tabela 2. Concentrações de folato extracelular, intracelular e total produzido pelos isolados obtidos de leite de cabra cru e de queijos de cabra.	31
Tabela 3. Média das concentrações de riboflavina extracelular, intracelular e total, produzida pelos isolados obtidos de leite de cabra cru e queijos de cabra	37
Tabela 4. Concentrações de riboflavina extracelular, intracelular e total, produzida pelos isolados provenientes de leite de cabra cru e queijos de cabra	38
Tabela 5. Grupos genéticos e identificação dos isolados produtores de folato e riboflavina.	40
Tabela 6. Contagem de células viáveis, pH e concentração de folato em leite de cabra UHT após 0, 6, 8, 24 h a 37°C	42
Tabela 7. Concentração de folato total produzido pelos isolados em meio FACM e leite de cabra após 24h a 37°C	48
Tabela 8. Contagem de células viáveis, pH e concentração de riboflavina em leite de cabra UHT após 0, 6, 8, 24 h a 37°C	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leite de cabra e suas características físico-químicas

O interesse mundial na produção de leite de cabra tem aumentado muito nos últimos anos, devido à grande apreciação de suas características organolépticas (Schirru *et al.*, 2012). A contribuição do leite de cabra para a economia e para a nutrição da população é indiscutível em vários países, especialmente no Mediterrâneo, Oriente Médio, Europa Oriental e América do Sul (Ribeiro & Ribeiro, 2010). O Brasil é o maior produtor de leite de cabra da América do Sul, com 141 mil toneladas por ano (Medina *et al.*, 2011).

O leite de cabra difere do leite de vaca devido a sua maior digestibilidade (Park & Haenlein, 2007), que pode ser explicada pela sua composição, sendo as suas proteínas mais rapidamente digeridas e os seus aminoácidos absorvidos mais eficientemente que os aminoácidos do leite de vaca (Haenlein, 2004). Além disso, os glóbulos de gordura do leite de cabra são menores, resultando em maior superfície de contato, facilitando a atuação das lipases do intestino (Park *et al.*, 2007).

O leite de cabra tem efeitos benéficos em pessoas com alergia ao leite de vaca. Foi demonstrado que 40% dos pacientes sensíveis às proteínas do leite de vaca toleram as proteínas do leite de cabra. A baixa capacidade alergênica das proteínas do leite de cabra pode auxiliar as pessoas que sofrem problemas como azia, eczema, asma, enxaqueca, colite, úlcera de estômago, distúrbios digestivos, doenças no fígado e na vesícula biliar, constipação e indigestão (Ribeiro & Ribeiro, 2010).

Além desses benefícios, os ácidos graxos do leite de cabra (capróico, caprílico e cáprico) são capazes de diminuir os níveis de colesterol sérico e inibir a formação de depósitos de colesterol. Por essa razão, esses compostos têm sido utilizados no tratamento de síndromes de má absorção, distúrbios intestinais, doenças coronárias, má nutrição infantil, fibrose cística e cálculos biliares (Haenlein, 2004). López-Aliaga *et al.* (2005), avaliando a influência da adição de leite de cabra na dieta de adultos, observaram que esse alimento diminuiu as concentrações plasmáticas de colesterol e de triglicerídeos, enquanto os níveis de fosfolípidios, ácidos biliares e o índice litogênico permaneceram normais.

As características físico-químicas do leite de cabra possibilitam a sua utilização na produção de uma grande variedade de produtos além do leite fluido (pasteurizado e UHT), tais como queijos, manteiga, iogurtes, sorvetes, doces, entre outros (Ribeiro & Ribeiro, 2010).

Queijos produzidos com leite de cabra têm propriedades organolépticas especiais, além de apresentarem um alto conteúdo protéico de excelente qualidade, baixo teor calórico e baixo conteúdo de gorduras (Park *et al.*, 2007).

Os teores de vitaminas e minerais nos queijos de cabra variam, dependendo do tipo de queijo, do tempo de maturação e da tecnologia de produção. Os queijos de cabra contêm altos teores de cálcio (entre 80 mg a 534 mg/ 100g de queijo), e são excelentes fontes de vitaminas do grupo B, especialmente vitamina B2 (riboflavina) e vitamina B9 (folato). Alguns autores sugerem que as altas concentrações dessas vitaminas em queijo de cabra são decorrentes da presença de bactérias lácticas (BAL) capazes de produzi-las (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2011).

1.2 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas (BAL) são um grupo de micro-organismos Gram-positivos que possuem características metabólicas e fisiológicas semelhantes. Este grupo é formado por cocos ou bastonetes não formadores de esporos, catalase negativos, anaeróbios ou microaerófilos, sendo o ácido láctico o principal produto da fermentação dos carboidratos.

Muitas BAL são classificadas como GRAS (“generally recognized as safe”), e por isso são muito utilizadas pelas indústrias de alimentos. Entretanto, a maioria das BAL pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. não são consideradas GRAS e têm a sua aplicação em alimentos muito questionada (Ogier & Serror, 2008), porque algumas espécies são consideradas patógenos oportunistas e apresentam fatores de virulência (Donohue & Gueimonde, 2012).

As BAL são amplamente utilizadas como culturas starters na elaboração de alimentos fermentados. Além dessa importante capacidade fermentativa, as BAL também podem melhorar a segurança, a vida de prateleira, o valor nutricional e a qualidade total de produtos fermentados. Algumas espécies de BAL são probióticas e por isso utilizadas para o desenvolvimento de uma grande variedade de novos alimentos probióticos (LeBlanc *et al.*, 2010a).

Além das propriedades já conhecidas, algumas BAL têm a capacidade de produzir compostos benéficos à saúde nos alimentos. Esses alimentos são denominados nutracêuticos, um termo utilizado por Stephen DeFelice em 1989 para descrever “um alimento (ou parte de um alimento) que fornece benefícios médicos e à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de uma doença”. Tais compostos podem ser macronutrientes ou micronutrientes, como por exemplo, vitaminas (Hugenholtz & Smid, 2002).

1.3 Vitaminas do grupo B

As vitaminas são micronutrientes essenciais para o metabolismo de todos os seres vivos. O ser humano não é capaz de sintetizar a maioria das vitaminas, portanto elas devem ser provenientes da dieta. De acordo com a sua solubilidade, as vitaminas são classificadas em lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) e hidrossolúveis (vitaminas C e vitaminas do grupo B) (LeBlanc *et al.*, 2010a).

As vitaminas do grupo B (ou complexo B) são tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7), folato (B9) e cobalamina (B12). Essas vitaminas apresentam diferenças químicas entre si e atuam de maneira sinérgica para manter a homeostase do corpo. Elas estão normalmente presentes em vários alimentos, porém podem ser facilmente destruídas durante o cozimento ou processamento. As deficiências alimentares relacionadas a esses componentes são comuns em vários países e muitos deles têm adotado legislações que exigem a suplementação de certos alimentos com vitaminas e minerais (LeBlanc *et al.*, 2010a). No Brasil, desde 2004, a indústria alimentícia é obrigada a suplementar as farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico, para reduzir a incidência de anemia ferropriva e defeitos na formação do tubo neural, respectivamente (Nasser *et al.*, 2005).

Os relatórios oficiais mostram que essas legislações nem sempre são cumpridas e os níveis de suplementação são insuficientes, não sendo surpresa que os níveis plasmáticos de vitaminas na maioria da população tenham melhorado pouco e que as deficiências subclínicas ainda persistam (ENNyS, 2007).

1.3.1 Riboflavina (Vitamina B2)

A riboflavina (vitamina B2) é um componente essencial do metabolismo basal celular, pois é um precursor das coenzimas flavina-mononucleotídeo (FMN) e flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), que são carregadores de elétrons em reações de oxirredução. Muitos micro-organismos e plantas possuem a capacidade de sintetizar riboflavina. Contudo, vertebrados, incluindo o ser humano, não podem sintetizá-la e devem obtê-la a partir da dieta (Burgess *et al.*, 2004).

Os níveis de riboflavina recomendados para humanos variam de acordo com o sexo, a idade e o estado fisiológico (por exemplo, gravidez e lactação). Adultos saudáveis precisam consumir entre 0,9 e 1,6 mg dessa vitamina diariamente, pois o corpo humano não tem capacidade de armazenar essa vitamina. Embora a riboflavina esteja presente em uma grande variedade de alimentos, tais como produtos lácteos, carnes, ovos e alguns vegetais verdes, a deficiência de vitamina B2 (arriboflavinose) é comum, tanto em países em

desenvolvimento quanto em países industrializados (O'Brien *et al.*, 2001). Os sintomas de ariboflavinose em humanos são dor de garganta, hiperemia, edema das mucosas orais, queilose e glossite (LeBlanc *et al.*, 2011). Os sintomas clínicos da deficiência de riboflavina ocorrem raramente, mas o estado subclínico da doença, caracterizado pela mudança dos níveis de vitamina no sangue, é comum em grande parte da população (Burgess *et al.*, 2006).

Embora contenham riboflavina, os produtos lácteos não são considerados uma boa fonte dessa vitamina. Levando em consideração que o leite de vaca contém 1,2 mg de riboflavina por litro, uma pessoa adulta saudável e uma mulher grávida necessitariam consumir, respectivamente, 1,0 e 1,6 litros de leite por dia para atender as suas necessidades diárias. Esse nível de consumo de leite excede o consumo diário de leite de pessoas em países industrializados como os Estados Unidos da América, que é em média 200 mL. Aumentar os níveis de riboflavina no leite é, então, muito importante para prevenir ariboflavinose nas populações onde o consumo de leite é baixo (LeBlanc *et al.*, 2010a).

Além disso, as concentrações de riboflavina podem variar em alguns produtos lácteos, devido às tecnologias de processamento e à ação de micro-organismos utilizados durante o processo de produção. Esse é o caso do iogurte e do buttermilk, onde há um aumento da concentração de vitamina B2 para 1,7 mg/L e 2,0 mg/L, respectivamente, quando comparados com o leite não fermentado (1,2 mg/L). Esse aumento na quantidade de vitamina B2 pode ser devido à ação de culturas starters capazes de sintetizar riboflavina durante o processo de fermentação. A seleção adequada de culturas starters pode resultar no aumento da concentração de vitaminas hidrossolúveis, possibilitando a produção de produtos enriquecidos com essas vitaminas (LeBlanc *et al.*, 2011).

Em um ensaio clínico com mulheres saudáveis, foi demonstrado que o consumo diário de 200 g de iogurte probiótico ou convencional, por duas semanas, ajuda a atingir a necessidade total de vitamina B2, resultando em aumento nos níveis plasmáticos de riboflavina livre (Fabian *et al.*, 2008).

Outro estudo mostrou que a administração de leite fermentado por *Propionibacterium freudenreichii* B2336, produtor de riboflavina, foi benéfica para ratos da linhagem Wistar com deficiência desta vitamina. O produto fermentado apresentou elevada concentração de riboflavina, eliminando a maioria das manifestações fisiológicas de ariboflavinose, enquanto o produto fermentado com bactérias não produtoras de riboflavina não apresentou os mesmos benefícios (LeBlanc *et al.*, 2006).

1.3.2 Folato (Vitamina B9)

Folato, ou vitamina B9, está envolvido em diversas funções importantes do metabolismo, como replicação, reparação e metilação do DNA e síntese de nucleotídeos, aminoácidos e vitaminas. Outra propriedade do folato é a capacidade antioxidante, protegendo o genoma animal por meio da inibição do ataque de radicais livres ao DNA (LeBlanc *et al.*, 2010a).

O ácido fólico é uma forma sintética de folato que não existe na natureza. Por outro lado, as formas naturais de folato estão presentes em vários alimentos (vegetais, frutas e outros) e podem ser produzidas por micro-organismos (produtos lácteos, sucos fermentados e outros) (Kariluoto *et al.*, 2006). Leite e produtos lácteos são fontes de folato (Holasová *et al.*, 2004). O leite fluido contém entre 20 e 50 µg/L de folato (LeBlanc *et al.*, 2011). Produtos lácteos fermentados contêm quantidades mais altas dessa vitamina do que o leite fluido, certamente devido à produção adicional por bactérias (Holasová *et al.*, 2004).

A deficiência de folato está relacionada com vários problemas de saúde, como defeitos na formação do tubo neural, anemia megaloblástica, mal de Alzheimer, doenças coronárias, osteoporose, aumento do risco de câncer de mamas e cólon, perda de desempenho cognitivo e perda auditiva (LeBlanc *et al.*, 2010a; Laiño *et al.*, 2011). Por essa razão, muitos países têm adotado programas governamentais de suplementação de farinhas e outros produtos com ácido fólico (FDA, 1996; Nasser *et al.*, 2005; WHO, 2009). Uma das grandes desvantagens da suplementação com ácido fólico é que esse composto pode mascarar a manifestação clínica de anemia megaloblástica causada pela deficiência de vitamina B12 e, portanto, dificultar o seu diagnóstico (Morris & Tangney, 2007). Por outro lado, folato produzido por micro-organismos não causa esse tipo de efeito (LeBlanc *et al.*, 2011).

Algumas pesquisas têm relatado que certas linhagens de bactérias lácticas, como *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*, utilizadas industrialmente na produção de produtos fermentados, podem sintetizar folato (Wegkamp *et al.*, 2007; LeBlanc *et al.*, 2010b). Por essa razão, produtos lácteos fermentados, incluindo o iogurte, podem conter uma concentração de folato mais alta que nos produtos lácteos não fermentados (LeBlanc *et al.*, 2007). Wouters *et al.* (2002) demonstraram que a concentração de folato no iogurte pode ser superior a 200 µg/L quando fermentado com bactérias produtoras desta vitamina.

A produção de folato varia consideravelmente entre os microrganismos, sendo uma característica dependente de cada cepa. Segundo vários autores, *Streptococcus thermophilus* produz folato regularmente, enquanto *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é um consumidor de folato (LeBlanc *et al.*, 2011). Por esse motivo, a seleção de

combinações adequadas de cepas é fundamental para o desenvolvimento de produtos fermentados com altos níveis de vitaminas (LeBlanc *et al.*, 2011).

A produção de folato pode ser aumentada através do aumento da expressão dos genes envolvidos na biossíntese da vitamina (Wegkamp *et al.*, 2007). Contudo, na Europa, as legislações atuais não permitem a utilização de micro-organismos geneticamente modificados em alimentos.

Considerando-se os aspectos relacionados às BAL e que algumas são capazes de sintetizar vitaminas do grupo B, esses micro-organismos apresentam bom potencial de uso tecnológico para produção de alimentos com teores mais altos de vitaminas do grupo B (LeBlanc *et al.*, 2010a).

2 OBJETIVO

O objetivo geral desta tese foi isolar bactérias lácticas produtoras de folato e de riboflavina a partir de amostras de leite de cabra cru e de queijos de cabra, avaliar a capacidade destas bactérias produzirem estas vitaminas em leite de cabra UHT, identificar e avaliar a diversidade genética das cepas produtoras por meio de técnicas moleculares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das bactérias lácticas a partir de leite de cabra cru e queijo de cabra

As amostras de leite de cabra cru (n = 47) foram obtidas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga e no Sítio Rekantinho, localizado na cidade de Ibiúna, SP. As amostras de queijo de cabra (n = 5) foram adquiridas em estabelecimentos comerciais na cidade de São Paulo.

Para o isolamento das bactérias lácticas (BAL) seguiu-se o método de Schirru *et al.* (2012), com algumas modificações. No caso de leite cabra, uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi adicionada a 9 mL de água peptonada 0,1%, e a mistura submetida à diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1%. No caso de queijo de cabra, uma porção de 25 g de cada amostra foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada 0,1% em um *stomacher* (Stomacher, 400, Seward, London, UK) e a mistura foi submetida à diluições decimais seriadas empregando-se água peptonada 0,1%. Posteriormente, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram transferidas para a superfície de seis placas estéreis, três contendo ágar Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Oxoid, Basingstoke, UK) e três contendo ágar M17 (Difco, New Jersey, USA) suplementado com 10% de lactose. O inóculo foi

distribuído na superfície das placas com uma alça de Drigalsky esterilizada, sendo uma placa de cada meio incubada em jarras de anaerobiose (Anaerogen 2.5L Sachet, Oxoid) a 30, 37 e 42°C por 48 h.

Após a incubação, 5 colônias isoladas de cada placa de ágar MRS e/ou ágar M17 foram selecionadas aleatoriamente, inoculadas em caldo MRS e incubadas a 37°C por 24 h. Uma alíquota desse caldo foi semeada por esgotamento em ágar MRS ou ágar M17 para a purificação das colônias, dependendo de qual meio de cultura o isolado foi obtido inicialmente. As colônias foram submetidas à coloração de Gram e ao teste de produção de catalase. Colônias Gram positivas e catalase negativas foram transferidas para caldo MRS adicionado de 20% (v/v) de glicerol (LabSynth, São Paulo, Brasil), e armazenadas a -20°C até a realização dos testes de produção de folato e de riboflavina.

3.2 Seleção das bactérias lácticas produtoras de vitaminas

3.2.1 Avaliação preliminar da produção de folato

As culturas de BAL obtidas conforme descrito em 3.1 foram inoculadas, separadamente, em 3 mL de caldo MRS e incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, 1 mL dessa cultura foi centrifugado (Sigma 1-14k, Alemanha) a 10000 x g durante 5 min, para a obtenção de um pellet bem compacto. Após remoção do sobrenadante, as células do pellet foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada (LabSynth) e ressuspensas em 1 mL de solução salina esterilizada. Uma alíquota de 120 µL desta suspensão foi transferida para um tubo contendo 3 mL de Folic Acid Casei Medium (FACM) (Difco), um meio quimicamente definido sem folato, incubando-se a 37°C até turvação do meio, por no máximo 72 h.

Após a incubação, as culturas foram homogeneizadas e uma alíquota de 1 mL foi submetida à centrifugação a 10000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada. As células lavadas foram ressuspensas em 1 mL de solução salina esterilizada e uma alíquota de 120 µL dessa suspensão foi transferida para 3 mL de meio FACM, que foi incubado a 37°C por até 48 h. Este procedimento foi repetido sete vezes para as culturas que apresentavam boa multiplicação no meio FACM. Os isolados que continuaram multiplicando-se após as sete passagens no meio FACM foram selecionados, armazenados a -20°C em caldo MRS adicionado de (20% v/v) de glicerol e testados quanto à produção de folato.

Os isolados que pararam de se multiplicar em alguma das passagens pelo meio FACM foram recuperados do último tubo com meio FACM em que ocorreu multiplicação e inoculados no meio FACM suplementado com uma solução de ácido fólico (Sigma-Aldrich,

São Paulo, Brasil) com a concentração final de 1 µg/L no meio de cultura. Esse procedimento foi realizado para confirmar que a multiplicação cessou por causa da ausência de folato e não de outro componente do meio FACM.

3.2.2 Avaliação preliminar da produção de riboflavina

O procedimento experimental para a avaliação preliminar da produção de riboflavina foi semelhante ao descrito para o folato (item 3.2.1).

Os isolados foram inoculados, separadamente, em 3 mL de caldo MRS e incubados a 37°C por 24 h. Após a incubação, uma alíquota de 1 mL foi centrifugada a 10000 g durante 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada (LabSynth) e ressuspensas em 1 mL de solução salina esterilizada. Uma alíquota de 120 µL foi transferida para um tubo contendo 3 mL de caldo Riboflavin Assay Medium, RAM, (Difco), um meio quimicamente definido sem riboflavina, incubando-se a 37°C por até 72 h, observando-se a turvação do meio. Este procedimento foi repetido quatro vezes para as culturas que apresentavam boa multiplicação no meio RAM. Os isolados que continuaram multiplicando-se após as quatro passagens no RAM foram selecionados, armazenados a -20°C em caldo MRS adicionado de (20% v/v) de glicerol e testados quanto à produção de riboflavina.

Os isolados que pararam de se multiplicar em alguma das passagens pelo meio RAM foram recuperados do último tubo com meio RAM em que ocorreu multiplicação e inoculados no meio RAM suplementado com uma solução de riboflavina (Sigma-Aldrich) com a concentração final de 1 µg/mL no meio de cultura. Esse procedimento foi realizado para confirmar que a multiplicação cessou por causa da ausência de riboflavina e não de outro componente do meio RAM.

3.3 Avaliação da produção de folato (vitamina B9) pelos isolados

3.3.1 Preparação das suspensões para determinação de folato extracelular (EC) e intracelular (IC)

Os isolados selecionados conforme descrito no item 3.2.1 foram inoculados, separadamente, em 3 mL de caldo MRS e incubados a 37°C por 24 h. Em seguida, uma alíquota de 1 mL foi retirada e centrifugada a 10000 x g por 5 min. Após remoção do sobrenadante, as células remanescentes foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada. As células lavadas foram ressuspensas em 1 mL de solução salina esterilizada

e uma alíquota de 120 µL desta suspensão foi transferida para um tubo contendo 3 mL de FACM, incubando-se a 37°C por 24 h, repetindo-se este procedimento três vezes.

Para determinação da quantidade de folato extracelular (EC) e intracelular (IC), centrifugou-se uma alíquota de 1,5 mL da última suspensão no meio FACM a 10000 x g por 5 min. Em seguida, 500 µL do sobrenadante foram removidos e misturados com 500 µL de tampão protetor [solução de acetato de sódio (0,82%) e ácido ascórbico (1%)] para a obtenção da suspensão EC. Após descarte do restante do sobrenadante, as células foram lavadas três vezes em solução salina esterilizada e o pellet formado foi ressuspenso em 1 mL de tampão protetor para obtenção da suspensão IC.

As duas suspensões (EC e IC) foram aquecidas a 100°C por 5 min, centrifugadas a 10000 x g por 5 min, armazenando-se os sobrenadantes a -20°C até a determinação da concentração de folato.

3.3.2 Determinação da concentração de folato

A determinação da concentração de folato nas suspensões foi realizada de acordo com método de Horne & Patterson (1988) empregando-se como cepa indicadora da presença de folato o *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NCIMB 10463, resistente a cloranfenicol (>500 µg/mL) e dependente de folato para se multiplicar (O'Brien *et al.*, 2001). A cepa indicadora foi cedida pelo Dr. Jean Guy Joseph LeBlanc do Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA), Tucuman, Argentina.

A cepa indicadora foi inoculada em 3 mL de caldo MRS e incubada a 37°C por 24 h. Em seguida, 1 mL desta cultura foi centrifugada a 10000 x g por 5 min, descartando-se o sobrenadante. As células foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada e ressuspenso em 1 mL de solução salina esterilizada. Uma alíquota de 120 µL dessa suspensão foi transferida para um tubo contendo 3 mL de meio FACM, incubando-se a 37°C por 24 h. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, sendo a última cultura utilizada nos testes de determinação da concentração de folato. Para isso, centrifugou-se 1 mL dessa terceira cultura a 10000 x g por 5 min, ressuspendendo-se o sedimento em 1 mL de solução salina esterilizada. A etapa de lavagem das células foi repetida três vezes. Em seguida, 480 µL dessa suspensão foram transferidos para um tubo contendo 12 mL de caldo FACM de dupla concentração, adicionando-se 24 µL de uma solução de cloranfenicol a 20 mg/mL.

Para a determinação da concentração de folato nas suspensões EC e IC, as suspensões foram descongeladas em temperatura ambiente e adicionadas de um volume de tampão fosfato (0,1 M, pH 6,6 – 6,8) suficiente para que o resultado do teste estivesse na faixa de densidade óptica (DO) a 595 nm estabelecida na curva padrão, conforme descrito a

seguir. Após a homogeneização da mistura da suspensão em teste com o tampão fosfato, três alíquotas de 100 µL desta mistura foram transferidas para poços de uma placa para microtitulação de 96 poços, adicionando-se em seguida 100 µL da suspensão contendo a cepa indicadora. Após a homogeneização das misturas com uma pipeta, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h, e após nova homogeneização, efetuou-se a leitura da densidade óptica (DO) a 595 nm, empregando-se um leitor de microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™, Waltham, USA). Simultaneamente a estes testes e empregando a mesma placa de microtitulação, construiu-se uma curva padrão, com soluções de ácido fólico com concentrações entre 0,0 e 1,0 µg/L, preparadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,6 – 6,8). Com base na curva padrão, calculou-se as concentrações de folato intracelular (IC) e extracelular (EC) produzido pelos isolados. A concentração de folato total foi obtida somando-se as concentrações de folato IC e EC. Os resultados foram expressos em µg/L.

3.4 Avaliação da produção de riboflavina (vitamina B2) pelos isolados

3.4.1 Preparação das suspensões para determinação de riboflavina extracelular (EC) e intracelular (IC)

Os isolados selecionados conforme descrito no item 3.2.2 foram inoculados, separadamente, em 3 mL de caldo MRS e incubados a 37°C por 24 h. Em seguida, uma alíquota de 1 mL foi retirada e centrifugada a 10000 x g por 5 min. Após remoção do sobrenadante, as células remanescentes foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada. As células lavadas foram ressuspensas em 1 mL de solução salina esterilizada e uma alíquota de 120 µL desta suspensão foi transferida para um tubo contendo 3 mL de RAM, incubando-se a 37°C por 24 h, repetindo-se este procedimento três vezes.

Para determinação da quantidade de riboflavina extracelular (EC) e intracelular (IC), centrifugou-se uma alíquota de 1,5 mL da última suspensão no meio RAM a 10000 x g por 5 min. Em seguida, 500 µL do sobrenadante foram removidos e misturados com 500 µL de uma solução de ácido acético a (1% v/v) para a obtenção da suspensão EC. Após descarte do restante do sobrenadante, as células foram lavadas três vezes em solução salina esterilizada e o pellet formado foi ressuspensado em 1 mL da solução de ácido acético a (1% v/v) para obtenção da suspensão IC.

As duas suspensões (EC e IC) foram aquecidas a 100°C por 5 min, centrifugadas a 10000 x g por 5 min, armazenando-se os sobrenadantes a -20°C até a determinação da concentração de riboflavina.

3.4.2 Determinação da concentração de riboflavina

A determinação da concentração de riboflavina nas suspensões foi realizada de acordo com o método de Golbach *et al.*, 2007, sendo como cepa indicadora da presença de riboflavina o *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 7469, que depende desta vitamina para sua multiplicação. A cepa indicadora foi cedida pelo Dr. Jean Guy Joseph LeBlanc do Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA), Tucuman, Argentina.

A cepa indicadora foi inoculada em 3 mL de caldo MRS, que foi incubado a 37°C por 24 h. Em seguida, 1 mL dessa cultura foi centrifugada a 10000 x g por 5 min, descartando-se o sobrenadante. As células foram lavadas três vezes em solução salina esterilizada e ressuspensas em 1 mL de solução salina esterilizada. Uma alíquota de 120 µL da suspensão foi inoculada em 3 mL do meio RAM, que foi incubado a 37°C por 24 h. Uma alíquota de 1 mL dessa cultura foi centrifugada, lavada e ressuspensa em 1 mL de solução salina esterilizada. Em seguida, 480 µL dessa foram transferidos para um tubo contendo 12 mL de caldo RAM de dupla concentração.

Para a determinação da concentração de riboflavina nas duas suspensões (EC e IC), as suspensões foram descongeladas em temperatura ambiente e adicionadas de um volume de tampão fosfato (0,1 M, pH 6,6 – 6,8) suficiente para que o resultado do teste estivesse na faixa de densidade óptica (DO) a 595 nm estabelecida na curva padrão, conforme descrito a seguir. Após a homogeneização da mistura da suspensão em teste com o tampão fosfato, três alíquotas de 100 µL desta mistura foram transferidas para poços de uma placa para microtitulação de 96 poços, adicionando-se em seguida 100 µL da suspensão contendo a cepa indicadora. Após a homogeneização das misturas com uma pipeta, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h, e após nova homogeneização, efetuou-se a leitura da densidade óptica (DO) a 595 nm, empregando-se um leitor de microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™). Simultaneamente a estes testes e empregando a mesma placa de microtitulação, construiu-se uma curva padrão, com soluções de riboflavina (10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 µg/L), preparadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,6 – 6,8). Com base na curva padrão, calculou-se as concentrações de riboflavina intracelular (IC) e extracelular (EC) produzida pelos isolados. A concentração de riboflavina total foi obtida somando-se as concentrações de riboflavina IC e EC. Os resultados foram expressos em µg/L.

3.5 Pesquisa do gênero *Enterococcus* entre os isolados produtores de folato e riboflavina

Os isolados que produziram folato total acima da média e todos os isolados produtores de riboflavina foram selecionados e analisados por PCR para identificação daqueles pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. A identificação foi realizada através da amplificação do gene *tuf* (*elongation factor Tu*), que apresenta 112 pb e é específico para *Enterococcus* spp.

A reação de amplificação foi realizada segundo Ke *et al.* (1999), utilizando os *primers* Ent 1 (5'-TACTGACAAACCATTCATGATG-3') e Ent 2 (5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3'). O volume final da reação foi de 50 µL, contendo 2,5 µL de cada primer (10 µM), 2 µL de DNA (20 ng/µL), 21,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x [(2x Green GoTaq® Reaction Buffer, pH 8,5; 400 µM dATP; 400 µM dGTP; 400 µM dCTP; 400 µM dTTP e 3 mM MgCl₂), Promega, USA], sendo o restante do volume completado com água de mili-Q esterilizada. A PCR foi realizada em termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems®, California, USA). As condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguindo-se 35 ciclos contendo uma desnaturação a 94°C por 15 s, um anelamento a 55°C por 15 s e uma extensão a 72°C por 45 s. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 min.

Para a visualização dos fragmentos amplificados, uma alíquota (8 µL) da reação de PCR foi aplicada em 1,5% gel de agarose em tampão TBE 0,5 x, sendo a eletroforese realizada a 100 V por 35 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta após a coloração em brometo de etídio.

3.6 Identificação dos isolados produtores de folato e riboflavina não pertencentes ao gênero *Enterococcus*

Os isolados produtores de folato (n= 39) e/ou riboflavina (n = 8) não pertencentes ao gênero *Enterococcus* foram submetidos a RAPD-PCR para diferenciação e sequenciamento da porção 16S do rDNA para identificação do gênero e espécie.

3.6.1 Random Amplified Polymorphic DNA – Polimerase Chain Reaction (RAPD-PCR)

A reação de amplificação por RAPD-PCR foi realizada segundo Van Reenen & Dicks (1996), utilizando os *primers* OPL 02 (5' -TGGGCGTCAA- 3'), OPL 14 (5' -GTGACAGGCT-3') e OPL 20 (5' -TGGTGGACCA- 3'). O volume final da reação foi de 50 µL, contendo 1,4 µL de primer (10 µM), 2 µL de DNA (20 ng/µL), 25 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x [(2x

Green GoTaq® Reaction Buffer, pH 8,5; 400 µM dATP; 400 µM dGTP; 400 µM dCTP; 400 µM dTTP e 3 mM MgCl₂ (Promega, USA)], sendo o restante do volume completado com água de mili-Q esterilizada. A PCR foi realizada em termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems). As condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 0 min, seguindo-se 45 ciclos contendo uma desnaturação a 94°C por 1 min, um anelamento a 28°C por 1 min e uma extensão a 72°C por 2 min. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 min.

Para a visualização dos fragmentos amplificados, uma alíquota (8 µL) da reação de PCR foi aplicada em 1,5% gel de agarose em tampão TBE 0,5 x, sendo a eletroforese realizada a 70 V por 157 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta após a coloração em brometo de etídio.

3.6.2 Sequenciamento da porção 16S do rDNA

Após a realização do RAPD-PCR, os isolados que apresentaram perfis genéticos distintos foram selecionados para a identificação do gênero e espécie, por meio do sequenciamento da porção 16S do rDNA. A amplificação dessa região foi realizada por PCR, utilizando os *primers* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-TAAGGAGGTGATCCAGGC-3'). O volume final da reação foi de 50 µL, contendo 2,5 µL de cada primer (10 µM), 2 µL de DNA (20 ng/µL), 25 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x [(2x Green GoTaq® Reaction Buffer, pH 8,5; 400 µM dATP; 400 µM dGTP; 400 µM dCTP; 400 µM dTTP e 3 mM MgCl₂ (Promega, USA)], sendo o restante do volume completado com água de mili-Q esterilizada. A PCR foi realizada em termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems). As condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguindo-se 40 ciclos contendo uma desnaturação a 95°C por 30 s, um anelamento a 45°C por 30 s e uma extensão a 72°C por 30 s. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 min.

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada por meio da retirada de uma alíquota (8 µL) da reação de PCR, que foi aplicada em 1,5% gel de agarose em tampão TBE 0,5 x, sendo a eletroforese realizada a 70 V por 60 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta após a coloração em brometo de etídio.

Após a visualização dos fragmentos, os produtos da reação foram purificados, utilizando um kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN, Brasil). Os produtos de purificação foram encaminhados ao Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Universidade de São Paulo, para a realização do sequenciamento.

As cepas foram identificadas por comparação das sequências obtidas com as disponíveis na base de dados GenBank, utilizando o programa Basic Local Alignment

Search Tool (BLAST). Para a identificação taxonômica, o nível de similaridade mínimo considerado entre as sequências foi de 99%.

3.7 Avaliação da produção de folato em leite de cabra

Com base nos resultados do sequenciamento da porção 16S do rDNA e na capacidade de produzir folato em meio de cultivo, foram selecionados 8 isolados para avaliação da produção de folato em leite. Os isolados selecionados pertenciam às espécies *Streptococcus thermophilus* (5 isolados), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (2 isolados) e *Lactobacillus helveticus* (um isolado).

3.7.1 Preparação do inóculo e elaboração do leite fermentado

As cepas selecionadas foram inoculadas individualmente em 3 mL de caldo MRS e incubadas a 37 °C por 18h. Em seguida, 1 mL dessas culturas foi centrifugado a 10000 x g durante 5 min para a obtenção de um pellet. Após remoção do sobrenadante, as células do pellet foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada. Da suspensão final contendo 10⁸ UFC/mL, transferiu-se uma alíquota de 100 µL para 100 mL de leite de cabra UHT, que foi incubado a 37 °C por 24 h.

Durante a incubação do leite, foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 6, 8 e 24h para determinação do pH, enumeração de células viáveis (UFC/mL) e medida da concentração de folato (µg/L).

3.7.2 Determinação do pH

A determinação do pH do leite foi realizada com um medidor digital de pH (PHS-3BW, Bell Engineering, USA).

3.7.3 Enumeração das células viáveis

Uma alíquota de 100 µL do leite fermentado foi transferida para 900 µL de solução salina esterilizada, realizando-se as diluições decimais seriadas subsequentes empregando-se o mesmo diluente. Para enumeração das células viáveis, 100 µL de cada diluição foram transferidos para placas estéreis contendo ágar Man Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid). Após a distribuição das alíquotas na superfície das placas com alças de Drigalsky, as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (Anaerogen 2.5L Sachet, Oxoid) à 37 °C

por 48 h. Após a incubação, as colônias foram enumeradas e o resultado foi expresso em UFC/mL.

3.7.4 Determinação da concentração de folato

3.7.4.1 Preparo das amostras de sobrenadante

Uma alíquota de 500 µL do leite fermentado foi adicionada a 500 µL de tampão protetor [solução de acetato de sódio (0,82%) e ácido ascórbico (1%)], e a mistura foi aquecida à 100 °C por 5 min e centrifugada a 10000 x g. O sobrenadante foi removido e armazenado à -20 °C até a realização da determinação da concentração de folato.

Anteriormente à determinação da concentração de folato, as amostras de sobrenadante foram submetidas a um tratamento trienzimático com o objetivo de liberar o folato seqüestrado pelas proteínas do leite, seguindo-se a metodologia descrita por Iyer *et al.* (2009). Para isso, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e alíquotas de 500 µL foram adicionadas de 100 µL de amilase de *Aspergillus oryzae* (4mg/mL) (Sigma Aldrich) e incubadas à 37 °C por 2 h. Em seguida, as amostras tratadas foram aquecidas a 100 °C por 5 min e resfriadas. As amostras foram então adicionadas de 100 µL de protease de *Streptomyces griseus* (4mg/mL) (Sigma Aldrich), incubando-se a 37 °C por 2 h e 30 min. Após esse período, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min e resfriadas. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para outro tubo, ao qual se adicionou 100 µL de plasma humano (Sigma Aldrich), incubando-se a 37 °C por 3 h. As misturas foram aquecidas a 100 °C por 5 min, resfriadas e centrifugadas a 10000 rpm por 5 min. Os sobrenadantes foram transferidos para outro tubo, e armazenados a -20 °C até a determinação da concentração de folato.

3.7.4.2 Determinação da concentração de folato

Esta determinação foi realizada utilizando o método de Horne & Patterson (1988), que utiliza como cepa indicadora *Lactobacillus casei* subsp *ramnosus* NCIMB 10463 (O'Brien *et al.*, 2001), resistente a cloranfenicol (500 µg/mL) e dependente de folato para multiplicação. A cepa indicadora foi cedida pelo Dr. Jean Guy Joseph LeBlanc do Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA), Tucuman, Argentina.

A cepa indicadora foi inoculada em 3 mL de caldo MRS, e incubada a 37 °C por 24 h. Em seguida, 1 mL dessa cultura foi centrifugada a 10000 x g por 5 min, descartando-se o sobrenadante. As células foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada e, posteriormente, ressuspensas em 1 mL do mesmo diluente. Uma alíquota de 120 µL dessa suspensão foi transferida para um tubo contendo 3 mL de meio FACM, incubando-se a 37

°C por 24 h. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, sendo a última cultura utilizada nos testes de determinação da concentração de folato. Para isso, centrifugou-se 1 mL dessa segunda cultura a 10000 x g por 5 min, ressuspendendo-se o sedimento em 1 mL de solução salina esterilizada. A etapa de lavagem das células foi repetida três vezes. Em seguida, 480 µL dessa suspensão foram transferidos para um tubo contendo 12 mL de caldo FACM de dupla concentração, adicionando-se 24 µL de uma solução de cloranfenicol a 20 mg/mL.

Para a determinação da concentração de folato nas amostras, as suspensões foram descongeladas em temperatura ambiente e adicionadas de um volume de tampão fosfato (0,1 M, pH 6,6-6,8) suficiente para que o resultado do teste estivesse na faixa de densidade óptica (DO) a 595 nm estabelecida na curva padrão, conforme descrito a seguir. Após a homogeneização da mistura da suspensão em teste com o tampão fosfato, três alíquotas de 100 µL desta mistura foram transferidas para poços de uma placa de microtitulação de 96 poços, adicionando-se 100 µL da suspensão contendo a cepa indicadora. Após a homogeneização das misturas com uma pipeta, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, e após nova homogeneização, efetuou-se a leitura da densidade óptica (DO) a 595 nm, empregando-se o leitor de microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™). Simultaneamente a estes testes e empregando a mesma placa de microtitulação, construiu-se uma curva padrão, com soluções de ácido fólico com concentrações entre 0,0 e 1,0 µg/L, preparadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,6 – 6,8). Com base na curva padrão, calculou-se as concentrações de folato das amostras. Os resultados foram expressos em µg/L.

3.8 Avaliação da produção de riboflavina em leite de cabra

Com base nos resultados do sequenciamento da porção 16S do rDNA e na capacidade de produzir riboflavina em meio de cultivo, foram selecionados 4 isolados para avaliação da produção de riboflavina em leite. Os isolados selecionados pertenciam às espécies *Streptococcus thermophilus* (2 isolados), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (um isolado) e *Lactobacillus helveticus* (um isolado).

3.8.1 Preparação do inóculo e elaboração do leite fermentado

As cepas selecionadas foram inoculadas individualmente em 3 mL de caldo MRS e incubadas a 37 °C por 18h. Em seguida, 1 mL dessas culturas foi centrifugado a 10000 x g durante 5 min para a obtenção de um pellet. Após remoção do sobrenadante, as células do

pellet foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada. Da suspensão final contendo 10^8 UFC/mL, transferiu-se uma alíquota de 100 μ L para 100 mL de leite de cabra UHT, que foi incubado a 37 °C por 24 h.

Durante o período de incubação foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 6, 8 e 24h para determinação do pH, enumeração de células viáveis (UFC/mL) e medida da concentração de riboflavina (μ g/L).

3.8.2 Determinação do pH

A determinação do pH do leite foi realizada utilizando um medidor digital de pH (PHS-3BW, Bell Engineering, USA).

3.8.3 Enumeração das células viáveis

Uma alíquota de 100 μ L do leite fermentado foi transferida para 900 μ L de solução salina esterilizada, realizando-se as diluições decimais seriadas subsequentes empregando-se o mesmo diluente. Para enumeração das células viáveis, 100 μ L de cada diluição foram transferidos para placas estéreis contendo ágar Man Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid). Após a distribuição das alíquotas na superfície das placas com allças de Drigalsky, as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (Anaerogen 2.5L Sachet, Oxoid) à 37 °C por 48 h. Após a incubação, as colônias foram enumeradas e o resultado foi expresso em UFC/mL.

3.8.4 Determinação da concentração de riboflavina

3.8.4.1 Preparo das amostras

Uma alíquota de 500 μ L do leite fermentado foi adicionada a 500 μ L de ácido acético 1%, aquecida à 100 °C por 5 min e centrifugada a 10000 x g. O sobrenadante foi removido e armazenado à -20 °C até a realização da determinação da concentração de riboflavina.

Anteriormente à determinação da concentração de riboflavina, as amostras de sobrenadante foram submetidas a um tratamento com ácido tricloroacético (TCA) a 0,75 M com o objetivo de liberar a riboflavina seqüestrada pelas proteínas do leite. Para isso, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e alíquotas de 300 μ L foram adicionadas de 100 μ L de ácido tricloroacético 0,75 M (Labsynth) e incubadas à 4 °C por 1 h. Em seguida, as amostras tratadas foram centrifugadas a 10000 x g por 5 min. Os sobrenadantes foram

transferidos para outro tubo, e armazenados a -20 °C até a determinação da concentração de riboflavina.

3.8.4.2 Determinação da concentração de riboflavina

Esta determinação foi realizada utilizando o método de Golbach *et al.*, 2007, que utiliza como cepa indicadora *Lactobacillus casei* subsp *ramnosus* ATCC 7469, dependente de vitamina B2 para multiplicação. A cepa indicadora foi cedida pelo Dr. Jean Guy Joseph LeBlanc do Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA), Tucuman, Argentina.

A cepa indicadora foi inoculada em 3 mL de caldo MRS, e incubado a 37 °C por 24 h. Em seguida, 1 mL dessa cultura foi centrifugada a 10000 x g por 5 min, descartando-se o sobrenadante. As células foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada e, posteriormente, ressuspensas em 1 mL do mesmo diluente. Uma alíquota de 120 µL dessa suspensão foi transferida para um tubo contendo 3 mL de meio RAM suplementado com 1,5 µL de solução de riboflavina (1mg/mL), incubando-se a 37 °C por 24 h. Essa cultura foi utilizada nos testes de determinação da concentração de vitamina B2. Para isso, centrifugou-se 1 mL dessa cultura a 10000 x g por 5 min, ressuspendendo-se o sedimento em 1 mL de solução salina esterilizada. A etapa de lavagem das células foi repetida três vezes. Em seguida, 480 µL dessa suspensão foram transferidos para um tubo contendo 12 mL de caldo RAM de dupla concentração.

Para a determinação da concentração de riboflavina nas amostras, as suspensões foram descongeladas em temperatura ambiente e adicionadas de um volume de tampão fosfato (0,1 M, pH 6,6 – 6,8) suficiente para que o resultado do teste estivesse na faixa de densidade óptica (DO) a 595 nm estabelecida na curva padrão, conforme descrito a seguir. Após a homogeneização da mistura da suspensão em teste com o tampão fosfato, três alíquotas de 100 µL desta mistura foram transferidas para poços de uma placa de microtitulação de 96 poços, adicionando-se 100 µL da suspensão contendo a cepa indicadora. Após a homogeneização das misturas com uma pipeta, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, e após nova homogeneização, efetuou-se a leitura da densidade óptica (DO) a 595 nm, empregando-se o leitor de microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™). Simultaneamente a estes testes e empregando a mesma placa de microtitulação, construiu-se uma curva padrão, com soluções de riboflavina com concentrações entre 0,0 e 200,0 µg/L, preparadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,6–6,8). Com base na curva padrão, calculou-se as concentrações de riboflavina das amostras. Os resultados foram expressos em µg/L.

3.9 Análise Estatística

As concentrações de folato e de riboflavina EC, IC e total foram expressas como médias aritméticas \pm desvio padrão, considerando as triplicatas efetuadas. A significância das diferenças de concentrações de folato e de riboflavina EC, IC e total produzidos pelos isolados obtidos de leite de cabra cru e de queijo de cabra foi determinada através dos testes Mann-Whitney e t de Student, de acordo com a distribuição das variáveis, empregando-se o programa Sigma Stat, versão 3.11 (Systat Software, USA).

Os valores de produção de folato e riboflavina em leite de cabra foram expressos em médias aritméticas \pm desvio padrão, considerando as triplicatas realizadas. As comparações foram realizadas por meio de um teste de ANOVA, seguida por um teste de Tukey, considerando um nível de significância de $p < 0,05$. O programa utilizado foi o Assistat, versão 7.7.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 179 isolados de bactérias lácticas, sendo 87 provenientes de leite de cabra cru e 92 de queijo de cabra.

4.1 Avaliação da produção de folato pelos isolados em meio de cultivo

Do total de 179 isolados, 151 (84,4%) deram resultado positivo nos testes preliminares de produção de folato, pois foram capazes de se multiplicar em meio de cultura sem folato (meio FACM), em sete cultivos sucessivos neste meio. Dentre os 151 isolados, 72 eram provenientes de leite de cabra cru e 79 de queijo de cabra.

Os demais isolados (28) que pararam de se multiplicar em uma das sete passagens pelo meio FACM voltaram a se multiplicar quando inoculados em meio FACM suplementado com ácido fólico, indicando que não eram produtores de folato.

A frequência de isolamento de cepas potencialmente produtoras de folato (84,4%) foi mais alta que a reportada por Laiño *et al.* 2012, que observaram que dentre 92 cepas analisadas apenas 36, ou seja 39,1%, foram capazes de se multiplicar em sete cultivos sucessivos no meio FACM. A multiplicação de bactérias em meio de cultura sem folato não necessariamente indica que elas produzem essa vitamina, pois algumas podem não necessitar dessa vitamina para se multiplicar. No entanto, esta técnica mostrou-se eficiente para selecionar bactérias lácticas produtoras de folato.

A Tabela 1 apresenta os valores médios das concentrações de folato extracelular (EC), intracelular (IC) e total (EC + IC), produzido pelos isolados em meio FACM. Houve

uma diferença significativa ($p < 0,1$) entre a média da concentração de folato total produzido pelos isolados de leite (154,9 $\mu\text{g/L}$) e o produzido pelos isolados de queijo (124,0 $\mu\text{g/L}$). Igualmente, houve diferença significativa entre as concentrações de folato IC produzido pelos dois tipos de isolado. O mesmo foi observado para as concentrações de folato EC. Os isolados provenientes de leite de cabra foram capazes de produzir quantidades mais elevadas de todos os tipos de folato (EC, IC e total) que os isolados de queijo de cabra.

Tabela 1. Média das concentrações de folato extracelular, intracelular e total, produzido pelos isolados obtidos de leite de cabra cru e queijos de cabra.

Concentração de folato ($\mu\text{g/L}$)	Origem dos isolados		
	Leite de cabra cru	Queijo de cabra	Leite + queijo
Extracelular	68,9 ^a	63,2 ^b	65,9
Intracelular	85,9 ^a	60,9 ^b	72,8
Total	154,9 ^a	124,0 ^b	138,8

Valores na mesma linha seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,1$, Teste Mann-Whitney)

Os valores para cada isolado individualmente estão apresentados na Tabela 2. A concentração de folato total variou desde 0,7 $\mu\text{g/L}$ (isolado 313 pc) até 498,3 $\mu\text{g/L}$ (isolado 244). Os dois isolados mencionados eram provenientes de leite de cabra. Entre os 72 isolados provenientes de leite de cabra, a concentração de folato total foi superior à média em 33 isolados (45,8%), enquanto para os isolados oriundos de amostras de queijo, a capacidade de produzir uma quantidade de folato total acima do valor médio foi observada em 43 (54,4%) dos 79 isolados.

A concentração de folato EC foi semelhante à concentração de folato IC para a maioria dos isolados (Tabela 2), não havendo diferença significativa entre estas concentrações ($p < 0,05$). A média da concentração de folato EC foi 65,9 $\mu\text{g/L}$, com valores variando entre 0,3 $\mu\text{g/L}$ (isolado 355 pc) e 269,1 $\mu\text{g/L}$ (isolado 361 v). Os dois isolados mencionados foram obtidos de queijo de cabra. Em 40,4% dos isolados, a concentração de folato EC esteve acima da média.

Em relação ao folato IC, observou-se que a média da concentração de folato intracelular (IC) foi 72,8 $\mu\text{g/L}$, variando de 0,4 $\mu\text{g/L}$ (isolado 364 v, proveniente de queijo) a 358,6 $\mu\text{g/L}$ (isolado 249, proveniente de leite). Em 47,0% dos isolados, a concentração de folato IC esteve acima da média. Em 32 isolados (17,9% do total de isolados estudados), as concentrações de folato IC e de folato EC estiveram concomitantemente acima das médias (65,9 $\mu\text{g/L}$ e 72,8 $\mu\text{g/L}$, respectivamente). Chamou atenção o fato de a concentração de folato IC para isolado 313pc, obtido de leite de cabra, ter sido zero.

Tabela 2. Concentrações de folato extracelular, intracelular e total produzido pelos isolados obtidos de leite de cabra cru e de queijos de cabra.

Isolado	Concentração de folato extracelular (µg/L)*	Concentração de folato intracelular (µg/L)*	Concentração de folato total (µg/L)^a
Leite			
32	1,1 ± 0,0	3,8 ± 0,0	4,9
34 v	107,2 ± 0,6	7,2 ± 0,0	114,4
36 pc	74,2 ± 0,5	97,7 ± 0,5	171,9
36 v	123,8 ± 0,3	13,7 ± 0,0	137,5
54 pc	49,0 ± 0,3	131,6 ± 0,5	180,6
54 v	41,9 ± 0,3	51,5 ± 0,2	93,4
58 pc	85,1 ± 0,3	63,4 ± 0,1	148,5
58 v	62,7 ± 0,1	68,9 ± 0,6	131,6
170 v	190,3 ± 2,6	121,1 ± 0,9	311,4
172 pc	99,7 ± 0,3	85,5 ± 0,5	185,2
172 v	92,8 ± 0,6	98,3 ± 1,3	191,1
173 pc	160,7 ± 0,8	82,3 ± 0,7	243,0
173 v	145,9 ± 0,7	95,8 ± 1,0	241,7
174 pc	173,6 ± 1,1	98,5 ± 0,5	272,1
174 v	218,6 ± 1,2	61,4 ± 0,1	280,0
179 pc	101,9 ± 0,3	111,1 ± 0,4	213,0
179 v	81,7 ± 0,3	103,3 ± 0,7	185,0
180 pc	109,4 ± 0,7	67,3 ± 0,3	176,7
180 v	78,2 ± 0,6	71,9 ± 0,0	150,1
186 pc	151,3 ± 0,3	80,9 ± 0,4	232,2
186 v	47,7 ± 0,1	97,8 ± 0,6	145,5
190 pc	115,4 ± 0,4	86,5 ± 0,5	201,9
190 v	134,1 ± 0,6	92,5 ± 0,7	226,6
200A pc	88,8 ± 0,4	69,9 ± 0,4	158,7
200A v	160,3 ± 0,6	66,2 ± 0,5	226,5
200B	17,9 ± 0,0	85,8 ± 0,4	103,7
213	38,8 ± 0,6	78,4 ± 0,3	117,2
224 pc	85,8 ± 0,5	92,0 ± 0,3	177,8
224 v	50,0 ± 0,4	91,2 ± 0,0	141,2
235 pc	121,0 ± 0,7	100,9 ± 1,1	221,9

* Valores expressos em média ± desvio padrão

^a Soma das médias das concentrações de folato extracelular e intracelular (p<0.05, Teste Mann-Whitney)

Tabela 2. Continuação

Isolado	Concentração de folato extracelular (µg/L)*	Concentração de folato intracelular (µg/L)*	Concentração de folato total (µg/L)^a
Leite			
235 v	126,1 ± 1,0	79,1 ± 0,2	205,2
239 pc	33,8 ± 0,1	162,3 ± 1,0	196,1
239 v	29,9 ± 0,1	111,6 ± 0,4	141,5
241	187,1 ± 0,4	246,6 ± 1,0	433,7
242	4,2 ± 0,0	146,0 ± 1,8	150,2
243 v	44,3 ± 0,0	125,6 ± 0,0	169,9
244	142,9 ± 0,4	355,4 ± 0,1	498,3
245	6,1 ± 0,0	60,5 ± 0,5	66,6
248 pc	34,9 ± 0,2	90,2 ± 0,2	125,1
248 v	2,6 ± 0,0	40,0 ± 0,0	42,6
249	82,3 ± 0,2	358,6 ± 0,7	440,9
250 pc	32,0 ± 0,3	105,2 ± 0,3	137,2
250 v	62,3 ± 0,2	106,4 ± 0,3	168,7
251	3,2 ± 0,0	135,9 ± 0,3	139,1
253 v	0,6 ± 0,0	30,8 ± 0,2	31,4
254	227,8 ± 0,7	112,9 ± 0,4	340,7
258	56,1 ± 1,3	30,2 ± 0,2	86,3
260 pc	134,8 ± 0,4	127,8 ± 1,0	262,6
260 v	149,2 ± 0,4	116,2 ± 0,5	265,4
261	44,6 ± 0,1	246,7 ± 0,2	291,3
262	6,2 ± 0,0	2,5 ± 0,0	8,7
265 pc	13,1 ± 0,0	5,5 ± 0,0	18,6
266	29,0 ± 0,0	47,0 ± 0,1	76,0
267	14,3 ± 0,0	114,3 ± 0,2	128,6
268 pc	0,6 ± 0,0	2,6 ± 0,0	3,2
268 v	53,4 ± 0,2	174,8 ± 1,6	228,2
270	3,3 ± 0,0	1,4 ± 0,0	4,7
271	163,1 ± 0,3	73,4 ± 0,0	236,5
274	9,4 ± 0,0	96,6 ± 0,2	106,0
275	4,1 ± 0,0	2,0 ± 0,0	6,1

* Valores expressos em média ± desvio padrão

^a Soma das médias das concentrações de folato extracelular e intracelular (p<0.05, Teste Mann-Whitney)

Tabela 2. Continuação

Isolado	Concentração de folato extracelular ($\mu\text{g/L}$)*	Concentração de folato intracelular ($\mu\text{g/L}$)*	Concentração de folato total ($\mu\text{g/L}$) ^a
Leite			
276	4,8 \pm 0,0	124,2 \pm 0,1	129,0
277	29,1 \pm 0,0	43,9 \pm 0,1	73,0
279	85,4 \pm 0,1	75,3 \pm 0,5	160,7
285	10,2 \pm 0,0	3,0 \pm 0,0	13,2
295	2,8 \pm 0,0	2,0 \pm 0,0	4,8
298	3,4 \pm 0,0	1,6 \pm 0,0	5,0
313 pc	0,7 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,7
315 pc	2,5 \pm 0,0	1,6 \pm 0,0	4,1
315 v	27,1 \pm 0,0	20,8 \pm 0,1	47,9
316	7,4 \pm 0,0	125,9 \pm 1,6	133,3
317	53,9 \pm 0,1	50,3 \pm 0,5	104,2
318	26,5 \pm 0,2	55,3 \pm 0,4	81,8
Queijos			
331 v	73,7 \pm 0,2	22,7 \pm 0,0	96,4
332 v	134,0 \pm 0,0	15,1 \pm 0,0	149,1
333 v	132,5 \pm 0,5	9,3 \pm 0,0	141,8
334 v	190,7 \pm 0,3	20,4 \pm 0,0	211,1
335 v	167,7 \pm 0,5	12,4 \pm 0,0	180,1
336 v	30,5 \pm 0,1	171,1 \pm 1,8	201,6
337 v	155,8 \pm 0,4	16,0 \pm 0,0	171,8
338 v	178,9 \pm 0,1	12,5 \pm 0,0	191,4
339 v	145,1 \pm 1,3	34,9 \pm 0,0	180,0
340	32,5 \pm 0,2	150,1 \pm 1,4	182,6
341 pc	52,0 \pm 0,1	56,5 \pm 0,5	108,5
341 v	125,9 \pm 1,0	12,5 \pm 0,0	138,4
342 v	159,0 \pm 1,3	13,6 \pm 0,0	172,6
343 pc	71,0 \pm 0,6	181,9 \pm 1,0	252,9
343 v	166,0 \pm 0,9	3,0 \pm 0,0	169,0
344	4,6 \pm 0,0	2,6 \pm 0,0	7,2

* Valores expressos em média \pm desvio padrão^a Soma das médias das concentrações de folato extracelular e intracelular ($p < 0.05$, Teste Mann-Whitney)

Tabela 2. Continuação

Isolado	Concentração de folato extracelular ($\mu\text{g/L}$)*	Concentração de folato intracelular ($\mu\text{g/L}$)*	Concentração de folato total ($\mu\text{g/L}$) ^a
Queijos			
345 pc	135,8 \pm 0,2	61,5 \pm 0,2	197,3
345 v	146,3 \pm 1,3	95,8 \pm 0,1	242,1
346	5,6 \pm 0,0	112,6 \pm 1,6	118,2
348	20,9 \pm 0,1	148,5 \pm 0,7	169,4
349 pc	0,0 \pm 0,0	3,2 \pm 0,0	3,2
349 v	82,7 \pm 0,3	43,2 \pm 0,3	125,9
350	5,1 \pm 0,0	97,1 \pm 1,5	102,2
351 pc	2,3 \pm 0,0	3,6 \pm 0,0	5,9
351 v	26,1 \pm 0,1	38,6 \pm 0,3	64,7
352	3,1 \pm 0,0	19,7 \pm 0,0	22,8
353	5,7 \pm 0,0	2,4 \pm 0,0	8,1
354 v	243,8 \pm 1,1	14,9 \pm 0,0	258,7
355 pc	0,3 \pm 0,0	0,7 \pm 0,0	1,0
355 v	0,8 \pm 0,0	6,3 \pm 0,0	7,1
356	13,4 \pm 0,0	141,9 \pm 2,1	155,3
357	4,1 \pm 0,0	111,9 \pm 0,6	116,0
358	3,2 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	8,2
359	17,3 \pm 0,0	78,2 \pm 0,4	95,5
360 v	59,7 \pm 0,4	107,2 \pm 0,0	166,9
361 pc	106,5 \pm 0,3	30,6 \pm 0,3	137,1
361 v	269,1 \pm 1,2	24,8 \pm 0,0	293,9
362	29,9 \pm 0,0	109,0 \pm 0,6	138,9
363 v	7,1 \pm 0,0	22,7 \pm 0,0	29,8
364 pc	120,3 \pm 0,1	91,9 \pm 0,8	212,2
364 v	52,7 \pm 0,3	0,4 \pm 0,0	53,1
365	4,1 \pm 0,0	5,1 \pm 0,0	9,2
366	96,6 \pm 0,0	292,4 \pm 0,0	389,0
367	1,1 \pm 0,3	1,3 \pm 0,5	2,4
368	19,2 \pm 0,0	224,0 \pm 0,3	243,2
369	101,3 \pm 0,4	119,3 \pm 0,6	220,6

* Valores expressos em média \pm desvio padrão^a Soma das médias das concentrações de folato extracelular e intracelular ($p < 0,05$, Teste Mann-Whitney)

Tabela 2. Continuação

Isolado	Concentração de folato extracelular ($\mu\text{g/L}$)*	Concentração de folato intracelular ($\mu\text{g/L}$)*	Concentração de folato total ($\mu\text{g/L}$) ^a
Queijos			
370	25,7 \pm 0,0	137,7 \pm 0,8	163,4
371	4,4 \pm 0,0	74,9 \pm 0,6	79,3
372	41,4 \pm 0,1	117,3 \pm 0,7	158,7
374	3,2 \pm 0,0	4,3 \pm 0,0	7,5
375	4,5 \pm 0,0	4,3 \pm 0,0	8,8
378	3,8 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0	4,6
379	0,9 \pm 0,0	4,6 \pm 0,0	5,5
380	1,8 \pm 0,0	3,7 \pm 0,0	5,5
385	14,5 \pm 0,0	175,9 \pm 0,6	190,4
387	2,4 \pm 0,0	1,7 \pm 0,0	4,1
388	4,7 \pm 0,0	7,5 \pm 0,0	12,2
394	0,7 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0	1,8
402	41,4 \pm 0,1	62,2 \pm 0,2	103,6
403	38,0 \pm 0,1	110,2 \pm 0,2	148,2
408	23,3 \pm 0,0	75,2 \pm 0,2	98,5
410	99,7 \pm 0,4	65,7 \pm 0,2	165,4
419	67,6 \pm 0,4	68,7 \pm 0,3	136,3
421	152,8 \pm 0,7	134,5 \pm 2,4	287,3
422	136,0 \pm 0,0	97,5 \pm 1,0	233,5
425	114,8 \pm 0,3	94,5 \pm 1,6	209,3
442	101,4 \pm 0,3	40,4 \pm 0,2	141,8
443	87,1 \pm 0,2	69,0 \pm 0,4	156,1
444	73,1 \pm 0,5	19,7 \pm 0,0	92,8
445	43,6 \pm 0,0	58,3 \pm 0,2	101,9
446	27,6 \pm 0,0	42,0 \pm 0,1	69,6
447	59,6 \pm 0,0	108,1 \pm 0,9	167,7
448	59,5 \pm 0,1	71,8 \pm 0,2	131,3
449	112,9 \pm 0,2	90,4 \pm 0,5	203,3
453	63,9 \pm 0,3	47,0 \pm 0,1	110,9
455	47,8 \pm 0,0	84,8 \pm 0,3	132,6

* Valores expressos em média \pm desvio padrão^a Soma das médias das concentrações de folato extracelular e intracelular ($p < 0.05$, Teste Mann-Whitney)

Tabela 2. Continuação

Isolado	Concentração de folato extracelular (µg/L)*	Concentração de folato intracelular (µg/L)*	Concentração de folato total (µg/L) ^a
Queijos			
461	56,6 ± 0,0	111,2 ± 0,4	167,8
472	46,2 ± 0,0	29,7 ± 0,1	75,9
474	26,0 ± 0,0	45,4 ± 0,0	71,4

* Valores expressos em média ± desvio padrão

^a Soma das médias das concentrações de folato extracelular e intracelular (p<0.05, Teste Mann-Whitney)

Os isolados testados neste estudo foram melhores produtores de folato que o reportado em outros trabalhos, que usaram a mesma metodologia para mensurar a produção de folato por bactérias lácticas. Por exemplo, Laiño *et al.* (2012) relataram que o melhor produtor de folato no meio FACM de seu estudo foi capaz de produzir $94,8 \pm 0,4$ µg/L, enquanto Gangadharan *et al.* (2010) relataram um máximo de $13,5 \pm 0,04$ µg/L. No presente estudo, observou-se que 135 dos 179 (75,4%) isolados analisados produziram folato total em concentração mais elevada que a reportada nos dois estudos mencionados. Ressalte-se que a cepa 244, proveniente de leite cru de cabra, foi capaz de produzir 498,3 µg/L de folato total, ou seja, produziu cinco vezes mais folato total que o melhor isolado produtor de folato reportado por Laiño *et al.* (2012) e quarenta vezes mais que o melhor isolado reportado por Gangadharan *et al.* (2010). Ressalta-se ainda que a concentração média de folato total produzido por este isolado foi quase o triplo da concentração média observada neste estudo para os isolados obtidos de leite cru (154,9 µg/L) e o quadruplo da observada para os isolados de queijo de cabra (124,0 µg/L).

Os resultados deste estudo indicaram que a capacidade de produzir folato foi isolado-dependente, conforme já havia sido observado também por outros autores (LeBlanc *et al.* 2010a; Lin *et al.*, 2000; Nor *et al.*, 2010). Também Sybesma *et al.* (2003) observaram que cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produziram desde 57 µg/L até 291 µg/L de folato em meio de cultivo, dependendo da cepa considerada. Igualmente, a variação foi de 2 µg/L até 89 µg/L para cepas de *Lactobacillus helveticus*, e de 29 µg/L a 202 µg/L para isolados de *Streptococcus thermophilus*. Por outro lado, a concentração de folato produzido em meio de cultivo por diferentes espécies de *Bifidobacterium* sp. variou de 70 a 110 µg/L (Pompei *et al.*, 2007), ou seja, a variação foi inferior à observada no presente estudo.

4.2 Avaliação da produção de riboflavina pelos isolados em meio de cultura

Do total de 179 isolados, 15 (8,4%) deram resultado positivo nos testes preliminares de produção de riboflavina, pois foram capazes de se multiplicar em meio de cultura sem riboflavina (meio RAM), em quatro cultivos sucessivos neste meio. Dentre os 15 isolados, 11 eram provenientes de queijo de cabra e 4 de leite de cabra cru.

Os demais isolados (164) que pararam de se multiplicar em uma das quatro passagens pelo meio RAM voltaram a se multiplicar quando inoculados em meio RAM suplementado com riboflavina, indicando que não eram produtores desta vitamina.

A frequência de isolamento de cepas potencialmente produtoras de riboflavina (8,4%) foi menor que a reportada por Juárez del Valle *et al.* (2014), que observaram que dentre 179 cepas analisadas, 42, ou seja 23,5%, foram capazes de se multiplicar em quatro cultivos sucessivos no meio RAM. No estudo realizado por Jayashree *et al.* (2010), a frequência de isolamento de cepas potencialmente produtoras de riboflavina foi de 50% (24 de um total de 48), e portanto mais elevada que a observada neste estudo e também no de Juárez del Valle *et al.* (2014).

A Tabela 3 apresenta os resultados médios das concentrações de riboflavina extracelular (EC), intracelular (IC) e total (EC + IC) produzida pelos 15 isolados em meio RAM, dos quais 4 foram provenientes de leite de cabra cru e 11 de queijo de cabra. Não houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias das concentrações de riboflavina EC, IC e total produzida pelos isolados de leite de cabra cru e de queijo de cabra.

Tabela 3. Média das concentrações de riboflavina extracelular, intracelular e total, produzida pelos isolados obtidos de leite de cabra cru e queijos de cabra.

Concentração de riboflavina ($\mu\text{g/L}$)	Origem dos isolados		
	Leite de cabra cru	Queijo de cabra	Leite + queijo
Extracelular	205,3 ^a	253,2 ^a	240,4
Intracelular	114,0 ^a	126,6 ^a	123,2
Total	319,3 ^a	379,8 ^a	363,7

Valores na mesma linha seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$, Teste t de Student)

Os valores para cada isolado individualmente estão apresentados na Tabela 4. O valor médio da concentração de riboflavina total (EC + IC) produzida pelos 15 isolados estudados foi 363,7 $\mu\text{g/L}$, variando de 129,3 $\mu\text{g/L}$ (isolado 353, proveniente de queijo) a 531,5 $\mu\text{g/L}$ (isolado 34v, proveniente de leite de cabra). Dentre os isolados produtores de riboflavina, 9 (60%) produziram riboflavina total (EC + IC) acima da concentração média, sendo a maioria dos isolados (8) proveniente de queijo de cabra e apenas um de leite de cabra cru.

A média da concentração de riboflavina EC produzida pelos isolados foi 240,4 µg/L, variando de 96,7 µg/L (isolado 352, obtido de queijo de cabra) a 408,0 µg/L (isolado 360, obtido de queijo de cabra). Verificou-se que 9 dos 15 isolados produtores de riboflavina (60%) produziram riboflavina EC em concentração superior à média (363,7 ± 147,1 µg/L).

A concentração média de riboflavina IC foi 123,2 µg/L, variando de 16,7 µg/L (isolado 353, obtido de queijo) a 215,1 µg/L (isolado 472, obtido de queijo). Em sete dos 15 isolados produtores de riboflavina (46,7%) a concentração de riboflavina IC foi superior à média.

Tabela 4. Concentrações de riboflavina extracelular, intracelular e total, produzida pelos isolados provenientes de leite de cabra cru e queijos de cabra.

Isolado	Concentração de riboflavina extracelular (µg/L)*	Concentração de riboflavina intracelular (µg/L)*	Concentração de riboflavina total (µg/L)**
Leite			
34 v	366,7 ± 0,6 ^b	164,8 ± 0,2 ^c	531,5
190 pc	193,3 ± 0,4 ^b	85,8 ± 0,1 ^c	279,1
224 v	132,0 ± 0,6 ^b	88,0 ± 0,0 ^c	220,0
241	129,3 ± 0,1 ^b	117,3 ± 0,2 ^c	246,6
Queijos			
341 pc	256,0 ± 0,3 ^b	194,6 ± 0,1 ^c	450,6
348	364,0 ± 0,6 ^b	64,9 ± 0,0 ^c	428,9
349 pc	338,7 ± 0,1 ^b	184,0 ± 0,2 ^c	522,7
352	96,7 ± 0,0 ^b	76,2 ± 0,5 ^c	172,9
353	112,7 ± 0,4 ^b	16,7 ± 0,0 ^c	129,4
355 pc	286,7 ± 0,5 ^b	133,3 ± 0,7 ^c	420,0
358	274,7 ± 0,0 ^b	159,1 ± 0,7 ^c	433,8
368	408,0 ± 0,2 ^b	115,1 ± 0,1 ^c	523,1
395	108,0 ± 0,1 ^b	43,1 ± 0,0 ^c	151,1
472	293,3 ± 0,5 ^b	215,1 ± 0,6 ^c	508,4
474	246,7 ± 0,4 ^b	190,6 ± 0,1 ^c	437,3

* Valores expressos em média ± desvio padrão

** Soma das médias das concentrações de riboflavina extracelular e intracelular

Médias ± desvio padrão na mesma linha seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si (p<0.05, Teste Mann-Whitney)

Dentre os 15 isolados produtores de riboflavina, 14 também produziram folato. Observou-se que dois destes 15 isolados (isolado 348 e 368 provenientes de queijo de cabra) produziram simultaneamente folato total e riboflavina total acima das médias (138,8 µg/L e 363,7 µg/L, respectivamente).

Os isolados obtidos neste estudo foram capazes de produzir riboflavina em concentrações inferiores às reportadas por outros autores, tais como Jayashree *et al.* (2010, que conseguiram isolar uma cepa com capacidade de produzir 2,29 mg/L de riboflavina, um valor muito superior ao máximo observado no presente estudo. No entanto, os resultados de

produção de riboflavina aqui reportados foram superiores aos de Burgess *et al.* (2006), que isolaram cepas com a capacidade de produzir essa vitamina em concentrações de, no máximo, 200 µg/L.

4.3 Identificação dos isolados produtores de folato e riboflavina

Os resultados dos testes de PCR para *Enterococcus* spp. indicaram que 43 dos 77 isolados que produziam folato total acima da média e 7 dos 15 isolados produtores de riboflavina pertencem ao gênero *Enterococcus* spp. Dadas as limitações de aplicação de BAL pertencentes a este gênero em alimentos, estes isolados foram excluídos dos testes posteriores de produção de vitaminas em leite de cabra UHT.

A análise do RAPD-PCR com os *primers* OPL 02, OPL 14 e OPL 20 indicou que os demais isolados produtores de folato e riboflavina pertenceram a 19 grupos genéticos diferentes.

Através do sequenciamento da porção 16S do rDNA de um isolado de cada um dos 19 grupos geneticamente diferentes, verificou-se que os isolados pertenceram à sete espécies (Tabela 5), sendo *Streptococcus thermophilus* a espécie mais comum (7 isolados), seguido de *Weissella paramensenteroides* (6 isolados), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (4 isolados), *Bacillus* sp. (um isolado), *Lactobacillus helveticus* (um isolado), *Streptococcus lutetiensis* (um isolado) e *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (um isolado). Oito dos isolados identificados foram produtores de folato e riboflavina simultaneamente.

Tabela 5. Grupos genéticos e identificação dos isolados produtores de folato e riboflavina.

Grupo genético (RAPD-PCR)	Isolado	Identificação
A	34v	<i>Streptococcus thermophilus</i> ^{ab}
A	170 v	<i>Streptococcus thermophilus</i> ^a
B	36pc	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ^a
C	179pc	<i>Weissella paramesenteroides</i> ^a
D	190pc	<i>Weissella paramesenteroides</i> ^{ab}
E	348	<i>Bacillus</i> sp. ^{ab}
F	352	<i>Lactobacillus helveticus</i> ^{ab}
G1	361v	<i>Streptococcus thermophilus</i> ^a
G2	360v	<i>Streptococcus thermophilus</i> ^a
H	366	<i>Weissella paramesenteroides</i> ^a
I	368	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ^{ab}
J	472	<i>Streptococcus lutetiensis</i> ^{ab}
K	474	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> ^{ab}
L	334v	<i>Streptococcus thermophilus</i> ^a
L	341pc	<i>Streptococcus thermophilus</i> ^{ab}
M	340	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ^a
N	260pc	<i>Weissella paramesenteroides</i> ^a
O	242	<i>Weissella paramesenteroides</i> ^a
P	244	<i>Weissella paramesenteroides</i> ^a
Q	268v	<i>Streptococcus thermophilus</i> ^a
R	343pc	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ^a

^a Produtor de folato.^b Produtor de riboflavina.

4.4 Avaliação da produção de folato em leite de cabra

Observou-se que 7 dos 8 isolados testados foram capazes de produzir folato em leite de cabra UHT a 37°C. Cinco destes isolados foram pertencentes à espécie *Streptococcus thermophilus* e 2 à espécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Apenas o isolado *Lactobacillus helveticus* FP352 não foi capaz de produzir folato no leite UHT, visto que a concentração de folato no leite após 24h não foi maior do que a detectada no tempo zero.

Segundo informações encontradas na literatura, bactérias pertencentes às espécies *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* são capazes de sintetizar folato, enquanto aquelas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* sp. normalmente não possuem esta característica, sendo, na verdade, consumidoras dessa vitamina (LeBlanc *et al.*, 2007). No entanto, há relatos de produção de folato por cepas pertencentes a algumas espécies de *Lactobacillus*, como *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* e *Lb. reuteri*, além de *Leuconostoc lactis*, *Propionibacterium*, e *Bifidobacterium longum* (Crittenden *et al.*, 2003; Gangadharan *et al.*, 2010; LeBlanc *et al.*, 2011; Lin & Young *et al.*, 2000; Pompei *et al.*, 2007).

A Tabela 6 apresenta os valores de pH, contagem de células viáveis (UFC/mL) e concentração de folato total produzido pelos oito isolados, em leite de cabra UHT, mensurados nos tempos 0, 6, 8 e 24 h após a adição dos isolados ao leite. Para a maioria, o aumento da produção de folato total ao longo do tempo foi acompanhado por uma diminuição do pH do leite. Por outro lado, as Figuras 1 e 2 indicam que, com exceção de *Lactobacillus helveticus* FP352, a população dos demais isolados estudados manteve-se constante a partir de 6h, mas a produção de folato total continuou aumentando, até o final do período de incubação (24h). Também Laiño *et al* (2012) observaram que a produção de folato é cepa-dependente e nem sempre aumenta com o aumento da população da cepa produtora. Segundo, Laiño *et al* (2012), o aumento na produção de folato foi proporcional à multiplicação da cepa CRL415, enquanto duas outras cepas de BAL atingiram o máximo de produção de folato em 6h, enquanto a multiplicação continuou de forma exponencial até 10h.

Tabela 6. Contagem de células viáveis, pH e concentração de folato em leite de cabra UHT após 0, 6, 8, 24 h a 37°C

Isolado	Tempo (h)	Contagem (log UFC/mL)*	pH	Concentração de folato (µg/L)**	Folato total em 24h (µg/L)***
<i>Streptococcus thermophilus</i> FP34v	0	5,32 ± 0,31	6,55	48,07 ± 17,53 ^c	171,80 ± 8,66 ^{abc}
	6	8,70 ± 0,30	5,36	83,77 ± 10,39 ^c	
	8	8,90 ± 0,09	4,89	165,56 ± 34,84 ^b	
	24	8,84 ± 0,29	4,15	219,88 ± 8,87 ^a	
<i>Streptococcus thermophilus</i> FP170v	0	5,06 ± 0,52	6,54	23,41 ± 9,16 ^b	187,91 ± 60,81 ^{ab}
	6	8,21 ± 0,73	5,95	44,80 ± 2,74 ^b	
	8	8,63 ± 0,21	5,33	221,93 ± 28,58 ^a	
	24	8,61 ± 0,11	4,28	211,31 ± 69,97 ^a	
<i>Streptococcus thermophilus</i> FP268v	0	5,26 ± 0,34	6,53	56,58 ± 17,80 ^b	183,42 ± 18,76 ^{ab}
	6	8,28 ± 0,19	5,36	237,89 ± 35,72 ^a	
	8	8,03 ± 0,54	4,87	251,07 ± 28,12 ^a	
	24	7,74 ± 0,63	4,13	240,01 ± 36,56 ^a	
<i>Streptococcus thermophilus</i> FP341pc	0	5,05 ± 0,19	6,53	38,76 ± 6,62 ^b	112,97 ± 28,76 ^{bcd}
	6	8,60 ± 0,39	5,37	36,12 ± 1,23 ^b	
	8	8,92 ± 0,27	4,89	124,41 ± 32,48 ^a	
	24	9,11 ± 0,40	4,15	151,73 ± 35,38 ^a	
<i>Streptococcus thermophilus</i> FP361v	0	5,64 ± 0,07	6,53	49,26 ± 6,39 ^b	42,93 ± 7,13 ^d
	6	8,25 ± 0,66	5,67	43,68 ± 6,34 ^b	
	8	8,08 ± 1,20	5,03	59,40 ± 4,77 ^b	
	24	8,82 ± 0,19	4,21	92,19 ± 13,52 ^a	

<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> FP343pc	0	5,61 ± 0,08	6,54	56,28 ± 3,11 ^c	
	6	8,97 ± 0,27	5,09	74,74 ± 8,84 ^b	
	8	8,74 ± 0,36	4,52	64,12 ± 6,22 ^{bc}	
	24	7,77 ± 0,78	4,21	114,62 ± 4,29 ^a	58,34 ± 1,18 ^{cd}
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> FP368	0	5,58 ± 0,12	6,53	51,44 ± 7,33 ^b	
	6	8,22 ± 0,33	5,20	130,15 ± 8,63 ^b	
	8	8,78 ± 0,52	4,74	253,43 ± 31,74 ^a	
	24	8,27 ± 0,67	4,07	313,34 ± 81,36 ^a	261,91 ± 74,03 ^a
<i>Lactobacillus reuteri</i> FP352	0	5,68 ± 0,30	6,53	40,38 ± 5,84 ^a	
	6	7,23 ± 0,35	5,97	51,00 ± 8,66 ^a	
	8	7,60 ± 0,16	5,35	33,55 ± 13,73 ^a	
	24	8,58 ± 0,15	3,48	29,60 ± 15,30 ^a	NA

* Média ± desvio padrão (n=3 – número de repetições do experimento)

** Média ± desvio padrão (n=9 – número de repetições do experimento). Letras diferentes para uma mesma coluna indicam que há diferença significativa na produção de folato (µg/L) ao longo do tempo para um mesmo isolado (Teste Tukey, p<0,05).

*** Valor correspondente à diferença entre a concentração de folato total no tempo 24 h e no tempo 0 h. Valores representados por letras diferentes indicam que há diferença significativa na concentração de folato total para os diferentes isolados analisados (Teste Tukey, p<0,05).

NA= Não se aplica (não houve produção de folato)

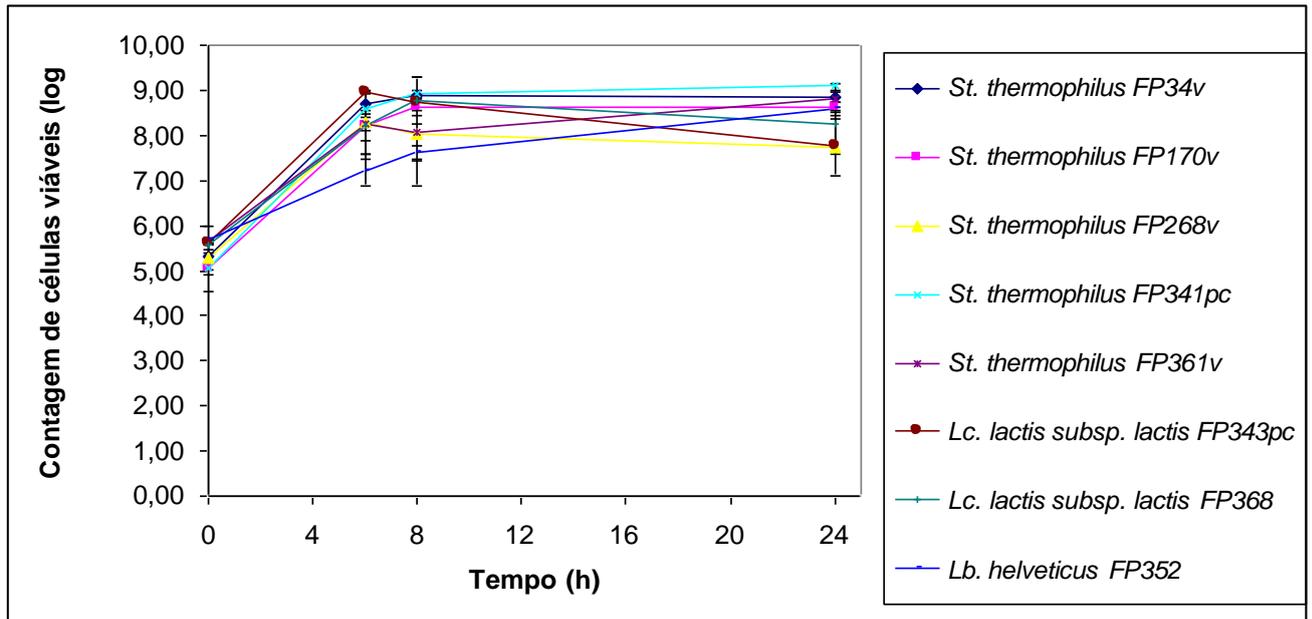


Figura 1: Contagem de células viáveis em leite de cabra UHT inoculado com as bactérias lácticas potencialmente produtoras de folato, a 37°C.

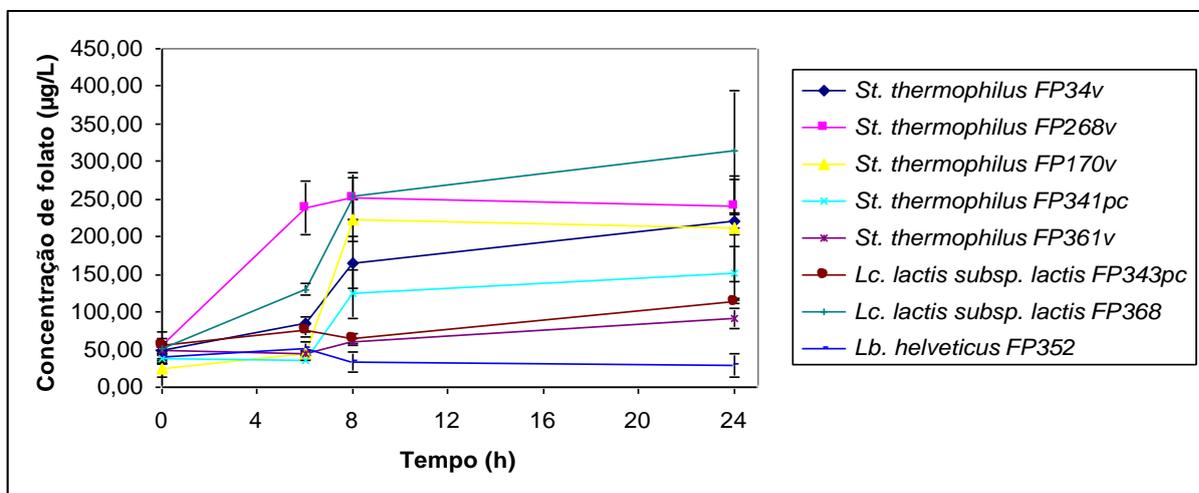


Figura 2: Concentração de folato em leite de cabra UHT contendo as bactérias lácticas potencialmente produtoras de folato, a 37°C.

As Figuras 1 e 2 mostram que os oito isolados testados multiplicaram-se de maneira semelhante no leite de cabra UHT a 37°C, mas a produção de folato variou de acordo com o isolado. O isolado que produziu mais folato foi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FP368, com 261,91 µg/L, enquanto o isolado *Lb. helveticus* FP352 não foi capaz de produzir folato no leite de cabra UHT. A média da concentração de folato total produzida foi de 120,55 µg/L. Observou-se que os isolados *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FP368, *Streptococcus*

thermophilus FP34v, *Streptococcus thermophilus* FP170v e *Streptococcus thermophilus* FP268v foram bons produtores de folato, mas as quantidades produzidas variaram de acordo com o isolado. O mesmo comportamento foi observado para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, no qual o isolado FP368 apresentou uma produção de folato total significativamente maior (261,91 µg/L) que o isolado FP343pc, que apresentou uma produção de 58,34 µg/L.

A determinação do tempo necessário para a produção da maior quantidade de folato é de extrema importância, uma vez que essas as cepas produtoras podem ser utilizadas em processos industriais. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Streptococcus thermophilus* são espécies de bactérias lácticas comumente usadas como culturas *starter* na elaboração de uma grande variedade de produtos lácteos fermentados como iogurtes, queijos e leites fermentados. Em muitos produtos, o alto conteúdo de folato deve-se a presença de bactérias lácticas produtoras dessa vitamina (LeBlanc *et al.*, 2010a).

A Figura 3 apresenta a quantidade de folato total no leite de cabra após 0, 6, 8 e 24h a 37°C, produzido por todos os isolados testados. É possível observar que houve uma interessante variação na quantidade de folato produzido em cada tempo analisado, de uma forma cepa-dependente. Após 6h, *St. thermophilus* FP268v aumentou de forma significativa (320%) o teor de folato no leite, que foi o mesmo detectado após 24 h. Por outro lado, *St. thermophilus* FP34v causou um incremento gradual na concentração de folato, o mesmo ocorrendo com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FP368, embora de forma mais acentuada. Esses resultados são melhores que os reportados por Laiño *et al.* (2015) para a cepa *Streptococcus thermophilus* CRL803, que aumentou o teor de folato em leite apenas 32% após 6h.

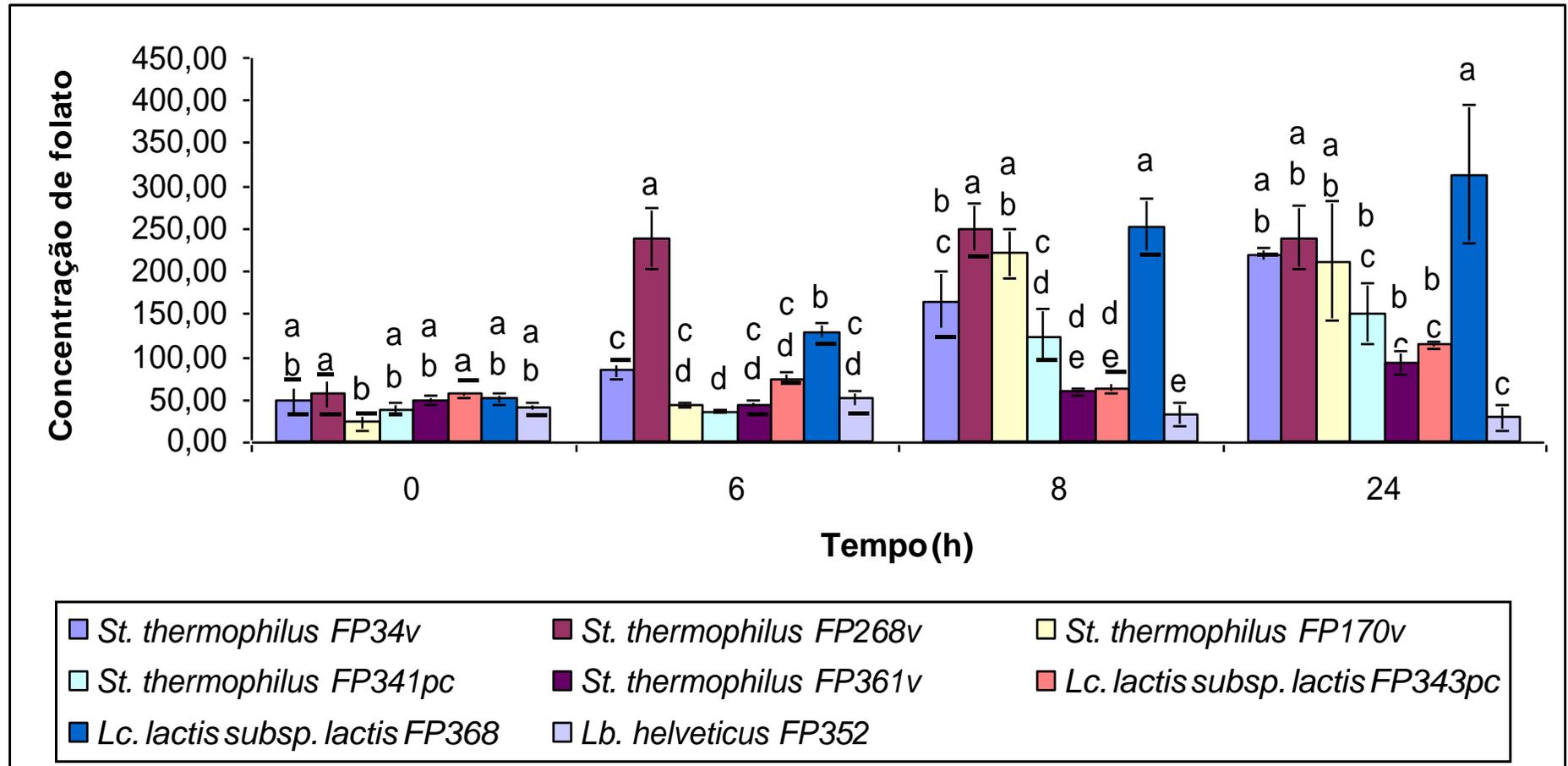


Figura 3: Folato total no leite de cabra UHT contendo bactérias lácticas potencialmente produtoras de folato, após 0, 6, 8 e 24h a 37°C.

Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os diferentes isolados para o mesmo intervalo de tempo

Em relação ao pH do leite de cabra contendo as bactérias lácticas potencialmente produtoras de folato, observou-se que *Lb. helveticus* FP352 causou maior redução após 24 h do que os demais isolados, atingindo o valor de 3,48 (Figura 4). No entanto, o isolado que causou a acidificação mais rápida do leite foi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FP343pc. O pH do leite tem um papel importante na estabilidade dos folatos, que são mais estáveis entre pH 2 -10. (Forssén *et al.*, 2000).

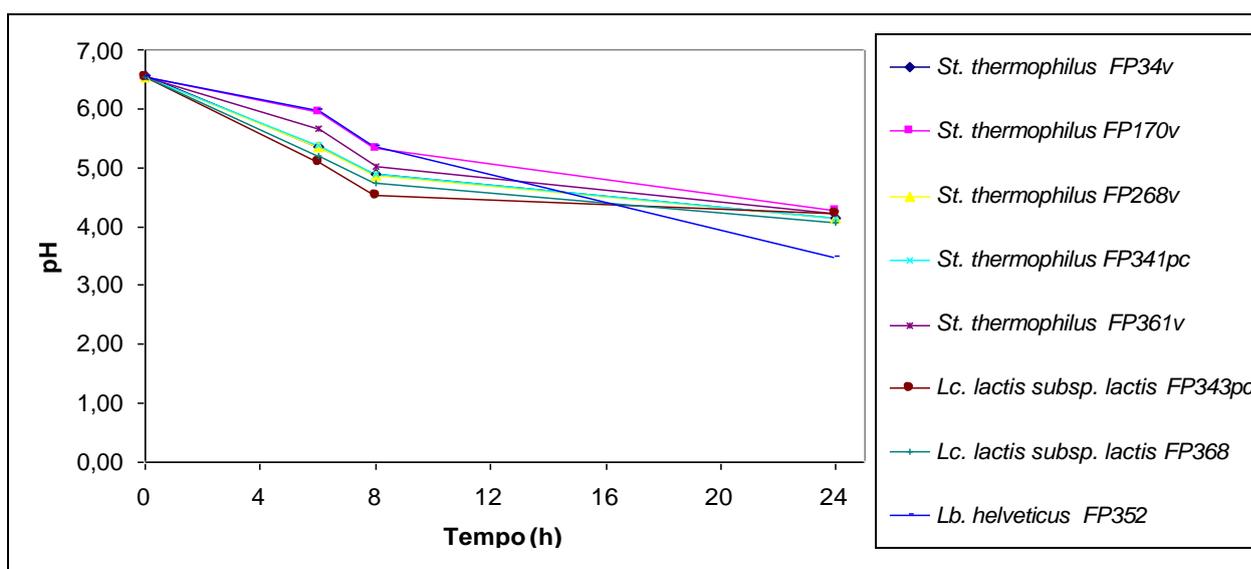


Figura 4: Valores de pH do leite de cabra contendo bactérias lácticas potencialmente produtoras de folato, a 37°C.

A quantidade de folato total produzido em meio de cultura FACM e leite de cabra para cada um dos isolados testados está apresentado na Tabela 7. Observou-se que para 5 dos 8 isolados testados, a quantidade de folato total produzido foi maior em meio FACM do que em leite de cabra, indicando que a síntese é favorecida pela ausência da vitamina no ambiente de cultivo. Além disso, o folato originalmente presente no leite de cabra não inibiu a produção dessa vitamina pelas bactérias adicionadas, exceto para o isolado FP352. Esse resultado indica que a síntese de folato por esses isolados não é regulada pela presença de folato no meio.

Tabela 7. Concentração de folato total produzido pelos isolados em meio FACM e leite de cabra após 24h a 37°C

Identificação do isolado	Meio FACM (µg/L)	Leite de cabra (µg/L)
<i>St. thermophilus</i> FP34v	114,40	171,80
<i>St. thermophilus</i> FP170v	311,40	187,91
<i>St. thermophilus</i> FP268v	228,20	183,42
<i>St. thermophilus</i> FP341pc	108,50	112,97
<i>St. thermophilus</i> FP361v	293,90	42,93
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> FP343pc	252,90	58,34
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> FP368	243,20	261,91
<i>Lb. helveticus</i> FP352	22,80	NA

NA= Não se aplica (não houve produção de folato)

No geral, a eficiência de produção de folato total pelos isolados estudados neste trabalho foi melhor que a reportada por Laino *et al.* 2012. A maior produção de folato total em leite obtida por estes autores foi 72,50 µg/L, enquanto que neste trabalho obteve-se produção quase quatro vezes mais alta (261,91 µg/L), produzido por *Lc lactis* subsp. *lactis* FP368.

Considerando-se a recomendação de ingestão diária de 400 µg de folato (LeBlanc *et al.*, 2007), uma porção normal de 200 mL de leite contendo o isolado *Lc lactis* subsp. *lactis* FP368 supriria cerca de 15% da quantidade diária recomendada. Dessa forma derivados lácteos caprinos, como leites fermentados, contendo folatos produzidos pelas cepas isoladas nesse estudo seriam uma boa alternativa para a suplementação da dieta (LeBlanc *et al.*, 2007)

4.5 Avaliação da produção de riboflavina em leite de cabra

Os resultados da determinação do pH, enumeração de células viáveis (UFC/mL) e da concentração de riboflavina produzida no leite de cabra pelos quatro isolados testados, nos tempos 0, 6, 8 e 24 h, a 37°C, estão apresentados na Tabela 8.

A concentração de riboflavina no leite permaneceu a mesma ao longo de 24 h, indicando que nenhum dos 4 isolados testados foi capaz de aumentar a concentração de riboflavina no produto. Por outro lado, também não houve consumo dessa vitamina ao longo do tempo.

Diferentemente do que foi observado nesse estudo, Juarez del Valle *et al.* (2014) verificaram que bactérias lácticas foram capazes de produzir riboflavina em leite de soja.

Esse fato foi possível pois a soja é uma matriz alimentar com baixas quantidades de vitamina B2.

Outros autores, como Kneifel *et al.* (1992), reportaram que bactérias lácticas foram capazes de sintetizar riboflavina em iogurte e *buttermilk*, aumentando em 60% a concentração dessa vitamina nesses produtos, quando comparado com o leite não fermentado.

A produção de riboflavina por bactérias lácticas em derivados lácteos também foi demonstrada por Jayashree *et al.* (2010). LeBlanc *et al.* (2006) produziram um leite fermentado com teores mais altos de vitamina B2 utilizando a cepa *Propionibacterium freudenreichii* B2336, que é produtora dessa vitamina.

Tabela 8. Contagem de células viáveis, pH e concentração de riboflavina em leite de cabra UHT após 0, 6, 8, 24 h a 37°C

Identificação do isolado	Tempo (h)	Contagem (log UFC/mL)*	pH	Concentração de riboflavina (µg/mL)**	Riboflavina total em 24h (µg/mL)***
<i>Streptococcus thermophilus</i> FP34v	0	5,92 ± 1,13	6,59	24,59 ± 7,70 ^a	
	6	8,28 ± 0,55	6,01	22,51 ± 8,35 ^a	
	8	8,33 ± 0,58	5,25	22,88 ± 7,73 ^a	
	24	8,92 ± 0,20	4,42	17,68 ± 2,44 ^a	NA
<i>Streptococcus thermophilus</i> FP341pc	0	4,89 ± 0,19	6,56	27,61 ± 8,84 ^a	
	6	8,37 ± 0,41	5,91	23,31 ± 8,74 ^a	
	8	8,63 ± 0,37	5,25	20,73 ± 0,69 ^a	
	24	8,82 ± 0,20	4,34	20,04 ± 6,02 ^a	NA
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> FP368	0	5,97 ± 0,28	6,54	30,44 ± 7,78 ^a	
	6	7,99 ± 0,73	5,76	24,43 ± 1,77 ^a	
	8	8,69 ± 0,38	5,02	22,21 ± 6,31 ^a	
	24	8,62 ± 0,58	3,86	20,79 ± 2,96 ^a	NA
<i>Lactobacillus helveticus</i> FP352	0	5,78 ± 0,25	6,53	25,70 ± 9,77 ^a	
	6	7,08 ± 0,54	6,28	24,77 ± 10,94 ^a	
	8	7,47 ± 0,14	5,78	19,25 ± 1,93 ^a	
	24	8,85 ± 0,47	3,64	17,37 ± 8,31 ^a	NA

* Média ± desvio padrão (n=3 – número de repetições do experimento)

** Média ± desvio padrão (n=9 – número de repetições do experimento) representados por letras diferentes para uma mesma coluna indicam que há diferença significativa na concentração de riboflavina total (µg/mL) ao longo do tempo para um mesmo isolado (Teste Tukey post hoc, p<0,05).

NA = Não se aplica (não houve produção de riboflavina)

5 CONCLUSÕES

As cepas produtoras de folato obtidas neste estudo são de grande interesse para indústria na produção de derivados lácteos enriquecidos com vitaminas, pois foram excelentes produtoras dessa vitamina, tanto em meio de cultura quanto no leite de cabra UHT mantido a 37°C. O mesmo não ocorreu com as cepas produtora de riboflavina, que não foram capazes de produzir esta vitamina em leite de cabra nas condições testadas

As principais conclusões deste trabalho são:

- Leite cru e queijo de cabra foram boas fontes de bactérias lácticas com capacidade de produzir folatos e riboflavina, demonstrada nos testes em meios de cultura apropriados. Houve uma diferença significativa ($p < 0,1$) entre a média da concentração de folato (EC, IC e total) produzido pelos isolados de leite e o produzido pelos isolados de queijo de cabra, mas a diferença entre as médias das concentrações de riboflavina (EC, IC e total) produzida por estes isolados não foi significativa ($p < 0,05$).
- Foram identificados isolados com capacidade de sintetizar folato e riboflavina simultaneamente e a produção de ambas vitaminas (EC, IC e total), em meio de cultura e em leite UHT, variou de acordo com isolado.
- Após 24h, a produção de folato pelas bactérias lácticas isoladas em meio de cultura a 37°C variou entre 0,7 µg/L até 498,3 µg/L, enquanto em leite de cabra UHT variou entre 0,0 µg/L e 261,91 µg/L, já descontada a quantidade de folato previamente presente no leite. A produção de riboflavina em meio de cultura variou de 129,3 µg/L a 531,5 µg/L, mas não houve produção desta vitamina no leite UHT.
- Cerca de metade dos isolados produtores de folato e de riboflavina acima da média (43 em 77 e 7 em 15, respectivamente) pertenceram ao gênero *Enterococcus*, limitando seu potencial de aplicação em alimentos, devido a possibilidade de apresentar patogenicidade.
- Para alguns isolados, a concentração de folato produzido em leite de cabra UHT a 37°C foi muito acima da média, ficando acima também da média descrita para outros isolados em outros estudos, evidenciando seu interessante potencial de aplicação na produção de novos derivados lácteos caprinos, com teores mais altos de folato, especialmente porque os isolados que produziram maior quantidade de folato em leite pertenceram às espécies *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, amplamente utilizadas na indústria de laticínios.

- Mais estudos são necessários para elucidar as razões da falha de produção de riboflavina em leite pelos isolados que produziram riboflavina em meio de cultura. A otimização das condições de produção certamente levará a melhores resultados dos que obtidos no presente estudo em relação à esta vitamina.

6 REFERÊNCIAS

BURGESS, C.; O'CONNELL-MOTHERWAY, M.; SYBESMA, W.; HUGENHOLTZ, J.; VAN SINDEREN, D. Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for *in situ* production of vitamin-enriched foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5769 – 5777, 2004.

BURGESS, C. M.; SMID, E. J.; RUTTEN, G.; VAN SINDEREN, D. A general method for selection of riboflavin-overproducing food grade-microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 1 – 12, 2006.

CRITTENDEN, R. G.; MARTINEZ, N. R.; PLAYNE, M. J. Synthesis and utilization of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 217 – 222, 2003.

DONOHUE, D. C. & GUEIMONDE, M. Some considerations for the safety of novel probiotic bacteria. In: **Lactic Acid Bacteria – Microbiological and Functional Aspects** (Salminen, S., Lahtinen, S., Ouwehand, C. A., Von Wright, A., 4th ed). CRC Press, p. 423 – 438, 2012.

ENNyS (Encuesta Nacional de Nutrición y Salud). Dirección Nacional de Salud Materno Infantil, Ministerio de Salud, Argentina, 2007.

FABIAN, E.; MAJCHRZAK, D.; DIEMINGER, B.; MEYER, E.; ELMADFA, I. Influence of probiotic and conventional yoghurt on the status of vitamins B1, B2 and B6 in young healthy women. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 52, p. 29 – 36, 2008.

FDA. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. **Fed Regist** 61:8781-8797, 1996.

FORSSÉN, K. M.; JÄGERSTAD, M. I.; WIGERTZ, K.; WITTHÖFT, C. M. Foliates and dairy products: a critical update. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, p. 100S – 110S, 2000.

GANGADHARAN, D.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; PANDEY, A.; MADHAVAN, N. K.; Folate producing lactic acid bacteria from cow's milk with probiotic characteristics. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 339 – 348, 2010.

GOLBACH, J. L.; CHALOVA, V. I.; WOODWARD, C. L.; RICKE, S. C. Adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* riboflavin assay to microtiter plates. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 568 – 574, 2007.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 155 – 163, 2004.

HOLASOVÁ, M.; FIEDLEROVÁ, V.; ROUBAL, P.; PECHACOVÁ, M. Biosynthesis of folates by lactic acid bacteria and propionibacteria in fermented milk. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 22, p. 175 – 181, 2004.

HORNE, D. W. & PATTERSON, D. *Lactobacillus casei* microbiological assay of folic acid derivatives in 96 well microtiter plates. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 2357 – 2359, 1988.

HUGENHOLTZ, J. & SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 497 – 507, 2002.

IYER, R.; TOMAR, S. K.; SINGH, R.; SHARMA, R. Estimation of folate in milk by microbiological assay using tri-enzyme extraction method. **Milchwissenschaft**, v. 64, p. 125 – 127, 2009.

JAYASHREE, S.; JAYARAMAN, K.; KALAICHELVAN, G. Isolation, screening and characterization of riboflavin producing lactic acid bacteria from Katpadi, Vellore district. **Recent Research in Science and Technology**, v. 2, p. 83 – 88, 2010.

JUAREZ DEL VALLE, M.; LAIÑO, J. E.; DE GIORI, G. S.; LEBLANC, J.G. Riboflavin producing lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to obtain bio-enriched soymilk. **Food Research International**, v. 62, p. 1015 – 1019, 2014.

KARILUOTO, S.; AITTAMAA, M.; KORHOLA, M.; SALOVAARA, H.; VAHTERISTO, L.; PIIRONEN, V. Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 137 – 143, 2006.

KE, D.; PICARD, F. J.; MARTINEAUS, F.; MENARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of PCR assay for rapid detection of Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3497 – 3503, 1999.

KNEIFEL, W.; KAUFMANN, M.; FLEISCHER, A.; ULBERTH, F. Screening of commercially available mesophilic dairy starter cultures: biochemical sensory, and microbiological properties. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3158 – 3166, 1992.

LAIÑO, J. E.; DE GIORI, G. S.; LEBLANC, J. G. Folate production by lactic acid bacteria. In: **Bioactive Foods and Supplements in Health Promotion – Liver and Gastrointestinal Diseases** (Watson, R., eds). UK Elsevier, Oxford, 2011.

LAIÑO, J. E.; LEBLANC, J. G.; DE GIORI, G. S. Production of natural folates by lactic acid bacteria starter cultures isolated from artisanal Argentinean yogurts. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, p. 581 – 588, 2012.

LAIÑO, J.E. **Bacterias lácticas con capacidad de producir folatos como estrategia para el diseño de alimentos bio-enriquecidos**. 2015. 210p. Tese (Doutorado) – Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel del Tucumán, Argentina, 2015.

LEBLANC, J. G.; RUTTEN, G.; BRUINENBERG, P.; SESMA, F.; DE GIORI, G. S.; SMID, E. J. A novel dairy product fermented with *Propionibacterium freudenreichii* improves the riboflavin status of deficient rats. **Nutrition**, v. 22, p. 645 – 651, 2006.

LEBLANC, J. G.; DE GIORI, G. S.; SMID, E. J.; HUGENHOLTZ, J.; SESMA, F. Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. In: **Communicating**

Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology (Mendéz- Vilas, A., eds). Formatex Research Center, Badajoz, Spain, p. 329 – 339, 2007.

LEBLANC, J. G.; TARANTO, M. P.; MOLINA, V.; SESMA, F. B-group vitamins production by probiotic lactic acid bacteria. **In: Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications** (Mozzi, F., Raya, R. & Vignolo, G., eds). Wiley – Blackwell, Ames, p. 211 – 232, 2010a.

LEBLANC, J. G.; SYBESMA, W.; STARRENBURG, M.; SESMA, F.; DE VOS, W. M.; DE GIORI, G. S.; HUGENHOLTZ, J. Supplementation with engineered *Lactococcus lactis* improves the folate status in deficient rats. **Nutrition**, v. 26, p. 835 – 841, 2010b.

LEBLANC, J. G.; LAIÑO, J. E.; DEL VALLE, M. J.; VANNINI, V.; VAN SINDEREN, D.; TARANTO, M. P.; DE VALDEZ, G. F.; DE GIORI, G. S.; SESMA, F. B-group vitamin production by lactic acid bacteria-current knowledge and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1297 – 1309, 2011.

LIN, M. Y.; YOUNG, C. M. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 409 – 413, 2000.

LÓPEZ-ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M. J. M.; NESTARES, M. T.; BARRIONUEVO, M.; CAMPOS, M; S. Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1024 – 1030, 2005.

MEDINA, R.B.; OLISZEWSKI, R.; ABEIJÓN MUKDSI, M. C.; VAN NIEUWENHOVE, C. P.; GONZÁLEZ, S. N. Sheep and goat's dairy products from South America: microbiota and its metabolic activity. **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 84 – 91, 2011.

MORRIS, M. C. & TANGNEY, C. C. Is dietary intake of folate too low?. **Lancet**, v. 369, p. 166 – 167, 2007.

NASSER, C.; NOBRE, C.; MESQUITA, S.; RUIZ, J. G.; CARLOS, H. S.; PROUVOT, L.; YACUBIAN, E. M. T. Semana da conscientização sobre a importância do ácido fólico. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 11, p. 199 – 203, 2005.

O'BRIEN, M. M.; KIELY, M.; HARRINGTON, K. E.; ROBSON, P. J.; STRAIN, J. J.; FLYNN, A. The north/south Ireland food consumption survey: vitamin intakes in 18 – 64 - year – old adults. **Public Health Nutrition**, v. 4, p. 1069 – 1079, 2001.

OGIER, J-C. & SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 291 – 301, 2008)

PARK, Y.W. & HAENLEIN, G .F. W. Handbook of food products manufacturing. **In: Goat Milk, its Products and Nutrition** (Hui, Y.H., eds). John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, p. 449–488, 2007.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 88 – 113, 2007.

POMPEI, A.; CORDISCO, L.; AMARETTI, A.; ZANONI, S.; MATTEUZZI, D.; ROSSI, M. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 179 – 185, 2007.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LE PAPE, M.; GABORIT, P.; BARRUCAND, P. French goat milk cheeses: An overview on their nutritional and sensorial characteristics and their impacts on consumers' acceptance. **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 64 – 72, 2011.

RIBEIRO, A. C. & RIBEIRO, S. D. A. Specialty products made from goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 225 – 233, 2010.

SCHIRRU, S.; TODOROV, S. D.; FAVARO, L.; MANGIA, N. P.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; COMUNIAN, R.; FRANCO, B. D. G. M.; DEIANA, P. Sardinian goat's milk as a source of bacteriocinogenic potential protective cultures. **Food Control**, v. 25, p. 309 – 320, 2012.

SYBESMA, W.; STARRENBURG, M.; TIJSSELING, L.; HOEFNAGEL, M. H.; HUGENHOLTZ, J. Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4542 – 4548, 2003.

WEGKAMP, A.; VAN OORSCHOT, W.; DE VOS, W. M.; SMID, E. J. Characterization of the role of para-aminobenzoic acid biosynthesis in folate production by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2673 – 2681, 2007.

WHO. 2009. Recommendation on Wheat and Maize Flour Fortification Meeting Report: Interim Consensus Statement. Available from http://www.who.int/nutrition/publication/micronutrients/wheat_maize_fort.pdf.

WOUTERS, J. T. M.; AYAD, E. H. E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 91 – 109, 2002.