



ADRIELE DO AMOR DIVINO SILVA

***Kluyveromyces lactis* B10 E *Torulaspora delbrueckii* B14:
CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS, MECANISMOS
PROTEÔMICOS ASSOCIADOS, INFLUÊNCIA NO QUADRO DE
SALMONELOSE E APLICAÇÃO EM QUEIJO CANASTRA**

**LAVRAS-MG
2025**

ADRIELE DO AMOR DIVINO SILVA

***Kluyveromyces lactis* B10 E *Torulaspota delbrueckii* B14: CARACTERÍSTICAS
PROBIÓTICAS, MECANISMOS PROTEÔMICOS ASSOCIADOS, INFLUÊNCIA NO
QUADRO DE SALMONELOSE E APLICAÇÃO EM QUEIJO CANASTRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós -
Graduação em Microbiologia Agrícola, área de
Concentração em Microbiologia Agrícola para
obtenção do título de doutora.

Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte
Orientador

**LAVRAS-MG
2025**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFPA, com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Adriele do Amor Divino.

Kluyveromyces lactis B10 e *Torulaspora delbrueckii* B14 : Características
probióticas, mecanismos proteômicos associados, influência no quadro de salmonelose
e aplicação em queijo Canastra / Adriele Do Amor Divino Silva. - 2025.

114 p. : il.

Orientador: Whasley Ferreira Duarte

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. Leveduras probióticas. 2. Queijo artesanal. 3. Trato gastrointestinal (TGI). 4.
Infecções entéricas. 5. Proteínas. I. Ferreira Duarte, Whasley. II. Universidade Federal
de Lavras. III. Título.

ADRIELE DO AMOR DIVINO SILVA

***Kluyveromyces lactis* B10 and *Torulaspota delbrueckii* B14: PROBIOTIC CHARACTERISTICS, ASSOCIATED PROTEOMIC MECHANISMS, INFLUENCE ON SALMONELLOSIS AND APPLICATION IN CANASTRA CHEESE**

***Kluyveromyces lactis* B10 e *Torulaspota delbrueckii* B14: CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS, MECANISMOS PROTEÔMICOS ASSOCIADOS, INFLUÊNCIA NO QUADRO DE SALMONELOSE E APLICAÇÃO EM QUEIJO CANASTRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós - Graduação em Microbiologia Agrícola, área de Concentração em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de doutora.

Aprovada em 30 de Abril de 2025.

Profº Dr. Flaviano dos Santos Martins UFMG
Profª Dra. Márcia Luciana Cazetta UFRB
Dra. Rafaela Pereira Andrade UFLA
Profº Dr. Victor Satler Pylro UFLA

Documento assinado digitalmente



WHASLEY FERREIRA DUARTE

Data: 28/05/2025 10:05:27-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte
Orientador

**LAVRAS – MG
2025**

*À Jesus pelo cuidado e intercessão. Sem ele nada seria possível!
Aos meus pais, Cristina e Agnelo pelo amor incondicional e exemplo!
Ao meu noivo, Breno, pelo apoio e incentivo!*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Jesus Cristo, por estender sua mão nas diversas vezes que precisei de um amigo, de paz e de força para continuar essa jornada árdua, mas gratificante que é o doutorado.

Aos meu pais Cristina e Agnelo e à minha madrinha, Francis, pelas orações, por se fazerem presentes, por serem minha base e por acreditarem em mim.

Ao meu noivo, Breno, pelo amor, compreensão, apoio e incentivo. Obrigada por me ajudar a passar pela etapa mais desafiadora da minha vida.

Aos meus amigos de laboratório que conquistei ao longo desses anos e que levarei para toda a vida, em especial Rafaela, Tamara, Mayara, Ademir, José e Dérica.

Aos meus colegas da UFMG, em especial Lara, Bruno e Pâmela que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Flaviano e Victor, por disponibilizarem seus laboratórios para o desenvolvimento de boa parte deste trabalho e pelo carinho que me acolheram.

À prof.^a Kalynka por ceder seu laboratório para que eu pudesse realizar alguns experimentos do meu trabalho.

Ao Fabrício, técnico do laboratório de proteômica, pelo auxílio na realização desses experimentos e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos Ruan e Jonatha, pela amizade e conselhos ao longo de todos esses anos.

Ao meu orientador Whasley por ter aceitado me orientar sem ao menos me conhecer. Por ter me mostrado e relembado meu potencial diversas vezes. Por ter me apresentado desafios e ter confiado que eu seria capaz de resolve-los.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade e infra-estrutura que tornaram possível o desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pela concessão da bolsa sem a qual seria impossível me manter durante esses 4 anos.

E a todos os outros que, indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Muito obrigada!!!

*"Nada na vida deve ser temido,
somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais
para temer menos."*

Marie Curie

RESUMO

A utilização de microrganismos potencialmente probióticos vem despertando o interesse científico, uma vez que tem sido relatado a melhora das características físicas, químicas e sensoriais de produtos alimentícios, quando esses microrganismos são utilizados. Além disso, os microrganismos probióticos exercem benefícios à saúde do hospedeiro, como redução dos índices glicêmicos e da pressão arterial, apresentam efeitos antimicrobianos e melhoram as respostas imunológicas diante de distúrbios gastrointestinais agudos e crônicos. No entanto, apesar de possuírem elevado potencial biotecnológico, as pesquisas utilizando leveduras para esse fim ainda são limitadas. Dentro desse contexto, os objetivos deste trabalho foram: i) avaliar a influência do inóculo misto das leveduras *Kluyveromyces lactis* B10 e *Torulaspota delbrueckii* B14, nas características físico-químicas do queijo Canastra; ii) analisar o papel da levedura *K. lactis* B10, veiculada a um queijo, na infecção causada por *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium em camundongos e iii) avaliar a sobrevivência de *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 no trato gastrointestinal (TGI) simulado, quando liofilizadas em leite UHT. As proteínas expressas, pelas leveduras, durante a passagem pelo TGI também foram avaliadas. Os resultados gerais mostraram que o inóculo misto das leveduras melhorou as características antioxidantes (72,62%) dos queijos e foi capaz de reduzir o teor de lactose em até 92,08%. Além disso, os queijos produzidos com as leveduras apresentaram compostos aromáticos exclusivos como o 3-methylbutyl octanoato, phenethyl butyrato, phenethyl propionato, isobutyl butanoato e pentyl propionato que contribuem positivamente para as características sensoriais dos queijos. Os testes *in vivo* mostraram a capacidade do queijo probiótico de melhorar a sobrevivência e o peso corporal de camundongos infectados com *S. Typhimurium*. Além disso, foi observada a redução dos seguintes parâmetros: translocação bacteriana para fígado e baço, permeabilidade intestinal, níveis de IgA intestinal e atividades de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) do fígado e íleo em animais infectados com *S. Typhimurium* e tratados com o queijo probiótico. Os testes de segurança mostraram que as leveduras são seguras para aplicação na indústria de alimentos. A sobrevivência das leveduras liofilizadas foi de 83,38% e 75,51% para *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14, respectivamente na temperatura de 4 °C aos 120 dias. Quando submetidas a condições simuladas do TGI, *K. lactis* B10 apresentou uma viabilidade de 96,72% enquanto *T. delbrueckii* apresentou viabilidade de 97,75% após 270 minutos de exposição a ácidos e sais biliares. As proteínas expressas no momento da passagem pelo TGI foram proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos, aminoácidos, de produção de energia e de tolerância ao estresse oxidativo. Além disso, também foram observadas proteínas envolvidas com o mecanismo de adesão em *K. lactis* B10. Portanto, esses resultados demonstraram que ambas as leveduras apresentaram potencial para serem utilizadas como probióticos na indústria de alimentos e forneceram insights sobre moléculas produzidas por leveduras e associadas ao estresse ambiental.

Palavras-chave: leveduras probióticas; alimentos funcionais; queijo artesanal, trato gastrointestinal simulado, segurança, liofilização, proteínas.

ABSTRACT

The use of potentially probiotic microorganisms has been attracting scientific interest, since improvements in the physical, chemical and sensory characteristics of food products have been reported when these microorganisms are used. In addition, probiotic microorganisms provide health benefits to the host, such as reducing glycemic indexes and blood pressure, have antimicrobial effects and improve immune responses to acute and chronic gastrointestinal disorders. However, despite having high biotechnological potential, research using yeasts for this purpose is still limited. Within this context, the objectives of this study were: i) to evaluate the influence of the yeasts *Kluyveromyces lactis* B10 and *Torulopsis delbrueckii* B14 on the physical and chemical characteristics of Canastra cheese; ii) to analyze the role of the yeast *K. lactis* B10, transported to a cheese, in the infection caused by *Salmonella* Typhimurium in mice and iii) to evaluate the survival of *K. lactis* B10 and *T. delbrueckii* B14 in the gastrointestinal tract (GIT), when freeze-dried in UHT milk. The proteins expressed during passage through the GIT were also evaluated. The overall results showed that the yeasts improved the antioxidant characteristics (72.62%) of the cheeses and were able to reduce the lactose content by up to 92.08%. In addition, the cheeses produced with the yeasts presented unique aromatic compounds such as 3-methylbutyl octanoate, phenethyl butyrate, phenethyl propionate, isobutyl butanoate and pentyl propionate that positively contribute to the sensory characteristics of the cheeses. In vivo tests showed the ability of the probiotic cheese to improve the survival and body weight of mice infected with *S. Typhimurium*. Furthermore, a reduction in the following parameters was observed: translocation to the liver and spleen, intestinal permeability, intestinal IgA levels, and myeloperoxidase (MPO) and eosinophilic peroxidase (EPO) activities in the liver and ileum in animals infected with *S. Typhimurium* and treated with the probiotic cheese. Safety tests showed that the yeasts are safe for use in the food industry. The survival of the lyophilized yeasts was 83.38% and 75.51% for *K. lactis* B10 and *T. delbrueckii* B14, respectively, at 4°C after 120 days. When subjected to simulated GIT conditions, *K. lactis* B10 showed a viability of 96.72%, while *T. delbrueckii* showed a viability of 97.75% after 270 minutes of exposure to bile acids and salts. The proteins expressed during passage through the GI tract were proteins involved in carbohydrate and amino acid metabolism, energy production and tolerance to oxidative stress. In addition, proteins involved in the adhesion mechanism were also observed in *K. lactis* B10. Therefore, these results demonstrate that both yeasts have potential to be used as probiotics in the food industry and provide insights into molecules produced by yeasts and associated with environmental stress.

Keywords: probiotic yeasts; functional foods; artisanal cheese, simulated gastrointestinal tract, safety, freeze-drying, proteins.

INDICADORES DE IMPACTO

Esse estudo teve como objetivo investigar a influência das leveduras nas características do queijo Canastra, buscando otimizar seus aspectos físico-químicos, o que pode gerar impactos sociais, tecnológicos e econômicos significativos, especialmente para os produtores artesanais que obtêm sua renda da comercialização desse tipo de queijo. Esse trabalho elucidou o impacto que o queijo contendo a levedura *K. lactis* B10 apresenta diante do quadro de infecção por enteropatógenos, como *Salmonella*, em camundongos, reproduzindo os efeitos causados em humanos. Além disso, diversas proteínas envolvidas no mecanismo de sobrevivência das leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 durante a passagem pelo TGI simulado foram elucidadas. Ao aprofundar a compreensão sobre o impacto das leveduras nos queijos artesanais, espera-se agregar características funcionais como a ampliação do potencial antioxidante, redução do teor de lactose, e melhoria de aspectos sensoriais e de textura, além de servir como veículo para a entrega de microrganismos probióticos. Doenças gastrointestinais causadas por microrganismos patogênicos ou causadas por fatores genéticos, um problema que acomete extensivamente a população, podem ser prevenidas a partir de pesquisas que elucidem os mecanismos, eficácia e segurança das leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 como agentes terapêuticos nesse processo, trazendo um impacto social para toda a população. O desenvolvimento futuro de pesquisas e produtos poderão se embasar em respostas fornecidas por este trabalho, afetando positivamente o mercado de leveduras probióticas comercializadas, que ainda é bastante restrito.

IMPACT INDICATORS

The study aimed to investigate the influence of yeasts on the characteristics of Canastra cheese, seeking to optimize its physical-chemical aspects, which can generate significant social, technological and economic impacts, especially for artisanal producers who obtain their income from the commercialization of this type of cheese. This work elucidated the impact that cheese containing the yeast *K. lactis* B10 has on infections caused by enteropathogens such as *Salmonella* in mice, reproducing the effects on humans. Furthermore, several proteins involved in the survival mechanism of the yeasts *K. lactis* B10 and *T. delbrueckii* B14 during passage through the simulated GIT were elucidated. By deepening the understanding of the impact of yeasts on artisanal cheeses, it is expected to add functional characteristics such as increased antioxidant potential, reduced lactose content, and improved sensory and texture aspects, in addition to serving as a vehicle for the delivery of probiotic microorganisms. Gastrointestinal diseases caused by pathogenic microorganisms or caused by genetic factors, a problem that extensively affects the population, can be prevented through research that elucidates the mechanisms, efficacy and safety of the yeasts *K. lactis* B10 and *T. delbrueckii* B14 as therapeutic agents in this process, bringing social impact to the entire population. Future research and product development may be based on answers provided by this work, positively affecting the market for commercialized probiotic yeasts, which is still quite limited.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Leveduras probióticas	13
2.2 Uso de culturas starters probióticas em queijos artesanais	15
2.3 Papel das leveduras diante da infecção causada por <i>Salmonella</i>	17
2.4 Resistencia dos probióticos às condições do trato gastrointestinal (TGI)	20
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
4. Referências	24
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	27
Artigo 1	28
Physicochemical Profile of Canastra Cheese Inoculated with Starter Cultures of <i>Kluyveromyces lactis</i> and <i>Torulaspora delbrueckii</i>	28
Artigo 2	48
Efeito protetivo de um queijo fermentado com <i>Kluyveromyces lactis</i> B10 em camundongos infectados por <i>Salmonella</i> subsp. <i>entérica</i> sorovar Typhimurium	48
Artigo 3	77
Caracterização tecnológica, avaliação de segurança e resposta proteômica de <i>Kluyveromyces lactis</i> B10 e <i>Torulaspora delbrueckii</i> B14 a condições gastrointestinais simuladas	77

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a procura por alimentos funcionais que proporcionam benefícios à saúde é crescente. Esses alimentos, além de fornecerem a nutrição básica, desempenham um papel importante na prevenção e tratamento de doenças crônicas, principalmente aquelas associadas a distúrbios do trato gastrointestinal (TGI). Os benefícios conferidos pelos microrganismos probióticos estão associados à redução da pressão arterial, redução do colesterol e dos índices glicêmicos, efeitos antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e imunomodulador àqueles que os consomem (Mani-Lopez, 2023).

Os microrganismos probióticos podem estabelecer uma colonização temporária no TGI por tempo suficiente para restaurar a diversidade microbiana benéfica. Ao fazer isso, eles ajudam a restabelecer as funções fisiológicas do hospedeiro (Jan *et al.*, 2023). A liberação de antimicrobianos, ácidos orgânicos, bacteriocinas, indução da secreção de IgA, liberação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e liberação de proteínas e enzimas, são alguns dos mecanismos utilizados pelos microrganismos para desempenhar tais funções (Jan *et al.*, 2023).

As principais matrizes utilizadas como veículo para a entrega de probióticos são matrizes lácteas como iogurtes, queijos e leites fermentados. A estratégia de utilização desses alimentos reside no amplo consumo, assim como no perfil nutricional adequado, para o crescimento de diversos microrganismos. Os produtos lácteos possuem em comum elevado teor de gorduras e poder tamponante, características que implicam na proteção e manutenção da viabilidade do microrganismo durante a passagem pelo TGI (Ge *et al.*, 2024).

Espécies variadas de bactérias como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e algumas espécies dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* são as mais empregadas em pesquisas (Helmy *et al.*, 2019; Muneeb *et al.*, 2024). Por outro lado, a utilização de leveduras tem sido limitada a *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar disso, alguns estudos mais recentes demonstram o elevado potencial de outras espécies como *Torulaspora delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* e *Kluyveromyces* sp. (Helmy *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021).

As leveduras, de modo geral, apresentam propriedades atrativas como tolerância ao baixo pH, resistência aos sais biliares, a antibacterianos e a baixa atividade de água. Além disso, apresentam características como a produção de substâncias antimicrobianas, co-agregação, imunomodulação, entre outros mecanismos que atenuam a proliferação de patógenos no lúmen intestinal (Andrade *et al.*, 2019; Jan *et al.*, 2023). Além desses fatores, um microrganismo probiótico deve apresentar ausência de patogenicidade, estabilidade e viabilidade para que possam sobreviver durante a passagem pelo TGI e exercer efeitos benéficos.

A liofilização tem sido um método eficaz de preservação e manutenção da sobrevivência celular durante o armazenamento por longos períodos. Devido às condições adversas durante o processo, são utilizados crioprotetores, como carboidratos e substâncias proteicas, entre elas o leite, garantindo a sobrevivência dos microrganismos durante o processo (Bolla *et al.*, 2011).

Os mecanismos pelos quais a *K. lactis* B10 e a *T. delbrueckii* B14 toleram o estresse no TGI e proporcionam efeitos comprovadamente probióticos ainda não foram totalmente compreendidos e elucidados (Andrade *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2025). Diante disso, esse trabalho teve como objetivos a avaliação da influência de *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 nos parâmetros físico-químicos do queijo Canastra e a avaliação do queijo probiótico contendo *K. lactis* B10 em camundongos infectados com *Salmonella* Typhimurium. Além disso, os aspectos de segurança e tolerância das leveduras liofilizadas ao TGI também foram avaliados, bem como a caracterização de proteínas intracelulares expressas durante a passagem pelo TGI.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leveduras probióticas

De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization), os probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, trazem benefícios ao organismo do hospedeiro direta ou indiretamente. Para isso, esses microrganismos devem ser capazes de resistir às condições ácidas do TGI. Além disso, eles devem conseguir atingir o intestino sendo capazes de proliferar e colonizar esse ambiente (Saad *et al.*, 2013).

A seleção de microrganismos probióticos envolve, principalmente, características funcionais e tecnológicas. Entre as características funcionais desejadas estão a capacidade de sobreviver à entrega ao hospedeiro estabelecendo uma relação simbiótica no TGI, apresentar

interação com sistema hospedeiro, produzir compostos antipatogênicos e apresentar segurança comprovada (Shruthi *et al.*, 2022).

A maioria dos microrganismos probióticos disponíveis são administrados oralmente, o que implica na necessidade de uma cepa probiótica resistir às condições gastrointestinais (enzimas digestivas, sais biliares, pH e temperatura do hospedeiro). Além disso, o microrganismo deve ser capaz ainda de colonizar superfícies mucosas e resistir a compostos produzidos pela microbiota intestinal (Nandi *et al.*, 2025). Para isso, alguns testes de avaliação da capacidade de auto agregação, co-agregação, hidrofobicidade de superfície e resistência a antifúngicos devem ser realizados (Andrade *et al.*, 2019). Outro fator importante ao considerar a escolha do probiótico é a sua identificação como espécie, tipagem e testes de segurança, comprovando a ausência de toxinas, atividade patogênica ou atividades metabólicas que causem degradação de componentes presentes no hospedeiro (Staniszewski *et al.*, 2021).

As características tecnológicas desejáveis incluem a produção de grande quantidade de biomassa e resistência a processos de fabricação e de processamento dos alimentos. Além disso, a sobrevivência ao longo do tempo de prateleira, em temperaturas usualmente requeridas, e a sobrevivência a procedimentos de preservação como a liofilização devem ser considerados (Cunningham *et al.*, 2021, Silva *et al.*, 2025).

O principal obstáculo relacionado à utilização de bactérias probióticas é a possibilidade de transferência horizontal de genes de resistência para bactérias patogênicas. A transferência de genes entre leveduras e bactérias não é comum e, por isso, as leveduras podem ser uma alternativa vantajosa, principalmente em tratamentos combinados a antibióticos (Czerucka *et al.*, 2007).

Saccharomyces cerevisiae var. boulardii é uma levedura probiótica que atualmente é comercializada e que oferece tratamento a distúrbios gastrointestinais. Essa levedura é geneticamente próxima da *Saccharomyces cerevisiae* e tem a capacidade de crescer em temperatura de 37 °C (temperatura corporal dos mamíferos), além de sobreviver às condições adversas do TGI e oferecer efeito antibacteriano contra bactérias patogênicas. *S. boulardii* possui algumas diferenças em relação a *S. cerevisiae* que incluem a falta de capacidade de produzir ascósporos e de usar a galactose como fonte de carbono (Shruthi *et al.*, 2022).

Diversos trabalhos demonstram a eficácia dessa levedura na inibição do crescimento de espécies de bactérias patogênicas como *Lysteria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*

e *Staphylococcus aureus*. Além disso, a ligação das células dessa levedura a enteropatogenos como *Escherichia coli* e *S. Typhimurium* limitando infecções já são características bem estabelecidas (Rajkowska *et al.*, 2012).

Além da *S. boulardii*, outras leveduras isoladas de queijos, kefir, resíduos industriais, frutas, entre outros ambientes, vêm sendo estudadas quanto às suas características probióticas. Espécies como *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Cryptococcus laurentii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii* e *Rhodotorula mucilaginosa* apresentam potencial de produção de moléculas bioativas que interferem no crescimento de patógenos, no desenvolvimento de células carcinogênicas, no aumento do colesterol e pressão arterial, em processos de respostas imunológicas e em radicais livres presentes nas células. Além disso, essas leveduras podem ser aplicadas na indústria de alimentos devido à produção de corantes, enzimas proteolíticas e lipolíticas e geração de compostos relacionados ao desenvolvimento de aroma e sabor de alimentos fermentados (Staniszewski *et al.*, 2021).

2.2 Uso de culturas starters probióticas em queijos artesanais

Os alimentos que possuem probióticos são caracterizados como alimentos funcionais. E quando consideramos a utilização de probióticos nos alimentos funcionais, é preciso levar em consideração alguns aspectos como a dose adequada e a viabilidade dos mesmos. Já foi relatado que os probióticos exibem efeitos fisiológicos positivos apenas quando são ingeridos em concentrações superiores a 10^7 UFC (Unidades formadoras de colônias), entretanto alguns outros trabalhos demonstram que a concentração de 10^6 já é capaz de exercer o mesmo efeito (Abadía-Garcia *et al.*, 2013).

A maioria dos microrganismos utilizados em queijos são bactérias lácticas que apresentam importância bem reconhecida (Anihouvi & Kesenkas, 2022). No entanto, as leveduras também são importantes e alguns trabalhos mais recentes vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar as características nutricionais e físico-químicas de diversos alimentos incluindo queijos, por meio da adição de leveduras probióticas (Borelli *et al.*, 2006). Li *et al.* (2022), por exemplo, avaliaram os efeitos das leveduras *Pichia kudriavzevii* 1–21, *Kluyveromyces marxianus* B13-5, *Saccharomyces cerevisiae* DL6-20 e *K. lactis* DY1-10, nas características físico-químicas do queijo. Merchán *et al.* (2020), isolaram 154 estirpes de leveduras de queijo de ovelha cru e avaliaram a capacidade de atividade antioxidante, antimicrobiana, auto-agregação e de hidrofobicidade para serem futuramente utilizados como culturas iniciadoras na produção de queijos. Li *et al.* (2021) avaliaram a inserção de uma levedura produtora de ácido gama aminobutírico (GABA),

composto envolvido na redução da pressão arterial, na qualidade do queijo obtendo bons resultados.

O consórcio de leveduras como *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica* como iniciadoras na produção de queijos foi anteriormente proposto. *D. hansenii* foi descrita como uma das espécies mais predominantes em processos de isolamentos de queijos e isso ocorre porque essa levedura apresenta potencial de sobreviver em baixas temperaturas, baixa atividade de água e alta concentração de sal. Além disso, essa levedura também é capaz de inibir a proliferação de microrganismos indesejados como *Clostridium butyricum*. *Y. lipolytica* por outro lado, apresentou elevado potencial lipolítico e proteolítico (Ferreira *et al.*, 2003).

As leveduras são encontradas naturalmente em produtos lácteos como queijos, uma vez que apresentam capacidade de tolerância ao baixo pH, baixo teor de umidade, elevadas concentrações de sal e armazenamento refrigerado (Helmy *et al.*, 2019). As leveduras podem ser encontradas causando deterioração ou promovendo mudanças físico-químicas que impactam positivamente no aroma e sabor dos mais diversos queijos. Estão envolvidas em processos de maturação onde participam de interações microbianas contribuindo para melhorar a textura, além de produzir diversos compostos orgânicos voláteis e carbonílicos (Silva *et al.*, 2025).

Algumas leveduras apresentam propriedades lipolíticas e proteolíticas, além de participar da formação de precursores de aroma como aminoácidos, ácidos graxos e ésteres. Além disso as leveduras são capazes de produzir compostos antimicrobianos e inibir o crescimento de microrganismos indesejados. A principal contribuição das leveduras está atrelada à utilização do ácido láctico favorecendo o aumento do pH, o que promove o aparecimento de bactérias intolerantes à acidez elevada e, conseqüentemente, permitindo o segundo estágio de maturação do queijo (Ferreira *et al.*, 2003).

Os queijos artesanais estão entre os principais produtos lácteos comercializados em todo mundo. Esses produtos encontram-se em posição de destaque devido a sua importância social, cultural e econômica. Uma grande variedade dos queijos artesanais é produzida a partir de leite cru, e o seu amadurecimento é diferente daqueles queijos produzidos com leite pasteurizado. A principal característica dos queijos produzidos com leite cru é que eles contam com uma comunidade microbiana complexa. Além disso, a microbiota indígena é capaz de inibir microrganismos patogênicos e deteriorantes, atuando como bioconservantes (Bintsis, 2021).

O queijo Canastra é um dos queijos mais populares e mais bem estudados em relação às suas características de produção, qualidade e aspectos de segurança alimentar. Esse queijo é produzido a partir do leite de vaca não pasteurizado, coalho, sal e soro de leite, denominado como “Pingo”. Este por sua vez é obtido a partir da dessoração dos queijos produzidos no dia anterior, durante o processo de moldagem. O “Pingo” contém uma diversidade de microrganismos como bactérias lácticas e leveduras que contribuem para transformar a coalhada em queijos maturados (Borelli *et al.*, 2006).

O queijo Canastra conta com uma diversidade grande de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Estudos realizados por Borelli *et al.* (2006), Andrade *et al.* (2017) e Andrade *et al.* (2021) mostraram que as leveduras *K. lactis*, *T. delbrueckii*, *D. hansenii* predominaram nas amostras de queijo Canastra. Essas leveduras apresentaram potencial elevado de fermentar lactose e soro do leite, influenciaram na produção de compostos orgânicos voláteis e na textura do queijo e demonstraram ser promissoras em tratamentos de infecção por patógenos gastrointestinais.

2.3 Papel das leveduras diante da infecção causada por *Salmonella*

A porcentagem de morbidade e mortalidade causada por patógenos entéricos, incluindo a *Salmonella*, é alarmante mesmo diante de uma variedade de antibióticos disponíveis no mercado. Algumas pesquisas estimam a ocorrência de aproximadamente 2,8 bilhões de casos anuais (Gut *et al.*, 2018).

Salmonella enterica sorovar Typhi é a bactéria causadora da febre tifóide e que causa entre 16 a 33 milhões de casos com aproximadamente 500.000 mortes. A *Salmonella* não tifóide é responsável por 90 milhões de casos e desses, 155.000 resultam em mortes anualmente (Bula-Rudas *et al.*, 2015).

A *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é classificada como Gram negativa, intracelular facultativa, não formadora de esporos, possui forma de bastonete e é anaeróbica facultativa. Algumas subespécies são capazes de fermentar a lactose, no entanto a maioria das espécies não apresenta essa característica. Além disso, são oxidase negativas e catalase positivas (Andino & Hanning, 2015).

O gênero compreende duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Análises genéticas e bioquímicas levaram a criação de 6 subespécies dentro de *S. enterica*. Cada subespécie de *S. enterica* contém vários sorovares. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contém a maior e mais significativa quantidade de patógenos de importância clínica. Os

sorovares *Typhi* e *Paratyphi* levam às doenças denominadas como febre tifóide e paratifóide respectivamente, sendo estas limitadas a humanos. Outros sorovares levam a febre não tifóide que podem ser encontradas nos mais diversos vertebrados, incluindo humanos, e outras restritas a vertebrados não humanos (Andino & Hanning, 2015; Gut *et al.*, 2018).

As espécies de *Salmonella* são encontradas no trato gastrointestinal de humanos e outros vertebrados. Por isso, ovos, carne bovina, suína, de aves, laticínios, vegetais e água podem ser fonte de transmissão de *Salmonella*. Essa bactéria pode ser transmitida pela via oral-fecal, onde hospedeiros suscetíveis podem adquiri-la por meio de água ou alimentos contaminados e transmiti-la. Portanto, os casos de infecção por *Salmonella* pode ser observado em maior proporção em países de baixa renda, onde as condições higiênico sanitárias são precárias (Andino & Hanning, 2015; Gut *et al.*, 2018).

Pouco tempo após a ingestão de água e alimentos contaminados, *Salmonella* coloniza o íleo distal e o cólon proximal. De acordo com algumas pesquisas, populações entre 10^5 e 10^6 células já são capazes de causar a infecção (Xu *et al.*, 2010).

Salmonella utiliza seus flagelos e a quimiotaxia para localizar os enterócitos, e a partir disso, utiliza fimbrias para realizar o processo de adesão. Uma vez aderida às células dos enterócitos, a invasão das células epiteliais não fagocíticas pela *Salmonella* ocorre devido à presença de dois sistemas distintos de secreção tipo III (T3SSs) codificados pela ilha de patogenicidade (SPI), o T3SS1 codificado por SPI-1 e o T3SS2, codificado pela SPI-2. Juntos, os sistemas de secreção T3SS1 e T3SS2 são responsáveis por injetar aproximadamente 40 proteínas envolvidas no mecanismo de internalização de *Salmonella* pelos enterócitos (Zhao *et al.*, 2025).

As células de *Salmonella* podem ser exocitadas para espaços intersticiais da lâmina própria, onde são fagocitadas por macrófagos, células dendríticas e células polimorfonucleares e direcionadas à linfa nos linfonodos mesentéricos e, em seguida, são transportadas para o baço e fígado via corrente sanguínea. Além da capacidade de invasão, *Salmonella* produz enterotoxinas e citotoxinas que agem na indução do acúmulo de fluido na alça ileal e na inibição da síntese proteica, respectivamente, o que gera sintomas como diarreia inflamatória. Além desses mecanismos, *Salmonella* também utiliza mecanismos como os flagelos e flagelinas (como fatores de virulência), superóxido dismutase e sistemas de aquisição de íons. Os flagelos aumentam a capacidade de invasão devido a sua motilidade enquanto a flagelina induz a resposta inflamatória. Os radicais livres gerados pelo hospedeiro

contra o patógeno podem ser neutralizados com a presença da superóxido dismutase e o sistema de aquisição de íons é importante para aquisição ou transporte de ferro, magnésio, potássio e zinco onde as concentrações são limitadas (Gut *et al.*, 2018).

Os antibióticos, muito utilizados para combater infecções causadas por diversos microrganismos incluindo *Salmonella*, estão se tornando ineficazes devido a seleção de bactérias resistentes, trazendo a necessidade de novas estratégias como forma de tratamento desses quadros inflamatórios. Nesse contexto, a utilização de microrganismos probióticos como forma de tratamento é uma alternativa interessante (Gut *et al.*, 2022). Diversas pesquisas elucidaram mecanismos envolvidos na inibição da infecção por *Salmonella* através da utilização de linhagens bacterianas probióticas. No entanto, as leveduras exercem mecanismos semelhantes e apresentam a vantagem de tolerar com mais eficácia as condições do TGI. Além disso, em contraste com as bactérias que apresentam susceptibilidade a medicamentos administrados contra as bactérias patogênicas, as leveduras não são suscetíveis podendo ser utilizadas em tratamentos combinados com medicamentos (Castillo *et al.*, 2012).

Já foi demonstrado que componentes da parede celular de leveduras como manoproteínas atuam na ativação de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos durante o quadro de infecção. Além disso o beta glucano, também presente na parede celular, possui receptores nas células do hospedeiro, indicando que esta molécula pode ser capaz de desencadear a modulação da imunidade humoral (Hudson *et al.*, 2016). Monômeros de manose na superfície celular das leveduras possuem receptores que podem levar a resposta pró ou anti-inflamatória (Levitz *et al.*, 2010).

Algumas leveduras foram descritas como tendo a capacidade de produção de Imunoglobulina A (IgA), fatores de necrose tumoral e muitas interleucinas. Por outro lado, em algumas situações as leveduras podem reduzir a produção de fatores pró inflamatórios e consequentemente a apoptose (Coutinho *et al.*, 2021). Outros trabalhos já demonstraram a importância da levedura na mudança da rotação de flagelos, o que impediria o trajeto da bactéria (Pontier-Bres *et al.*, 2012).

Alguns gêneros de leveduras isoladas do leite e kefir como *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* demonstraram participar da modulação imunológica quando ligantes como flagelinas e LPS estavam presentes. *Kluyveromyces marxianus* foi capaz de inibir a expressão de citocinas pró inflamatórias, quimiocinas e a liberação de TNF α (Romanin *et al.*, 2010; Gut *et al.*, 2022).

A ligação da levedura a superfície de bactérias patogênicas impedindo a ligação das mesmas ao epitélio intestinal é um mecanismo que foi associado a presença de adesinas presentes na superfície celular de algumas leveduras *S. cerevisiae* (Bruckner & Mosch, 2012).

A inibição do crescimento de patógenos como *Salmonella* pelas leveduras, geralmente ocorre pela produção de metabólitos como dióxido de enxofre, dióxido de carbono, etanol, síntese de toxinas, alterações de pH e produção de ácidos orgânicos. Esses mecanismos representam a importância de leveduras trazendo a necessidade da prospecção de novas espécies de leveduras, assim como de outros mecanismos envolvidos nesse processo (Muccilli & Restuccia, 2015).

2.4 Resistência dos probióticos às condições do trato gastrointestinal (TGI)

A população de microrganismos probióticos, assim como sua eficácia podem ser reduzidos devido às condições ambientais às quais os microrganismos são expostos como o pH ácido presente no estômago e sais biliares no intestino delgado. Os ácidos podem difundir-se através da membrana dissociando-se no interior no citoplasma em prótons e compostos carregados, o que altera o pH intracelular e afeta o gradiente de pH transmembranar. Uma vez afetado, o gradiente de prótons, que contribui para a força próton motriz, é reduzido e minimiza o rendimento energético necessário ao crescimento celular. Além disso, o pH baixo pode levar a danos no DNA e desnaturação proteica, o que causa inviabilidade à célula microbiana (Skoneczny & Skoneczna, 2018; Alkabani *et al.*, 2022).

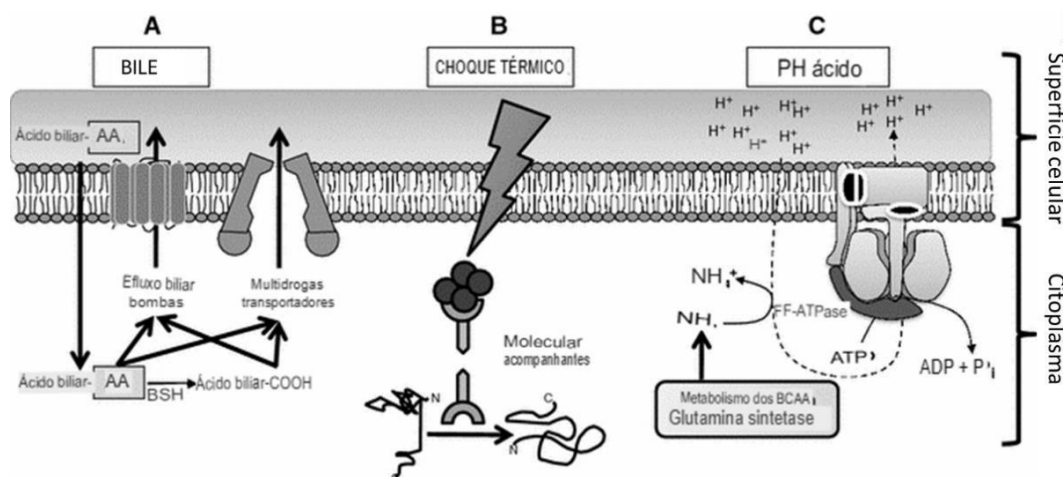
Os sais biliares, assim como as enzimas pancreáticas e hidrolíticas, são outro obstáculo que precisa ser vencido pelos microrganismos. Os sais biliares, produzidos a partir do colesterol, apresentam propriedades detergentes podendo ser tóxicos para os microrganismos. Além disso, o estresse alcalino do ambiente intestinal pode causar danos permanentes à célula. As funções desempenhadas pelos transportadores de membrana é mantida devido ao gradiente de prótons. Portanto, esse gradiente é necessário para a absorção de diversos nutrientes. Enquanto o pH ácido influencia o gradiente de prótons levemente, o pH alcalino o destrói, causando uma deficiência na absorção de nutrientes como a glicose e fosfato (Skoneczny & Skoneczna, 2018; Alkabani *et al.*, 2022).

Esses fatores, em conjunto, podem levar à geração de espécies reativas de oxigênio, o que é conhecido como estresse oxidativo, ocasionando danos às proteínas e, conseqüentemente, inativação de vias metabólicas intracelulares importantes para a manutenção da célula (Baig *et al.*, 2021).

Dentro desse contexto, a proteômica é uma técnica que fornece uma melhor compreensão de mecanismos moleculares microbianos envolvidos na resposta à exposição aos constituintes do TGI. Os métodos proteômicos incluem o fracionamento de proteínas por eletroforese em gel unidimensional (1DE) ou bidimensional (2DE). Em seguida, é realizada a técnica MS como a dessorção/ionização a laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI TOF/TOF MS) ou nano cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa tandem via ionização por eletrospray (LC-MS/MS), com o objetivo de buscar espectros semelhantes em bancos de dados disponíveis e realizar a identificação das proteínas (Stastna, 2024).

Alguns mecanismos utilizados pelos microrganismos são universais como a ativação de enzimas de dobramento como as DnaK, proteínas heat Shock (HSPs), chaperonas, entre outras, que neutralizam proteínas que foram dobradas incorretamente ou proteínas desnaturadas devido as condições adversas (Figura 1). Proteínas envolvidas no catabolismo de carboidratos também são observadas durante a passagem pelo TGI, e acredita-se que estejam relacionadas ao aumento da produção de energia necessária para o desempenho das funções celulares (Siciliano & Mazzeo, 2012). As ATPases de translocação de prótons, a exemplo da bomba de sódio e potássio, são outro grupo de proteínas mais expressas pelos microrganismos durante condições de estresse alcalino e estão envolvidas na manutenção do pH intracelular e, conseqüentemente, na manutenção das funções celulares (Mbye *et al.*, 2020) (Figura 1).

Figura 1: Principais mecanismos envolvidos na resposta microbiana ao estresse gastrointestinal.



Legenda: **A:** bile é desintoxicada do citoplasma pela atividade de bombas de efluxo biliar e/ou transportadores de múltiplas drogas. Os ácidos biliares conjugados são desconjugados pela hidrolase do sal biliar (BSH); **B:** Tanto a bile quanto o choque térmico induzem agregação e dobramento incorreto de proteínas, que é neutralizado pela ação de chaperonas e proteases; **C:** A F_1F_0 -ATPase é usada por bifidobactérias para neutralizar a acidificação do citoplasma que ocorre em ambientes

ácidos. Além disso, a produção de aminoácidos de cadeia ramificada é acoplada à desaminação da glutamina, produzindo amônia que atua como um tampão citoplasmático.

Fonte: Ruiz *et al.* (2011)

Siciliano & Mazzeo (2012) já descreveram a expressão de proteínas envolvidas na replicação, transcrição e tradução como RNA polimerases, fatores de alongamento e proteínas ribossomais.

Em resposta ao pH ácido também é comum observar a expressão de glutamina sintetase e proteínas envolvidas na biossíntese de aminoácidos de cadeias ramificadas, uma vez que esses podem gerar amônia que restauram o pH intracelular (Ruiz *et al.*, 2011) (Figura 1).

A membrana celular é um agente importante no processo de exposição as condições adversas e, geralmente, proteínas envolvidas na produção de exopolissacarídeos (EPS) ou no metabolismo de ácidos graxos, que diminuem a permeabilidade da célula aos sais biliares, são expressas na tentativa de proteger a célula microbiana de danos oxidativos causados pelos sais biliares (Mbye *et al.*, 2020). Também é comum a expressão de proteínas como a tioredoxina e superóxido redutase que favorecem a manutenção do equilíbrio redox intracelular (Morales-Amparano *et al.*, 2019).

Algumas estratégias que vem sendo empregadas com sucesso nos últimos anos e que fornece uma proteção das células microbianas às condições adversas durante a passagem pelo TGI são o encapsulamento, onde as células são revestidas por polímeros de qualidade alimentar e a adição de agentes protetores como os osmorreguladores e os crioprotetores (Staniszewski *et al.*, 2021).

A liofilização é uma técnica que, além de preservar o microrganismo, garante a redução do teor de umidade e facilita o seu transporte (Baig *et al.*, 2021). Para que o processo de liofilização seja bem sucedido, é necessário o congelamento da substância utilizada como agente crioprotetor e, posteriormente, sublimação da água a vácuo. Durante esse processo, o gelo passa para o estado gasoso resultando em uma substância seca. As vantagens do processo de liofilização residem em manter a cor e a textura do produto, preservar a viabilidade dos microrganismos e reter substâncias ativas utilizadas como matrizes, maximizando a qualidade nutritiva dos alimentos para os quais os probióticos são destinados (Reddy *et al.*, 2014).

Por outro lado, a liofilização pode afetar as membranas microbianas, assim como ao DNA, enzimas e proteínas. Os cristais de gelo formados durante o congelamento, podem causar danos mecânicos às membranas microbianas (Ge *et al.*, 2024; Ge *et al.*, 2024). Além disso, as proteínas de membrana, intracelulares e enzimas presentes podem sofrer desnaturação devido à baixa temperatura, o que compromete quimicamente a célula microbiana. O DNA, por outro lado, é afetado devido ao processo de secagem que pode causar um aumento da concentração de solutos, alterar a distribuição de cargas e destruir as ligações glicosídicas e de hidrogênio presentes entre as bases de DNA (Ge *et al.*, 2024).

Em função disso, diferentes crioprotetores têm sido amplamente utilizados, entre eles os carboidratos mostraram-se semipermeáveis, evitando a formação de cristais de gelo e fornecendo proteção mecânica, sendo os materiais mais comumente utilizados. Entretanto, também tem sido relatada a utilização de leite integral e desnatado, glicerol, entre outros (Ge *et al.*, 2024).

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leveduras são microrganismos promissores para serem utilizados como probióticos em diversos alimentos. Além de apresentarem potencial biotecnológico que as colocam nessa posição, elas também apresentam maior tolerância a condições abióticas quando comparadas com algumas bactérias. Entretanto, as pesquisas e a utilização de leveduras no mercado probiótico ainda é bastante restrita. Este trabalho traz respostas importantes quanto à utilização de leveduras em queijos artesanais, que são produtos de amplo consumo, a influência desses microrganismos nas mudanças ocorridas durante o processo de maturação e as vantagens que esta utilização pode trazer. Além disso, foi possível confirmar a proteção dos tecidos quando essas leveduras são administradas a camundongos com gastroenterite e os mecanismos bioquímicos ou metabólicos envolvidos na tolerância ao estresse gastrointestinal ao qual essas leveduras são submetidas quando consumidas em um alimento como veículo.

REFERÊNCIAS

- ABADÍA-GARCÍA, L.; *et al.* Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, v. 33, n. 2, p. 191-197, 2013
- ALKALBANI, N. S.; *et al.* Assessment of yeasts as potential probiotics: A review of gastrointestinal tract conditions and investigation methods. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 4, p. 365, 2022
- ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. **The Scientific World Journal**, v. 2015, n. 1, p. 520179, 2015
- ANDRADE, G. C.; *et al.* *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspota delbrueckii*: Probiotic characterization, anti-Salmonella effect, and impact on cheese quality. **Food Science & Technology - LWT**, v. 151, p. 112240, 2021
- ANDRADE, R. P. *et al.* Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, v. 91, p. 72–79, 2017
- ANDRADE, R. P.; *et al.* Survival of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspota delbrueckii* to simulated gastrointestinal conditions and their use as single and mixed inoculum for cheese production. **Food Research International**, v. 125, p. 108620, 2019
- ANIHOVI, E. S.; KESENKAŞ, H. Wagashi cheese: Probiotic bacteria incorporation and significance on microbiological, physicochemical, functional and sensory properties during storage. **Food Science & Technology - LWT**, v. 155, p. 112933, 2022
- BAIG, M. A.; *et al.* Potential probiotic *Pediococcus pentosaceus* M41 modulates its proteome differentially for tolerances against heat, cold, acid, and bile stresses. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 731410, 2021
- BINTSIS, T. Yeasts in different types of cheese. **AIMS Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 447, 2021
- BORELLI, B. M.; *et al.* Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1115-1119, 2006
- BRÜCKNER, S.; MÖSCH, H-U. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 1, p. 25-58, 2012
- BULA-RUDAS, F. J.; RATHORE, M. H.; MARAQA, N. F. *Salmonella* infections in childhood. **Advances in Pediatrics**, v. 62, n. 1, p. 29-58, 2015
- COUTINHO, J. O.; *et al.* In vitro and in vivo evaluation of the probiotic potential of Antarctic yeasts. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 5, p. 1338-1354, 2021

- CUNNINGHAM, M.; *et al.* Applying probiotics and prebiotics in new delivery formats—is the clinical evidence transferable? **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 495-506, 2021
- CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol.* 2007; 26 (6): 767-78
- FERREIRA, A. D.; VILJOEN, B. C. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 131-140, 2003
- GE, S. *et al.* Optimization of cryoprotectants for improving the freeze-dried survival rate of potential probiotic *Lactococcus lactis* ZFM559 and evaluation of its storage stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 198, p. 116052, 2024
- GE, S.; *et al.* Research progress on improving the freeze-drying resistance of probiotics: a review. **Trends in Food Science & Technology**, p. 104425, 2024
- GUT, A. M.; *et al.* Anti-salmonella properties of kefir yeast isolates: an in vitro screening for potential infection control. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 550-563, 2022
- GUT, A. M.; *et al.* *Salmonella* infection—prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. **Microbiology**, v. 164, n. 11, p. 1327-1344, 2018
- HELMY, E. A. *et al.* Evaluation of potentially probiotic attributes of certain dairy yeast isolated from buffalo sweetened Karish cheese. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01649, 2019
- HUDSON, L. E.; *et al.* Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. **PLoS one**, v. 11, n. 4, p. e0153351, 2016
- JAN, T. *et al.* Diversity, distribution and role of probiotics for human health: Current research and future challenges. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 53, p. 102889, 2023
- LEVITZ, S. M. Innate recognition of fungal cell walls. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000758, 2010
- LI, S. *et al.* Probiotic potential of γ -aminobutyric acid (GABA)—producing yeast and its influence on the quality of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6559–6576, 2021
- LI, Y.; *et al.* Influence of GABA-producing yeasts on cheese quality, GABA content, and the volatilome. **Food Science & Technology - LWT**, v. 154, p. 112766, 2022
- MANI-LÓPEZ, E.; RAMÍREZ-CORONA, N.; LÓPEZ-MALO, A. Advances in probiotic incorporation into cereal-based baked foods: Strategies, viability, and effects—A review. **Applied Food Research**, v. 3, n. 2, p. 100330, 2023
- MBYE, M.; *et al.* Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 3, p. 1110-1124, 2020

- MERCHÁN, A. V.; et al. Identification and selection of yeast with functional properties for future application in soft paste cheese. **Food Science & Technology - LWT**, v. 124, p. 109173, 2020
- MORALES-AMPARANO, M. B.; et al. Proteomic response of *Saccharomyces boulardii* to simulated gastrointestinal conditions and encapsulation. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, p. 831-840, 2019
- MUCCILLI, S.; RESTUCCIA, C. Bioprotective role of yeasts. **Microorganisms**, v. 3, n. 4, p. 588-611, 2015
- NANDI, S.; MANDAL, S. Probiotic potentiality, safety profiling and broad-spectrum antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from sour curd (Malda, India). **The Microbe**, p. 100297, 2025
- PONTIER-BRES, R.; et al. Modification of *Salmonella Typhimurium* motility by the probiotic yeast strain *Saccharomyces boulardii*. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33796, 2012
- RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYNSKA, A.; RYGALA, A. Probiotic activity of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* against human pathogens. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 230, 2012
- REDDY, K. B. P. K.; et al. Papel dos crioprotetores na viabilidade e propriedades funcionais de bactérias lácticas probióticas durante a liofilização. **Food Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 243-265, 2009
- REQUE, P. M.; BRANDELLI, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 1-10, 2021
- ROMANIN, D.; et al. Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 2-3, p. 102-108, 2010
- RUIZ, L.; et al. How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. **Genes & Nutrition**, v. 6, p. 307-318, 2011
- SAAD, N.; et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2013
- SHRUTHI, B.; et al. Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. **Biotechnology Reports**, v. 34, p. e00716, 2022
- SICILIANO, R. A.; MAZZEO, Maria Fiorella. Molecular mechanisms of probiotic action: a proteomic perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 390-396, 2012
- SILVA, A. A. D.; et al. Physicochemical profile of Canastra cheese inoculated with starter cultures of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspota delbrueckii*. **Foods**, v. 14, n. 1, p. 121, 2025

SKONECZNY, M.; SKONECZNA, A. Response mechanisms to chemical and physical stresses in yeast and filamentous fungi. **Stress Response Mechanisms in Fungi: Theoretical and Practical Aspects**, p. 35-85, 2018

STANISZEWSKI, A; KORDOWSKA-WIATER, M. Probiotic and potentially probiotic yeasts—Characteristics and food application. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1306, 2021

STASTNA, M. The role of proteomics in identification of key proteins of bacterial cells with focus on probiotic bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 16, p. 8564, 2024

XU, H.; LEE, H-Y.; AHN, J. Growth and virulence properties of biofilm-forming *Salmonella enterica* serovar Typhimurium under different acidic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 24, p. 7910-7917, 2010

ZHAO, H.; *et al.* The Interplay between *Salmonella* and Host: Mechanisms and Strategies for Bacterial Survival. **Cell Insight**, p. 100237, 2025

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

Artigo 1

**Physicochemical Profile of Canastra Cheese Inoculated with Starter Cultures of
Kluyveromyces lactis and *Torulaspora delbrueckii***

Publicado na revista Foods
DOI: <https://doi.org/10.3390/foods14010121>

Article

Physicochemical Profile of Canastra Cheese Inoculated with Starter Cultures of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii*

Adrielle do Amor Divino Silva ¹ , Dérica Gonçalves Tavares ² , Rafaela Pereira Andrade ¹, Tamara Leite dos Santos ¹  and Whasley Ferreira Duarte ^{1,*}

¹ Department of Biology, University of Lavras (UFLA)—Campus Universitário, Lavras 37200-900, MG, Brazil; adrielle2704@gmail.com (A.d.A.D.S.); rafaelaandrade1210@gmail.com (R.P.A.); tamaraleitesantos@gmail.com (T.L.d.S.)

² National Institute of Coffee Science and Technology, Department of Biology, University of Lavras (UFLA)—Campus Universitário, Lavras 37200-900, MG, Brazil; derica.goncalvestavares@louisville.edu

* Correspondence: whasleyduarte@ufla.br; Tel.: +55-35-3829-1358

Abstract: Canastra cheese, an artisanal cheese produced in Serra da Canastra—Brazil, has great cultural importance. Furthermore, this cheese has nutritional and sensory attributes that make it of great economic importance. Its microbiota is composed of different bacteria and yeasts. Some yeasts already isolated by our research group have been characterized as potential probiotics. Probiotic microorganisms have garnered scientific interest, as improvements in the physical, chemical and sensory characteristics of food products have been reported when these microorganisms are used. In this context, the objective of this work was to evaluate *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii*, which were previously isolated from Canastra cheese, as autochthonous starter cultures. Canastra cheese was produced under three different conditions: (1) cheese with “Pingo” (natural starter), (2) cheese with “Pingo” + yeast mixed culture, and (3) cheese with only mixed yeast culture. The results showed that the mixed yeast inoculum significantly influenced the lactic acid bacteria population. Yeast populations remained at around 10⁶ CFU/g after 45 days of maturation. Furthermore, cheeses containing the yeast mixed with inoculum had an initial lactose content reduced by 92.80% compared to cheese produced with “Pingo” (87.70%). The antioxidant activity, evaluated using the ABTS method, showed that cheeses containing the mixed yeast culture had higher percentages of antioxidant activity at 45 days of maturation. The texture profile of the cheeses changed over time. In general, the cheese containing the yeast mixed culture and “Pingo” and the cheese containing “Pingo” had the lowest hardness at 30 days of maturation (5245 and 5404 N, respectively). Among the volatile compounds, 3-methylbutyl octanoate, phenethyl butyrate, phenethyl propionate, isobutyl butanoate and pentyl propionate were found only in cheeses produced with yeast mixed culture. The obtained results demonstrated that the use of autochthonous probiotic cultures could improve the cheese characteristics without negatively impacting the traditional physicochemical attributes of Canastra cheese.

Keywords: probiotic yeasts; functional foods; artisanal cheese



Academic Editor: Robert L. Buchanan

Received: 21 November 2024

Revised: 26 December 2024

Accepted: 30 December 2024

Published: 3 January 2025

Citation: Silva, A.d.A.D.; Tavares, D.G.; Andrade, R.P.; Santos, T.L.d.; Duarte, W.F. Physicochemical Profile of Canastra Cheese Inoculated with Starter Cultures of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii*. *Foods* **2025**, *14*, 121. <https://doi.org/10.3390/foods14010121>

Copyright: © 2025 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Minas artisanal Canastra cheese is a type of artisanal cheese produced in the Serra da Canastra region in the state of Minas Gerais, Southwest Brazil. This cheese is produced

from raw milk using a culture of endogenous microorganisms called “Pingo”. “Pingo” is obtained from the cheese whey collected after the second salting of the cheese produced the previous day and contains lactic bacteria, such as those of the *Lactobacillus* and *Enterococcus* and *Weissella* genera, and yeasts, such as *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Yarrowia*, *Wickerhamiella*, *Trichosporon*, among others. Due to the diversity of microorganisms capable of fermenting milk, some small producers use Pingo as a starter in the production of Canastra cheese [1–3].

Canastra cheese has great cultural and economic importance and is the main source of income for small producers in the region [3]. It is estimated that approximately 800 families depend on the sale of this product. In 2019, the profit obtained from the sale of Canastra cheese was approximately US \$20 million. This demand was met only due to intense production equivalent to 20 kilos/day/producer in the previous year [2].

Compared to other Brazilian artisanal cheeses, Canastra cheese requires a longer maturation period, and according to legislation, Canastra cheese must mature for at least 22 days at room temperature before being sold. This maturation period, in addition to promoting greater safety in consumption, contributes to greater microbial diversity [2,4].

During the maturation period, the cheese’s water activity decreases, and the cheese’s endogenous microorganisms produce some organic acids that are responsible for the low pH and increased acidity. Together, these factors create an unfavorable environment for colonization by pathogenic microorganisms [2]. These characteristics, which are linked to the climate, temperature, altitude, native pasture and solar incidence of the region, give this cheese unique sensory characteristics [1,5].

Lactic acid bacteria play an important role during the cheese maturation process, contributing to lactose fermentation and lactic acid production, in addition to being involved in the biochemical processes that result in desirable sensory characteristics. However, more recent studies have reported the importance of other endogenous microorganisms, such as yeast.

Yeasts are common microorganisms in cheese production ecosystems due to their tolerance to a wide range of pH, temperature, low water activity and high salt concentrations. Yeasts can metabolize lactose and galactose and assimilate lactic and citric acids, which is important in the reestablishment of Gram-positive bacteria that are sensitive to acidic environments [6,7]. They play an important role in the microbiota and ripening of cheese, as they consume lactic acid with a consequent increase in pH. This factor favors the emergence of proteolytic bacteria [8,9]. In general, the most common yeasts found in the most diverse types of cheese are *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* and *Rhodotorula mucilaginosa*.

Although some yeasts are associated with undesirable characteristics, such as fruit flavor, mucoid texture and changes in color, in cheese, others improve the texture and aroma profile through the production of important metabolites [9]. In Brazil, yeasts have been the target of some studies in recent years due to the need for a better understanding of their role in the quality of cheese. Andrade et al. [1] isolated and identified *Torulaspora delbrueckii* B14 and *Kluyveromyces lactis* B10, and subsequent works by our group have evaluated their impact as simple and mixed inocula in cheese production. Andrade et al. [10] evaluated the impact of *T. delbrueckii* B14 and *K. lactis* B10 as simple and mixed inocula for cheese production, and also the survival capacity under simulated gastrointestinal conditions. These authors observed that yeasts presented a survival rate greater than 80% after passage through the simulated gastrointestinal tract, had self-aggregation rates greater than 90% and exhibited β -galactosidase activities of 0.35 U/g and 0.53 U/g, respectively. Both yeasts survived the maximum concentration of 10% NaCl for 21 days and showed growth at 4 °C. Andrade et al. [11] demonstrated the ability of the yeast *K. lactis* B10 to maintain the

survival of mice up to 24 days after infection with salmonellosis, with a survival rate of 90%. This survival rate, in comparison with the protection exerted by *Saccharomyces boulardii* (70%), demonstrate that the use of these yeasts in food products for probiotic purposes is very promising.

The few studies on yeast in cheese have shown that these microorganisms play an important role in the cheese maturation process. Furthermore, the use of potentially probiotic yeasts as starter cultures in the production cheese is understudied and may provide several promising applications. Thus, the objective of this research was to evaluate the effects of using the yeasts *K. lactis* B10 and *T. delbrueckii* B14 as autochthonous starter cultures and their impact on the physicochemical characteristics of Canastra cheese.

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of the Inoculum

K. lactis B10 and *T. delbrueckii* B14 were previously isolated from Canastra cheese and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 40% glycerol. The reactivation of the yeasts was carried out in YPD (1% yeast extract; 2% peptone; 2% dextrose) and incubation at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. The inoculum was multiplied until its population reached a cell concentration of 8 Log cells/mL. After obtaining the desired population, the yeasts were centrifuged at $10,000\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 min and stored in peptone water (0.1% *w/v*) until use.

2.2 Cheese Production

The cheeses were produced in a cheese factory in the municipality of Bambuí—MG ($20^{\circ}0'21''\text{ S}$, $45^{\circ}58'37''\text{ W}$), using the producer's physical infrastructure, milk and methods with the aim of faithfully reproducing the Canastra cheese production process. The raw milk was collected immediately after milking, transported to the cheese factory and then processed. A total of 150 L of raw milk, at approximately $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, was transferred to manufacturing tanks and then the specific inoculum for each treatment was added. Three treatments, in triplicate, were evaluated: I—Cheese made only with the producer's starter "Pingo"; II—Cheese made with "Pingo" and the mixed inoculum *K. lactis* B10 and *T. delbrueckii* B14; III—Cheese made using only the yeast mixed inoculum.

Milk coagulation was performed with commercial rennet (HA-LA[®] Chr. Hansen Lavras, Brazil) at a concentration of 1 mL/L (75 IMCU/mL). After adding the inoculum, rennet and salt to each treatment, the inoculum was mixed with the milk for 5 min followed by rest for 30 min. The obtained curd was cut with a stainless-steel cutter and homogenized for 5 min. Then the whey was removed, and the cheese mass was added to the molds. After molding, the cheeses were salted via dry salting, where the salt was deposited on the cheese surface. After 24 h, the cheeses were removed from the molds and stored in maturation chambers at room temperature ($18\text{ to }22\text{ }^{\circ}\text{C}$), turning every day to ensure product uniformity. The cheeses were matured over 45 days and samples were collected every 15 days. The protein was 29.61–30.12%, the moisture was 38.54–40.12% and the fat was 31.0–31.8%.³

2.3 Monitoring the Yeast and Bacteria Population During Cheese Maturation

Yeast and bacterial populations were monitored in the cheese during the cheese maturation process at 0, 15, 30 and 45 days. For plating, 5 g samples of cheese were diluted in 45 mL of 0.1% sterile peptone water and homogenized by vortexing. Subsequent dilutions were then prepared by transferring 100 μL of the previous solution to tubes containing 900 μL of 0.1% peptone water in labeled tubes for subsequent plating. For yeast counting, 100 μL aliquots were plated on plates containing YPD medium with 0.01% (*w/v*) chloramphenicol and incubated at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h. To count bacteria, plates

containing MRS medium supplemented with 0.2% (*v/v*) nystatin were used and incubated at 37 °C for the same period. After incubation, the population was determined, and the results were expressed in forming units per gram of cheese (Log CFU/g).

2.4 Determination of Sugars and Acids by HPLC

Acids and sugars were analyzed by liquid chromatography and determined in g/kg. To extract sugars, 0.5 g of cheese was diluted in 2.5 mL of mobile phase and vortexed. After extraction, the material was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C and the supernatant obtained was filtered through 0.22 µm filters. The chromatograph used was the Shimadzu (Shimadzu Corp, Kyoto, Japan) equipped with a refractive index detector (RID- 10A). The column used was Supelcogel 8H (Supelco, Bellefonte, PA, USA) (7.8 mm × 30 cm) at 30 °C. The mobile phase used was a 0.005 M H₂SO₄ solution at a flow rate of 0.5 mL/min. Identification was carried out by comparing the retention times of the compounds with those of pure standards injected under the same conditions. The concentrations of the identified compounds were determined by external calibration according to Andrade et al. [1]. All analyses were performed in triplicate.

2.5 Determination of Total Phenolic Compounds

Total phenolic compounds were evaluated by the Folin–Ciocalteu method according to Kamtekar et al. [12]. For this purpose, extracts were prepared according to the methods of Gil et al. [13], with modifications. Briefly, 0.5 g of cheese was diluted in 40 mL of methanol, resulting in an extract with a concentration of 10 mg/mL. This extract remained in the ultrasonic bath for 10 min and was then vortexed for one minute. Subsequently, 0.75 mL of the extract was added to 1.25 mL of 10% (*v/v*) Folin–Ciocalteu solution and 1 mL of 4% (*w/v*) sodium carbonate solution. The mixture was homogenized in a vortex mixer and left to rest for 2 h in the dark. The samples were analyzed spectrophotometrically at 750 nm. The total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalent per g of extract (EAG/g).

2.6 Antioxidant Activity of Cheeses—ABTS Test

The DPPH and ABTS•+ radical scavenging methods were carried out according to the methods described by Gil et al. [13]. The samples were kept in a dark environment, and spectrophotometric analyses were subsequently carried out. The results are expressed as percentage of free radical scavenging.

2.7 Electron Microscopy

The cheese samples collected at 15, 30 and 45 days of maturation were fixed in modified Karnovsky (composed of 2.5% glutaraldehyde, 2.5% formaldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2, 0.001 M CaCl₂) and kept in the refrigerator for a week) for a minimum of 24 h. Then, the samples were washed three times for 10 min each with sodium cacodylate buffer (0.05 M) and dehydrated in an increasing acetone gradient (25%, 50%, 75%, 90%, once and 100% three times) for approximately 10 min in each solution. After this dehydration, the samples were placed in the Balzers CPD 030 critical point device to replace acetone with CO₂ and complete drying. After this process, the samples were mounted on aluminum stubs with double-sided carbon tape on an aluminum foil film and covered with gold in an evaporator (Sputter Coater SCD 050—Balzers). The electron micrographs were recorded digitally under working conditions of 20 kV and a working distance of 9 mm using a Tescan Clara field emission scanning electron microscope from the Electronic Microscopy and Ultrastructural Analysis Laboratory (LME, UFLA).

2.8 Texture Profile Analysis (TPA)

TPA of the cheeses was carried out on a TA-XT2i SMS texturometer (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) equipped with a 75 mm diameter cylindrical probe. The hardness (N), adhesiveness (N), cohesiveness (N) and gumminess (N) of the samples were analyzed. The following parameters were used: cheese sample volume, 2 cm³; compression time, 5 s; test speed, 5 mm/s; and posttest speed, 2 mm/s [14]. Six measurements were taken for each sample.

2.9 Analysis of Volatile Organic Compounds by HS–SMPE GC–MS

The volatile compounds from the cheese samples were extracted using the solid phase microextraction technique (HS SPME), as described by Menezes et al. [15], with modifications. Samples (3 g) were placed in 20 mL vials. A 50/30 µm divinylbenzene/carboxene/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used to extract the volatile compounds. The fiber was stabilized for 10 min at 65 °C and then exposed in vials containing the sample for 25 min at the same temperature. After extraction, the fiber was kept for 5 min in the injector at 230 °C to desorb volatiles.

Volatile compounds were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Model GCMS-QP2010; Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with a Carbowax column (30 m × 0.25 mm id. × 0.25 µm). The oven temperature was set at 40 °C for 5 min, increased to 220 °C (at a rate of 10 °C/min) and finally held at this temperature for 10 min. The carrier gas was high-purity helium at 0.7 mL/min. The mass detector operated in selective mode was a quadrupole with an electron impact ionization system at 70 eV and 250 °C. Volatile compounds were identified using the NIST 2011 library and identities were confirmed using the linear retention index (LRI) calculated from the injection of a series of alkanes (C8–C40). The relative percentage of compounds was calculated by normalizing the peak area.

2.10 Statistical Analysis

The obtained data were subjected to ANOVA and Tukey's test. A heatmap was used to visualize the volatile organic compound data. All analyses were carried out using R software version 4.3.3.

3. Results and Discussion

3.1 Microbial Population Changes Throughout the Canastra Cheese Maturation Process

The yeast population in the cheeses was monitored for 45 days of maturation (Figure 1). At 15 days of maturation, the yeast + "Pingo" cheese had the highest yeast count (7.58 log CFU/g). However, at 30 days of maturation, there was a significant increase ($p < 0.05$) in the yeast population for the yeast mixed inoculum cheese. In this case, the yeast population was greater (7.67 log CFU/g) in relation to "Pingo" cheese (6.96 log CFU/g) and yeast + "Pingo" cheese (6.52 log CFU/g) (Figure 1A).

At 45 days of maturation, the yeast mixed inoculum cheese maintained the highest yeast population (6.51 log CFU/g) compared with the yeast + "Pingo" and "Pingo" cheeses, which did not differ from each other (6.24 and 6.25 log CFU/g, respectively). The yeast population in Canastra cheese has been previously reported in the literature by Andrade et al. [1] and Kothe et al. [16]. In the latter, the authors found that the diversity and abundance of yeast present in cheeses produced on several farms in the Serra da Canastra region were relatively high. Considering the yeast population present in "Pingo" and that in the used yeasts mixed culture, a higher yeast count in yeast + "Pingo" cheese could be expected. However, throughout the maturation of cheese, competition between yeasts and bacteria for nutrients can influence the reduction of the yeast population [17].

This hypothesis can be confirmed with the largest yeast populations being observed in cheeses containing separate inocula (yeast mixed inoculum or “Pingo” cheese).

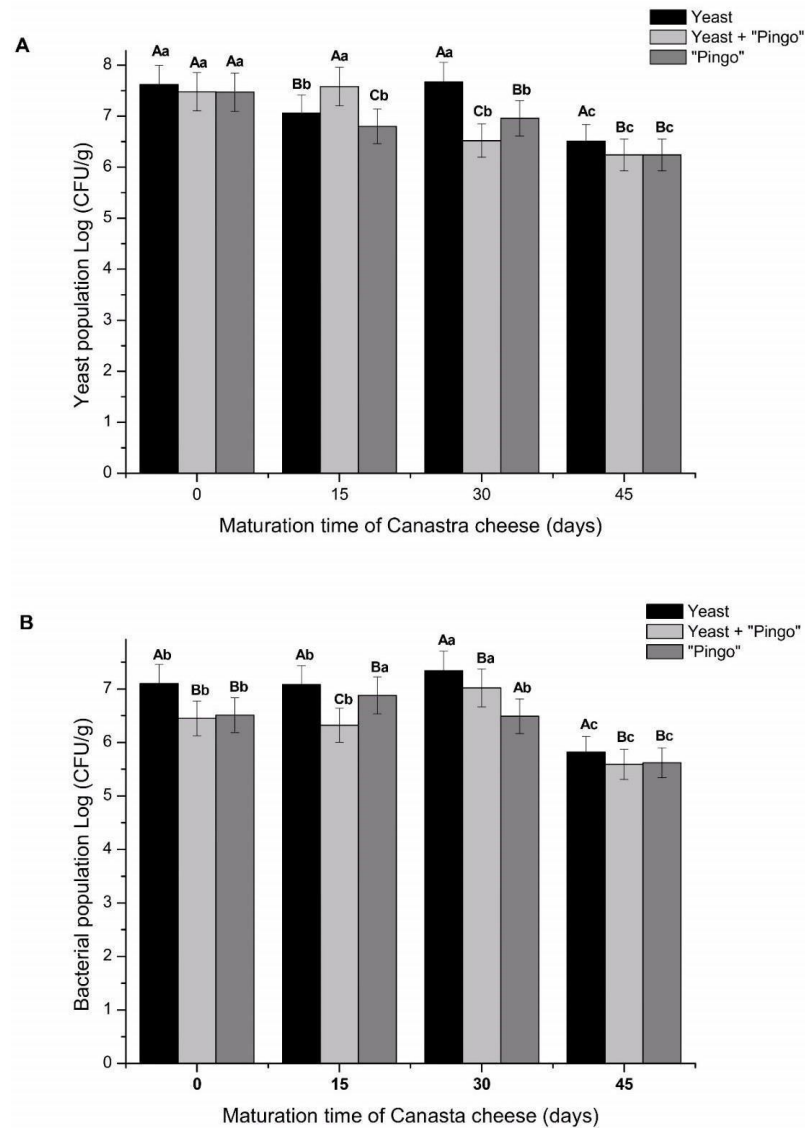


Figure 1. Microbial population over 45 days of cheese maturation. (A)—Yeast population. (B)—Bacterial population. The data are expressed as the mean of triplicate samples \pm standard deviation. Means with different letters are significantly different according to the Tukey test, $p < 0.05$. Capital letters represent the breakdown of treatments within time, and lowercase letters represent the breakdown of times within the treatment.

Regarding the bacterial population (Figure 1B), it was observed that the highest bacterial population count was found for the yeast mixed inoculum cheeses (7.08 log CFU/g) followed by “Pingo” (6.88 Log UFC/mL) and yeast + “Pingo” (6.32 Log UFC/g). At 30 days, the yeast mixed inoculum and the yeast + “Pingo” cheese were those with the highest populations (7.34 and 7.02 Log CFU/g, respectively). Finally, at 45 days of maturation, the yeast mixed inoculum cheese presented the highest population (5.82 Log CFU/g), while the yeast + “Pingo” and “Pingo” cheeses did not show a significant difference between populations (5.59 and 5.62 Log CFU/g).

The results suggest that inoculation of *K. lactis* B10 and *T. delbrueckii* B14 in the cheese

did not inhibit the growth or survival of lactic acid bacteria, since the population of bacteria in yeast mixed inoculum cheese was significantly greater ($p < 0.05$) at all analyzed maturation times than in cheeses with no added mixed yeast inoculum (Figure 1B). Similar

results were observed for the yeast + “Pingo” cheese. This same synergistic effect was observed by Centeno et al. [17], who associated the presence of *K. lactis* with an increase in *Enterococcus faecium* counts throughout the maturation of Cebreiro-type cheese. This phenomenon may be due to the release of growth factors such as amino acids and vitamins through autolysis or excretion, which promote the growth of bacteria. Furthermore, the release of some organic compounds by yeast, as well as the use of lactic acid during yeast metabolism, can result in an increase in pH, favoring the emergence of the bacterial community [18,19].

Another factor observed was the reduction in yeast and bacteria populations in all cheeses after 45 days of maturation (Figure 1A, B). Some factors related to the characteristics of cheese can limit the viability of microorganisms. Some of these factors are low water activity due to the loss of water in the cheeses during maturation, an increase in salt concentration and a significant change in pH. Together, these factors create, over time, an inhospitable environment for some microorganisms, resulting in a general tendency toward a decrease in microbial populations with an increase in the maturation period [2].

Considering that the yeasts evaluated in this work were previously characterized as potentially probiotic, it is worth mentioning that to exert probiotic effects, a food must contain between 8 and 9 log/CFU, which corresponds to the intake of approximately 100 g of food that contains between 6 and 7 log/CFU [20]. Our results are in line with expectations, since at the end of 45 days of maturation, all cheeses had yeast populations above 6 log CFU/g product. These results suggest good stability of the yeast population, even when used in combination with other microorganisms present in “Pingo”, allowing their use without significantly negative changes to the product in question.

3.2 Determination of Sugars and Acids by HPLC

Organic sugars and acids contribute to the development of the flavor and aroma of a wide variety of cheeses [21]. Sugar analysis of the cheeses revealed that the lactose content decreased in the first 15 days in the yeast mixed inoculum cheese, which was equivalent to 92.88% of the initial lactose content, while the lactose content in the “Pingo” cheese decreased to 87.70% of the initial content. The yeast + “Pingo” cheese, on the other hand, showed a reduction in lactose content to 92.80% of the initial content. At 30 days of maturation, the lactose content of the yeast mixed inoculum cheese decreased to approximately 50% of the lactose content measured at 15 days. On the other hand, yeast + “Pingo” and “Pingo” cheese did not show variations in relation to the previous time (15 days). At 45 days of maturation, the lactose concentration remained approximately constant in all cheeses compared to the concentrations found at 30 days of maturation (Table 1). The yeast mixed inoculum cheese presented the lowest residual lactose concentration at 45 days; however, the differences observed were nonsignificant ($p > 0.05$). These results, taken together, show that the introduction of mixed yeast culture significantly improves lactose consumption from cheese directly, since *K. lactis* yeast is already reported as a strain capable of metabolizing lactose, and indirectly through stimulation of BAL growth [19]. However, it is known that the interaction between bacteria and yeast during cheese ripening is a complex process and natural competition between these microorganisms may have been responsible for the lower consumption of lactose in cheeses containing both inoculums.

Carbohydrates can be used by microorganisms as precursors for their metabolism and, consequently, for their multiplication, which is in agreement with data referring to the yeast population (Figure 1A), where, notably, there is an increase in population concomitant with a reduction in the lactose content at 30 days of maturation (Table 1). Some previous work has demonstrated the efficiency of *K. lactis* strains in metabolizing lactose compared to other yeast strains or even lactic acid bacteria [1].

Table 1. Concentrations (g/kg) of carbohydrates and acids in cheese after 45 days of maturation.

Carbohydrates and Acids (g/kg)							
Inoculum	Time	Lactose	Galactose	Glucose	Lactic Acid *	Acetic Acid *	Citric Acid
Yeasts	0	44.5 ± 6.1 ^{Aa}	Nd	Nd	3.5 ± 2.1	0.76 ± 0.1	1.6 ± 0.4 ^{Ba}
	15	3.2 ± 0.9 ^{Ab}	Nd	Nd	26.8 ± 6.7	1.67 ± 0.3	0.25 ± 0.02 ^b
	30	1.5 ± 0.3 ^{Ab}	Nd	Nd	1.2 ± 1.2	1.0 ± 0.1	0.04 ± 0 ^b
	45	1.6 ± 0.01 ^{Ab}	Nd	Nd	0.6 ± 0.8	1.16 ± 0.1	0.04 ± 0 ^b
Yeasts + "Pingo"	0	44.4 ± 3.4 ^{Aa}	Nd	Nd	16.7 ± 0.02	0.63 ± 0.01	1.80 ± 0.05 ^{Ba}
	15	3.2 ± 0.4 ^{Ab}	Nd	Nd	24.7 ± 4.2	1.53 ± 0.1	0.04 ± 0 ^b
	30	3.9 ± 1.1 ^{Ab}	Nd	Nd	14.3 ± 19.7	1.28 ± 0.2	0.04 ± 0 ^b
	45	4.2 ± 1.3 ^{Ab}	Nd	Nd	20.8 ± 2.2	1.71 ± 0.2	0.54 ± 0.7 ^b
"Pingo"	0	44.7 ± 9.3 ^{Aa}	Nd	Nd	28.7 ± 6.0	0.79 ± 0.1	2.6 ± 0.4 ^{Aa}
	15	3.9 ± 0.1 ^{Ab}	Nd	Nd	36.6 ± 0.4	1.86 ± 0.1	0.04 ± 0 ^b
	30	5.6 ± 0.4 ^{Ab}	Nd	Nd	41.1 ± 3.5	1.16 ± 0	0.42 ± 0.1 ^b
	45	5.2 ± 0.04 ^{Ab}	Nd	Nd	40.5 ± 4.1	1.81 ± 0.3	0.04 ± 0 ^b

Means with different letters are significantly different according to the Tukey test, $p < 0.05$. Capital letters represent the breakdown of treatments within time, and lowercase letters represent the breakdown of times within the treatment. * Interaction not significant. Nd: Not detected.

Glucose and galactose were not detected immediately after cheese production or during maturation. Generally, glucose and galactose do not appear in cheese analyses at the beginning of production. The residual concentrations of these sugars found after a few days of maturation are generally related to the degradation of lactose. In this case, the emergence and consumption of glucose and galactose likely occurs between sampling intervals [10].

Organic acids are important in the physicochemical characteristics of the cheese matrix, preventing the appearance of pathogenic microorganisms and improving sensory aspects [22]. In milk, these acids are present naturally and originate from bovine biochemical metabolism, lipolysis or microbial metabolism, which may explain the concentration of lactic acid at the zero time of cheese maturation [23].

Among the acids analyzed, lactic acid is the main acid responsible for the low pH of cheese and directly influences parameters such as microbial population, texture and flavor [22,24]. Yeast mixed inoculum cheese showed an increase in lactic acid in the first 15 days of maturation concomitant with a decrease in lactose. However, at subsequent maturation times (30 and 45 days), the concentration of this acid progressively decreased (Table 1). On the other hand, the lactic acid concentrations observed in the yeast + "Pingo" and "Pingo" cheeses were greater than those in the yeast mixed inoculum cheese at 30 and 45 days. This factor may have been caused by the greater population of lactic acid bacteria in cheeses that contained "Pingo" as an inoculum. Similar results were found by Garde et al. [21], who suggested in their work that the presence of homofermentative bacteria can cause high concentrations of lactic acid during cheese maturation.

The acetic acid concentrations in the cheeses increased up to 15 days of maturation, with a subsequent decrease in all the treatments after maturation (Table 1). Citric acid concentrations decreased between 0 and 45 days in all cheeses produced (Table 1). These results suggest that citric acid metabolism may be responsible for the emergence of acetic acid [22].

3.3 Analysis of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity Measured by the ABTS Method

Given the importance of polyphenols in the human body, the phenolic compounds in cheeses at different maturation times were evaluated. According to the results, all

cheeses showed a significant increase ($p < 0.05$) in the concentration of phenolic compounds over time. However, at 15 and 30 days of maturation, “Pingo” cheese presented higher concentrations of phenolic compounds (1.56 and 2.32 mg GAE/g, respectively) than yeast + “Pingo” (1.3 and 2.08 mg GAE/g) and yeast mixed inoculum cheeses (1.2 mg and 2.03 mg of GAE/g). However, yeast mixed inoculum cheeses had a phenolic compound concentration of 2.87 mg GAE/g, which was significantly greater than that of the other cheeses at 45 days of maturation (Figure 2A).

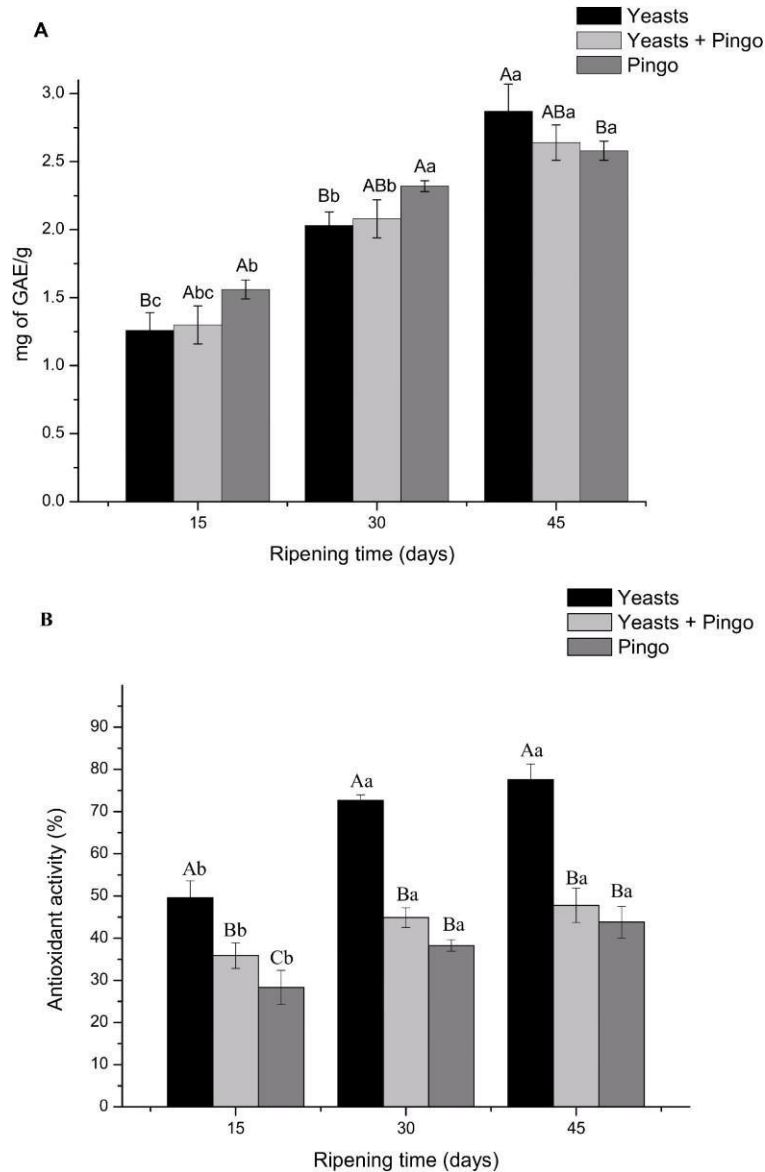


Figure 2. Phenolic concentration and antioxidant activity were evaluated using the Folin–Ciocalteu and ABTS methods for yeast mixed inoculum cheeses, “Pingo” and mixed inoculum and “Pingo” after 15, 30 and 45 days of maturation. Data are expressed as the mean of triplicates \pm standard deviation. Means with different letters are significantly different according to Tukey’s test, $p < 0.005$. Capital letters indicate distribution of treatments over time. Lowercase letters indicate times within the treatment. (A) TFC—Total phenolic compounds (mg GAE/g). (B) Positive control for ABTS.

Phenolic compounds are generally produced through secondary metabolism of plants and are found in low concentrations in cheeses due to animal feed. However, it has already been reported that some bacteria or even yeast can produce phenolic compounds

such as xanthenes, which may explain the increase in concentrations observed during maturation [25]. Phenolic compounds are responsible for changes in flavor that, depending on the concentration, can become unpleasant [26]. However, many phenolic compounds have important biological activities, and in some cases, the concentration of phenolic compounds can positively correlate with antioxidant activity, as was observed for cheese containing mixed yeast culture at 45 days of maturation [13].

The antioxidant activity, evaluated by the ABTS method, is shown in Figure 2B. The yeast mixed inoculum cheese showed greater free radical scavenging activity (49.54, 72.62 and 77.53%) at 15, 30 and 45 days of maturation, respectively.

Some authors have reported that antioxidant activity is affected by the concentrations of macro- and micronutrients, enzyme systems, hydrolyzed proteins and free amino acids. Furthermore, some microorganisms can release bioactive peptides through the metabolism of their precursor proteins through the proteolytic system during cheese maturation [27]. The results indicate that the presence of mixed yeast culture in the cheese may have had a positive impact on this aspect. Abadía-García et al. [28] and Mushtaq et al. [29] suggested that the addition of starter probiotic bacterial strains to cottage cheese increased the levels of antioxidant activity since these strains were able to metabolize polypeptides in cheese, generating peptides or free amino acids with antioxidant characteristics.

In addition, the use of starter cultures increases metabolic activity in cheese so that yeasts have greater antioxidant activity than bacteria [30,31], and this activity may be related to cell wall polysaccharides, intracellular enzymes and bioactive peptides. It has already been described that (1→3) β-D-glucan and others found in the cell walls of some yeasts may play a role in this process [32].

The general results suggest that, due to the increase in total phenolic compounds and antioxidant activity observed by the ABTS test, cheeses produced with mixed cultures of potentially probiotic yeasts have greater antioxidant capacity after 30 days of maturation. Furthermore, the need for a longer maturation period for artisanal cheeses produced with raw milk associated with the benefits related to the inclusion of probiotic yeasts demonstrates that our cheeses are in accordance with the basic needs for the commercialization of Canastra cheese.

3.4 Scanning Electron Microscopy

The microstructure of the cheeses was analyzed after 15, 30 and 45 days of maturation to evaluate the effect of adding the mixed yeast culture on the structural arrangement of the cheese matrix. Electron micrographs show different microstructural arrangements depending on the maturation time and the inoculum used (Figure 3).

At 15 days of maturation, the yeasts mixed inoculum and yeasts + “Pingo” cheeses showed uniform and noticeable pores (Figure 3(3.1,3.2)). These results are probably related to the intense metabolic activity in cheeses inoculated with the mixed yeast culture. The faster acidification resulting from lactose metabolism (Table 1) by yeasts probably resulted in a faster decrease in pH, with consequent dissolution of the casein minerals. This factor likely resulted in reduced interactions between proteins and smaller casein aggregates. A greater tendency for various spaces between the protein matrix was observed [33]. On the other hand, the “Pingo” cheese had a more compact microstructure than did the other cheeses after 15 days of maturation (Figure 3(3.1)). However, at 30 and 45 days, the structure appeared less compacted and had more space (Figure 3(3.1 F and I)). This occurs because the cheese matrix with higher concentrations of lactic acid generates clots with smaller and more demineralized casein particles, resulting in a more fragile protein network [34]. These results are in agreement with the data presented in Table 1, in which lactic acid concentrations in “Pingo” cheeses were greater at 30 and 45 days than those in yeasts mixed

inoculum cheeses. Furthermore, it has already been reported by Oluk [33] that some of the empty spaces sometimes represent spaces originally occupied by fat globules which were expelled during pressing.

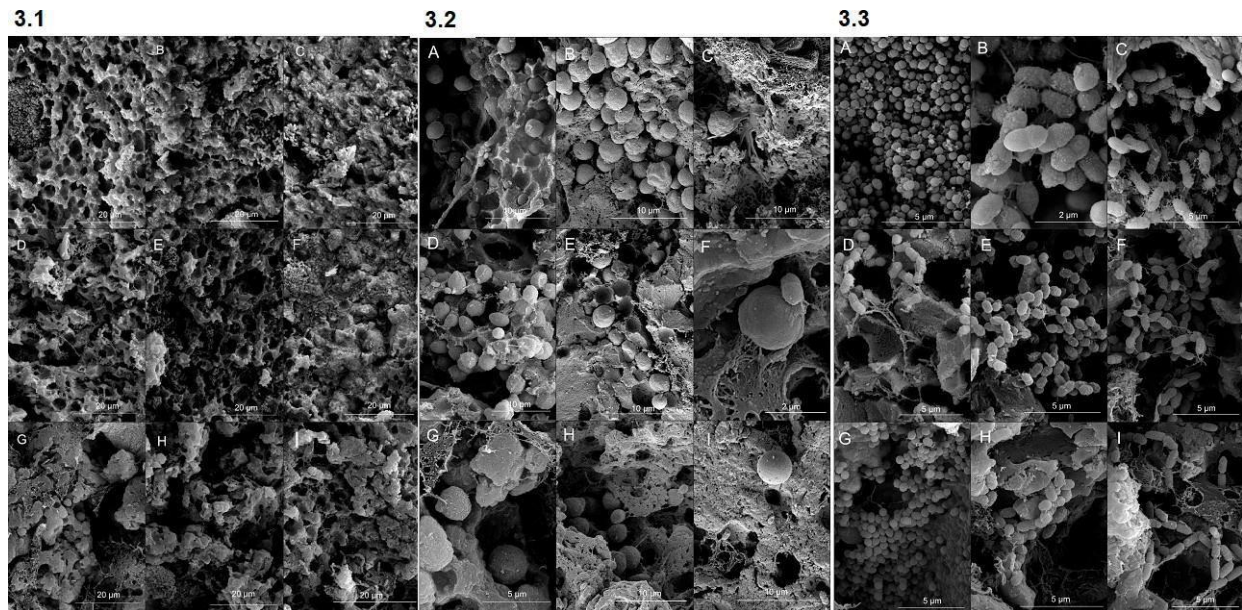


Figure 3. Electron microscopy of cheeses containing mixed yeast inoculum, “Pingo” and mixed inoculum and “Pingo” at 15, 30 and 45 days of maturation. 3.1 (A–I): Microstructure of the three cheeses (horizontal) throughout the maturation time (vertical). 3.2 (A–I): Yeasts present in the dough of the three cheeses (horizontal) throughout the maturation time (vertical). 3.3 (A–I): Bacteria present in the dough of the three cheeses (horizontal) throughout the maturation time (vertical).

At 45 days of maturation, a reduction in uniform distribution and an increase in pore diameter were observed in cheeses produced with yeast. As the maturation period increases, proteolytic activity decreases and can result in fewer spaces and protein breakdown, resulting in a more compact network [33,35]. This can also be explained by the decrease in lactic acid concentration as the maturation period increases in the yeast mixed inoculum and yeast + “Pingo” cheeses (Table 1). Furthermore, it is possible to observe the distribution of yeast cells throughout the cheese matrix. The yeast density was maintained during the 45 days of maturation in the yeast mixed inoculum and yeast + “Pingo” cheeses (Figure 3(3.2 G and H)). Yeast cells were generally observed in clusters. Furthermore, it can be seen through the scars that many cells were in the recent process of division, indicating that even at the end of the maturation period, these microorganisms showed intense metabolic activity, which is in agreement with the data presented in Figure 1A.

The yeast population in “Pingo” cheeses was not observed at a high density (Figure 3(3.2 I)), which may have occurred because in some situations, such as competition for nutrients, yeasts tend to migrate to specific regions of the cheese, such as the rind, which can make observation difficult depending on the sample used [36]. Bacteria in the form of cocci and bacilli could be observed, as well as the division ring, which was very present even at 45 days of maturation, demonstrating intense cell division activity (Figure 3(3.3 G and I)). It is possible to observe bacilli with fimbriae, a notable characteristic of contaminating bacteria in cheese processing [37]. Some studies have reported that the inclusion of probiotic cultures in cheeses can affect their textural characteristics, such as hardness [17]. Microscopy revealed that, in fact, the mixed yeast culture had a positive impact on this aspect since the cheeses that presented the mixed yeast culture as inoculum

had a less compact matrix, one of the aspects that may have been responsible for the lower hardness values observed in these cheeses after 15 days of maturation (Figure 4).

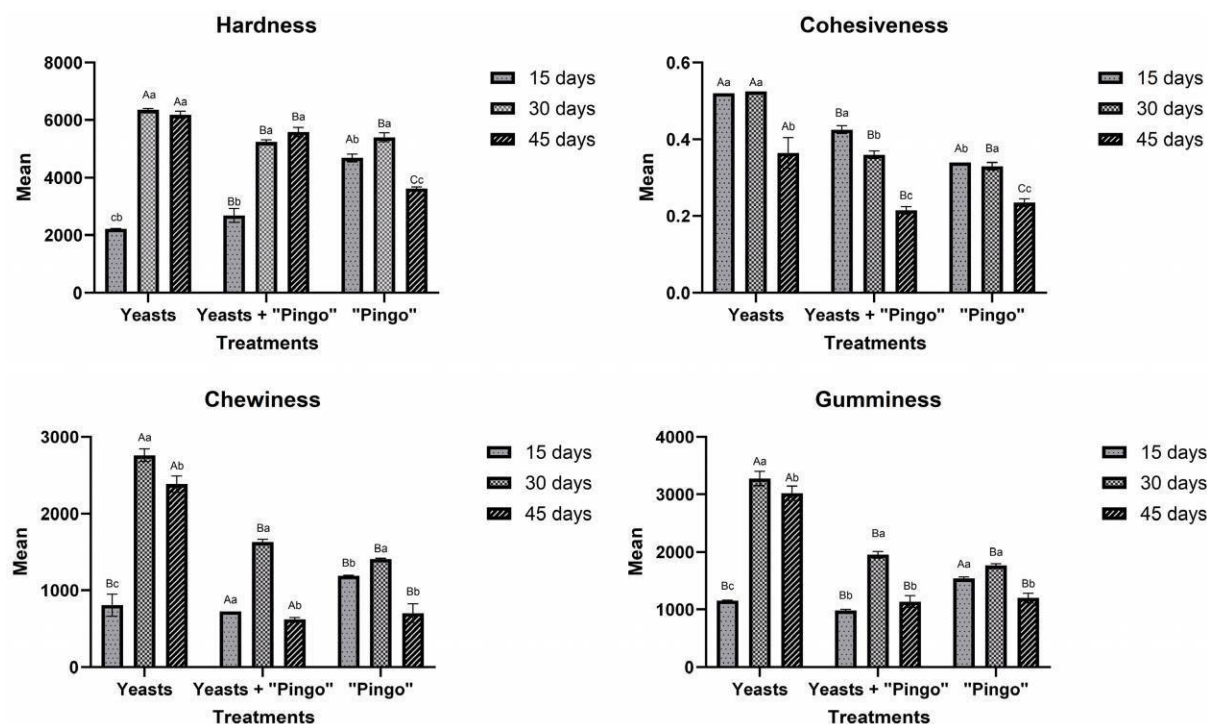


Figure 4. Evaluation of hardness, chewiness, cohesiveness and gumminess of cheeses containing the mixed yeast inoculum, "Pingo" and mixed inoculum and "Pingo" at 15, 30 and 45 days of maturation. Data are expressed as the mean of triplicates \pm standard deviation. Means with different letters differ significantly according to Tukey's test, $p < 0.05$. Distribution of uppercase letters of treatments over time. Lowercase letters indicate times within the treatment.

3.5 Texture Analysis

The texture profiles of the cheeses after 45 days of maturation are presented in Figure 4. At 15 days, the yeast mixed inoculum cheese (2220 N) and the yeast + "Pingo" cheese (2683 N) presented lower hardness than the "Pingo" cheese (4688 N). At 30 days of maturation, an inversion in these values was observed, where the hardness values of the yeast

+ "Pingo" and "Pingo" cheeses were lower (5245 and 5404 N, respectively) than that of the yeast mixed inoculum cheese (6348 N) (Figure 4). At 45 days, the texture of the yeasts mixed inoculum cheese did not significantly differ from that at 30 days of maturation. Interestingly, "Pingo" cheese had the lowest hardness (3618 N). Although some research shows that the presence of probiotic cultures can improve textural aspects such as hardness, other factors can also interfere [23,38]. Kondyli et al. [39], for example, reported that a relatively low pH, resulting from factors such as the metabolism of starter cultures, may be responsible for a cheese that is less firm, more brittle and has a consequent decrease in hardness. These results, associated with higher concentrations of lactic acid at 30 and 45 days in "Pingo" cheeses, may explain the lower hardness values in the respective treatments at the end of maturation (Table 1). In general, the hardness values remained approximately stable between 30 and 45 days of maturation. Furthermore, as shown in Figure 3, the cheeses that contained the mixed yeast culture presented more noticeable macroscopic pores, probably resulting from, among other factors, the CO_2 produced by the microorganisms. This may have influenced the reduction in the hardness of these cheeses [17].

Cohesiveness, which measures the strength of the internal bonds of the protein matrix, was also analyzed. In the three cheeses produced, the cohesiveness decreased with increas-

ing maturation (Figure 4). Most likely, the proteolysis that occurs throughout the cheese maturation process or a possible decrease in pH caused by the increase in the activity of lactic acid bacteria may have influenced the decrease in the integrity and cohesion of the casein micelles, generating lower values with increasing maturation [40].

Chewability, characterized as the energy required to bring the cheese to a uniform state before swallowing, was positively correlated with hardness. Up to 30 days of maturation, the chewability of the yeast mixed inoculum and yeast + “Pingo” cheeses significantly increased ($p < 0.05$) over time. However, at 45 days, there was a significant decrease in chewability ($p < 0.05$), which is in line with Jia et al. [41]. “Pingo” cheese presented similar values at 15 and 30 days, with a subsequent decrease at 45 days.

All the cheeses showed an increase in gumminess up to 30 days of maturation. However, at 45 days, the gumminess decreased in all the cheeses (Figure 4). As gumminess is the product of hardness and cohesiveness, and as all cheeses showed an increase in hardness up to 30 days, it was expected that the gumminess of the cheeses would be greater at 30 days than at 45 days of maturation [39].

3.6 Profile of Volatile Compounds

The volatile compounds of the cheese were analyzed over the 45 days of maturation and are shown in Figure 5. Fifty-six compounds belonging to the following groups were identified: esters (25), alcohols (14), acids (8), ketones (5), aldehydes (2), terpenes (1), lactones (1). Cluster analysis showed a trend towards higher concentrations of esters at the final times of maturation (30 and 45 days), while acids, alcohols, aldehydes and ketones are predominantly observed at the initial times in all cheeses (Figure 5).

Esters were the compounds that showed the greatest abundance in all cheeses. In general, a trend toward an increase in the concentration of esters in cheeses was observed over 45 days of maturation, with an emphasis on yeasts mixed inoculum and yeasts + “Pingo” cheeses at 30 and 45 days (Figure 5). Esters are produced from the reaction between the alcohol produced by lactose fermentation or amino acid catabolism and intermediates from the catabolism of fatty acids or amino acids [42]. Some esters, such as 3-methylbutyl octanoate (-), phenethyl butyrate (fruity/floral), phenethyl propionate (roses/floral/honey), isobutyl butanoate (-), pentyl propionate (-) and butyl propionate (-), were identified in cheeses that contained the mixed yeast culture (Figure 5). Among these esters, phenethyl butyrate has previously been described in Cebreiro cheeses inoculated with the yeast *K.*

lactis, which suggests that this ester is related to the metabolism of this yeast [17]. Phenethyl

acetate (rose/floral), although present in all cheeses, was found to be more abundant in cheeses containing the mixed yeast inoculum at all times analyzed (Figure 5). Ethyl esters of hexanoic, butanoic, decanoic, octanoic and dodecanoic acids were the most abundant. Furthermore, they were present in all cheese samples. These esters showed fluctuations in their concentrations throughout the 45 days of maturation. The esters of hexanoic, butanoic and octanoic acids have also been described as the most abundant in goat cheese samples, contributing a sweet flavor (fruity/ice cream) and playing an important role in the aroma and flavor of several cheeses already described. However, they may present negative effects depending on the concentration [41]. Other methyl esters of decanoic, hexanoic, octanoic and dodecanoic acids were also observed in lower concentrations.

An important alcohol for the development of cheese aroma is 2-butanol, which was observed mainly in cheeses containing “Pingo” (7.07, 6.31 and 6.88%) and in yeast + “Pingo” cheeses (6.44, 9.05 and 5.24%) at 15, 30 and 45 days, respectively. In cheeses containing only the mixed culture, it was observed only after 30 and 45 days and in lower percentage (6.32 and 2.70%) (Figure 5). On the other hand, 1-butanol was observed only after 30 days of maturation in all cheeses, especially the cheese containing both inocula (3.82%) (Figure 5).

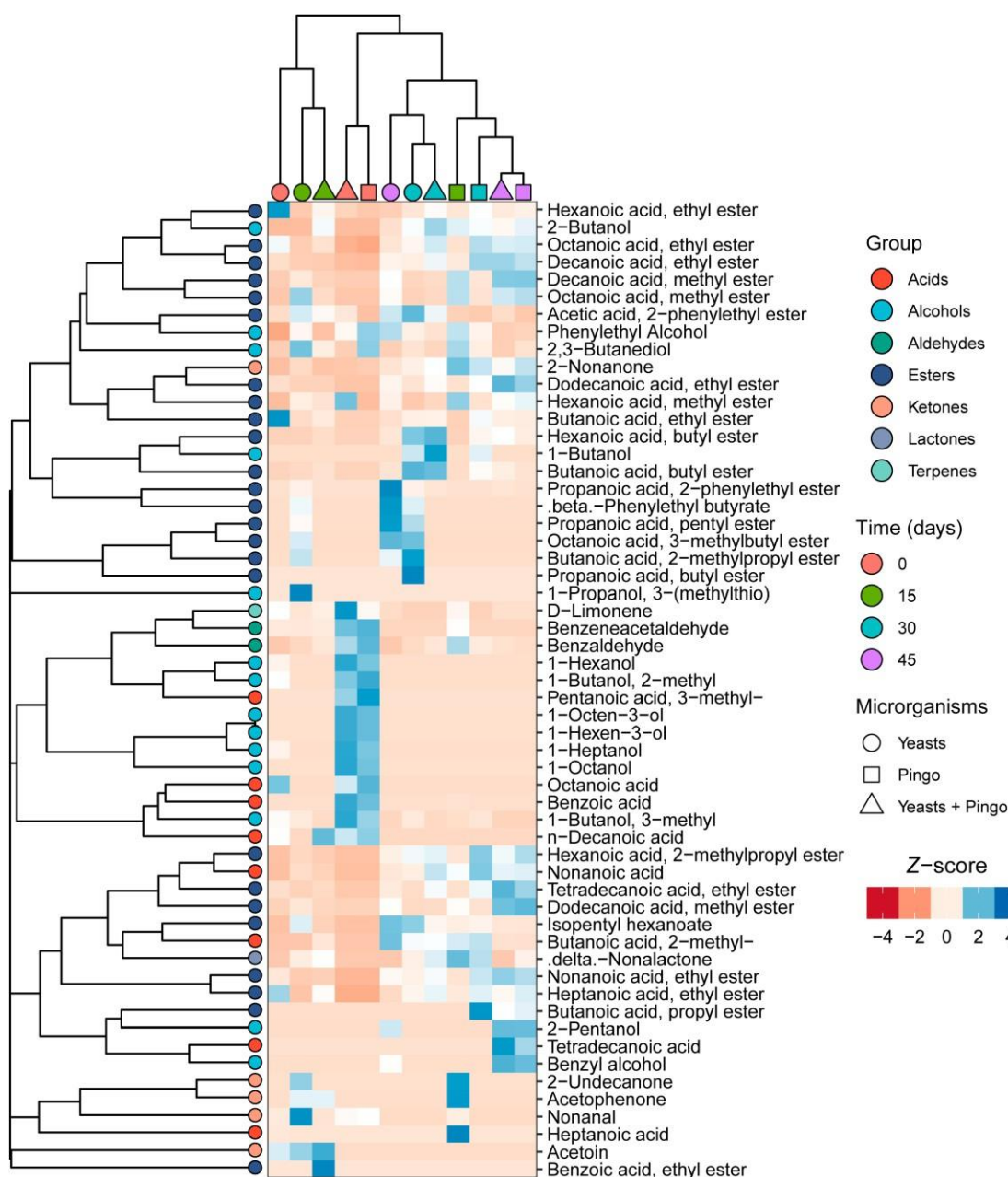


Figure 5. Heatmap and hierarchical cluster analysis of the volatile organic compound profile in cheeses produced with yeast mixed inoculum, mixed inoculum + “Pingo” and with only “Pingo” at 15, 30 and 45 days of maturation. The columns contain the cheeses and their respective aging times. The correlation matrix is represented by a color gradient in which dark blue indicates a positive correlation and dark red indicates a negative correlation (Pearson’s correlation coefficient). The color matrix results in the clustering tree shown in the upper part of the figure, which groups the cheeses that do not differ significantly from each other in the same branch and separates the cheeses that differ significantly in different branches.

The alcohols 1-octanol and 1-octen 3-ol were observed only in cheeses containing “Pingo” and in yeasts + “Pingo” cheeses at time 0 of maturation, indicating that this alcohol is probably related to the metabolism of endogenous organisms in “Pingo”. The alcohols 1-hexanol and 1-heptanol were observed at time 0 of maturation in all cheeses; however, higher concentrations were observed yeasts + “Pingo” cheeses.

Although there are some variations in the concentrations of alcohols over the days of maturation, it is possible to observe that there is a tendency towards the reduction of these compounds over time. According to Delgado et al. [40] and Ianni et al. [42], some

alcohols may present decreasing concentrations over the maturation time as many of these compounds are involved in reactions together with acids to form esters.

In cheeses, the metabolism of lactose and some amino acids, in addition to the reduction of methyl ketones and linoleic and linolenic acids, can produce alcohols of different types. Among the alcohols observed, 3-methyl-1-butanol (fresh/alcohol aroma) and phenylethyl alcohol (rose/floral aroma) were present in all cheese samples and at all maturation times (Figure 5). 3-methyl-1-butanol showed a trend of gradual decreasing concentrations over time in all cheeses and has been described as responsible for the light aroma of beef mozzarella, which provides a pleasant aroma to fresh cheese [40]. On the other hand, the phenylethyl alcohol concentration increased in the yeasts mixed inoculum cheeses, with a greater concentration observed at 45 days than at 15 and 30 days (15.94%). In the “Pingo” cheeses, this concentration of this alcohol decreased over time, and in the yeast + “Pingo” cheeses, there were variations in the concentration, where higher percentages were observed at 0 and 30 days. Centeno et al. [17] also reported significantly higher concentrations ($p < 0.05$) of this alcohol in cheeses produced with *K. lactis*. Phenylethyl alcohol is known for its pleasant floral, fruity and fermented (wine) aroma and is produced by yeast through phenylalanine [43]. This explains the greater abundance of this alcohol observed in cheeses containing mixed yeast culture.

In general, fatty acids do not make a major sensory contribution to cheeses but are related to the production of important compounds such as alcohols, esters, and methyl ketones. Octanoic acid (rancid/fatty) and benzoic acid (-) were detected in all cheeses at time 0 of maturation, with greater abundance being observed in “Pingo” (16.16%) and yeast + “Pingo” cheeses (12.87%), respectively. Similar results were obtained by Centeno et al. [17], who observed higher concentrations of octanoic acid in cheeses containing bacterial inocula. n-Decanoic acid was also detected in all cheeses at 0 and 15 days in the yeasts + “Pingo” treatment group. These acids were detected in samples of fresh goat cheese aged 90 days and have been determined to be key compounds in the development of the flavor of this type of cheese [44,45]. 2-Methylbutanoic acid (a fruity fatty acid) was detected at all maturation times in the yeast + “Pingo” and “Pingo” cheeses. In yeast mixed inoculum cheeses, this acid was observed only at 30 and 45 days. According to previous research, butanoic acid is one of the main contributors to several cheese varieties due to its low perception threshold [46].

Aldehydes are important compounds in cheese flavor due to their low perception threshold. However, most of the time, these compounds vary greatly during cheese maturation, and according to Li et al. [47], they are quickly reduced to primary alcohols or oxidized, which may explain the absence of these compounds in some of the maturation intervals evaluated. Among the aldehydes observed, benzaldehyde (almond/cherry) was present throughout the maturation of “Pingo” and, consequently, of yeast + “Pingo” cheeses, with a decrease occurring over 45 days. In yeast mixed inoculum cheese, this compound was only present at 15 and 30 days, with lower concentrations (0.21 and 0.23%, respectively) than the concentrations observed in other cheeses. Benzeneacetaldehyde (floral/honey) was detected at 0 and 15 days in all cheeses, especially in “Pingo” cheeses (2.30 and 0.96%).

Another class of volatile compounds important for the development of cheese flavor is ketones, which are normally formed through fatty acids present during maturation. Due to their low perception threshold and characteristic aroma, ketones and, essentially, methyl ketones contribute positively to the aroma of cheeses. Fruity, floral and musty notes are associated with several methyl ketones [43]. In the cheeses evaluated, two methylketones (2-nonanone and 2-undecanone) were identified. The 2-nonanone (fruity/musty) level was greater in “Pingo” (3.68%), followed by yeast + “Pingo” (2.64%) and yeast mixed inoculum (1.62%) cheeses, after 45 days of maturation. Furthermore, an increase in their

concentrations was observed over time. On the other hand, low concentrations of 2-undecanone (fruity/floral) were observed only after 15 days of ripening in the yeasts mixed inoculum and “Pingo” cheeses. Interestingly, in the yeast + “Pingo” cheeses, this compound was not detected. Compounds such as methyl ketones can cause cheese to have a sweet, waxy ester aroma, and, depending on their concentration, can have a positive impact on the aroma and flavor of the cheese [47].

Acetoin is the most abundant ketone and normally has a buttery, creamy flavor and fermented milk aroma. Acetoin was detected in only the yeast mixed inoculum and yeast + “Pingo” cheeses at concentrations of 22.62 and 32.28%, respectively, after 15 days of maturation. Similar results were found by Jia et al. [41] and Gao et al. [48], who linked acetoin to 80% of the contribution to flavor development in cheeses. This compound is directly related to 2,3-butanediol, since some yeasts use this compound as an intermediate in this process [10].

The only terpene identified was D-limonene, which, according to Ricci et al. [49], is associated with the secondary metabolism of plants, although lactic acid bacteria can also synthesize them. However, the contribution of D-limonene to the aroma and flavor of cheese is not fully defined [50].

Lactones are formed from the degradation of fat present in milk. They have creamy, sweet and fruity notes and can contribute to the flavor of cheese [51]. The only lactone observed was δ -nonalactone (coconut) at 15 and 30 days of maturation in all cheeses, especially in cheese produced with “Pingo” and in that produced with mixed yeast inoculum + “Pingo”. In general, the concentrations of this compound were relatively low.

4. Conclusions

The mixed culture of *T. delbrueckii* B14 and *K. lactis* B10 had a positive impact on the characteristics of the cheeses, increasing the antioxidant activity and sugar consumption associated with lactic acid metabolism. Furthermore, the inclusion of yeast influenced the emergence of aromatic compounds that positively impact the aroma and flavor of the cheese, which demonstrates that the addition of the mixed culture of *T. delbrueckii* B14 and *K. lactis* B10 did not have a negative impact on this aspect and proves to be an interesting alternative considering the probiotic potential of the yeasts used. Therefore, we conclude that the addition of the probiotic culture did not affect the quality of the cheese; however, new in vitro and, especially, in vivo studies are necessary to expand the knowledge about the influence of these yeasts on the functional characteristics of Canastra cheese.

Author Contributions: Conceptualization, A.d.A.D.S., D.G.T., R.P.A. and W.F.D.; methodology, A.d.A.D.S., D.G.T., R.P.A., T.L.d.S. and W.F.D.; software, A.d.A.D.S. and D.G.T.; formal analysis, A.d.A.D.S., D.G.T., R.P.A., T.L.d.S. and W.F.D.; resources, W.F.D.; writing—original draft preparation, A.d.A.D.S.; writing—review and editing, A.d.A.D.S. and W.F.D.; supervision, W.F.D.; project administration, W.F.D.; funding acquisition, W.F.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais—FAPEMIG (FAPEMIG).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Electron Microscopy and Ultrastructural Analysis Laboratory—LME Core of the Federal University of Lavras for their assistance during the microscopy work. Furthermore, the authors would like to thank the Central of Analysis and Chemical Prospecting of the Federal University of Lavras, and Finep, Fapemig, CNPq e Capes for supplying the equipment and technical support for experiments involving chromatographic analyzes.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

5. References

1. Andrade, R.P.; Melo, C.N.; Genisheva, Z.; Schwan, R.F.; Duarte, W.F. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. *Food Res. Int.* **2017**, *91*, 72–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Campos, G.Z.; Lacorte, G.A.; Jurkiewicz, C.; Hoffmann, C.; Landgraf, M.; Gombossy De Melo Franco, B.D.; Pinto, U.M. Microbiological characteristics of Canastra cheese during manufacturing and ripening. *Food Control* **2021**, *121*, 107598. [[CrossRef](#)]
3. Caldeira, L.A.; Valente, G.L.C.; Barbosa, C.D.; Braga, D.E.; Monção, F.P.; Fonseca, L.M.; Souza, M.R.; Gloria, M.B.A. Profile of lactic acid bacteria (MALDI-TOF-MS) and physicochemical and microbiological characteristics of the raw milk and fresh artisanal cheese from Serra Geral, Minas Gerais, Brazil. *Food Res. Int.* **2024**, *176*, 113831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Marcelão, C.V.P.; Souza, M.C.; Silva, J.J.; Couto, F.A.; Lacorte, G.A.; Pinto, U.M.; Maffei, J.T.; Zacarchenco, P.B.; Iamanaka, B.T.; Taniwaki, M.H. Unveiling ochratoxin A and ochratoxigenic fungi in Brazilian artisanal cheeses: Insights from production to consumption. *Food Res. Int.* **2024**, *183*, 114214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Filho, M.J.; Klein, B.; Wagner, R.; Godoy, H.T. Key aroma compounds of Canastra cheese: HS-SPME optimization assisted by olfactometry and chemometrics. *Food Res. Int.* **2021**, *150*, 110788. [[CrossRef](#)]
6. Merchán, A.V.; Ruiz-Moyano, S.; Vázquez Hernández, M.; Benito, M.J.; Aranda, E.; Rodríguez, A.; Martín, A. Characterization of autochthonal yeasts isolated from spanish soft raw ewe milk protected designation of origin cheeses for technological application. *J. Dairy Sci.* **2022**, *105*, 2931–2947. [[CrossRef](#)]
7. Wang, Y.; Wang, Y.; Qiu, S.; Wang, B.; Zeng, H. Metagenomic and flavoromic profiling reveals the correlation between the microorganisms and volatile flavor compounds in monascus-fermented cheese. *Food Res. Int.* **2024**, *188*, 114483. [[CrossRef](#)]
8. Lamarche, A.; Lessard, M.-H.; Viel, C.; Turgeon, S.L.; St-Gelais, D.; Labrie, S. Quantitative PCR reveals the frequency and distribution of 3 indigenous yeast species across a range of specialty cheeses. *J. Dairy Sci.* **2022**, *105*, 8677–8687. [[CrossRef](#)]
9. Yildiz, M.; Turgut, T.; Cetin, B.; Kesmen, Z. Microbiological characteristics and identification of yeast microbiota of traditional mouldy civil cheese. *Int. Dairy J.* **2021**, *116*, 104955. [[CrossRef](#)]
10. Andrade, R.P.; Oliveira, D.R.; Lopes, A.C.A.; De Abreu, L.R.; Duarte, W.F. Survival of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii* to simulated gastrointestinal conditions and their use as single and mixed inoculum for cheese production. *Food Res. Int.* **2019**, *125*, 108620. [[CrossRef](#)]
11. Andrade, G.C.; Andrade, R.P.; Oliveira, D.R.; Quintanilha, M.F.; Martins, F.S.; Duarte, W.F. *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii*: Probiotic characterization, anti-*Salmonella* effect, and impact on cheese quality. *Food Sci. Technol.* **2021**, *151*, 112240. [[CrossRef](#)]
12. Kamtekar, S.; Keer, V.; Patil, V. Estimation of phenolic content, flavonoid content, antioxidant and alpha amylase inhibitory activity of marketed polyherbal formulation. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2014**, *9*, 61–65.
13. Gil, K.A.; Jerkovic', I.; Marijanovic', Z.; Manca, M.L.; Caddeo, C.; Tuberoso, C.I.G. Evaluation of an innovative sheep cheese with antioxidant activity enriched with different thyme essential oil lecithin liposomes. *Food Sci. Technol.* **2022**, *154*, 112808. [[CrossRef](#)]
14. Valle, J.L.E.D.; Campos, S.D.D.S.; Yotsunagi, K.; Souza, G.D. Influência do teor de gordura nas propriedades funcionais do queijo tipo mozzarella. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2004**, *24*, 669–673. [[CrossRef](#)]
15. Menezes, H.C.; Paulo, B.P.; Paiva, M.J.N.; Cardeal, Z.L. A simple and quick method for the determination of pesticides in environmental water by HF-LPME-GC/MS. *J. Anal. Methods Chem.* **2016**, *2016*, 7058709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kothe, C.I.; Mohellibi, N.; Renault, P. Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics. *Food Res. Int.* **2022**, *157*, 111265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Centeno, J.A.; Lorenzo, J.M.; Carballo, J. Effects of autochthonous *Kluyveromyces lactis* and commercial *Enterococcus faecium* adjunct cultures on the volatile profile and the sensory characteristics of short-ripened acid-curd cebreiro cheese. *Food Microbiol.* **2022**, *108*, 104101. [[CrossRef](#)]
18. Freitas, I.; Pinon, N.; Maubois, J.; Lortal, S.; Thierry, A. The addition of a cocktail of yeast species to cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *129*, 37–42. [[CrossRef](#)]
19. Li, S.; Zhang, Y.; Yin, P.; Zhang, K.; Liu, Y.; Gao, Y.; Li, Y.; Wang, T.; Lu, S.; Li, B. Probiotic potential of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing yeast and its influence on the quality of cheese. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 6559–6576. [[CrossRef](#)]

20. Souza, C.H.B.; Saad, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* la-5 added solely or in co- culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of minas fresh cheese during storage. *Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 633–640. [[CrossRef](#)]
21. Garde, S.; Ávila, M.; Gaya, P.; Arias, R.; Nuñez, M. Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. *Int. Dairy J.* **2012**, *25*, 87–91. [[CrossRef](#)]
22. Güler, Z. Profiles of organic acid and volatile compounds in acid-type cheeses containing herbs and spices (surk cheese). *Int. J. Food Prop.* **2014**, *17*, 1379–1392. [[CrossRef](#)]
23. Giménez, P.; Peralta, G.H.; Batistela, M.E.; Cuffia, F.; Ale, E.C.; Wolf, I.V.; Perotti, M.C.; Hynes, E.R.; Bergamini, C.V. Impact of the use of skim milk powder and adjunct cultures on the levels of organic acid and carbohydrates, volatile compounds and sensory properties of cremoso cheese. *Int. Dairy J.* **2023**, *140*, 105594. [[CrossRef](#)]
24. Matera, J.; Luna, A.S.; Batista, D.B.; Pimentel, T.C.; Moraes, J.; Kamimura, B.A.; Ferreira, M.V.S.; Silva, H.L.A.; Mathias, S.P.; Esmerino, E.A.; et al. Brazilian cheeses: A survey covering physicochemical characteristics, mineral content, fatty acid profile and volatile compounds. *Food Res. Int.* **2018**, *108*, 18–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Durães, F.; Resende, D.I.S.P.; Palmeira, A.; Szemerédi, N.; Pinto, M.M.M.; Spengler, G.; Sousa, E. Xanthonic active against multidrug resistance and virulence mechanisms of bacteria. *Antibiotics* **2021**, *10*, 600. [[CrossRef](#)]
26. Ruiz-Barba, J.L.; Cortés-Delgado, A.; Sánchez, A.H.; López-López, A.; Montañó, A. Impact of selected wild yeasts starters on the volatile and phenolic contents of gordal, manzanilla and hojiblanca naturally fermented green olives. *Food Sci. Technol.* **2024**, *195*, 115811. [[CrossRef](#)]
27. Simonetti, A.; Perna, A.; Grassi, G.; Gambacorta, E. Antioxidant activity of different cheese- honey combinations before and after in vitro gastrointestinal digestion. *Food Sci. Technol.* **2020**, *131*, 109725. [[CrossRef](#)]
28. Abadía-García, L.; Cardador, A.; Martín Del Campo, S.T.; Arvizu, S.M.; Castaño-Tostado, E.; Regalado-González, C.; García-Almendarez, B.; Amaya-Llano, S.L. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *Int. Dairy J.* **2013**, *33*, 191–197. [[CrossRef](#)]
29. Mushtaq, M.; Gani, A.; Masoodi, F.A. Himalayan Cheese (Kalari/Kradi) Fermented with different probiotic strains: In vitro investigation of nutraceutical properties. *Food Sci. Technol.* **2019**, *104*, 53–60. [[CrossRef](#)]
30. Gil-Rodríguez, A.M.; Carrascosa, A.V.; Requena, T. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 1156–1162. [[CrossRef](#)]
31. Amaretti, A.; Di Nunzio, M.; Pompei, A.; Raimondi, S.; Rossi, M.; Bordoni, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: In vitro and in vivo activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 809–817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tang, Q.; Huang, G.; Zhao, F.; Zhou, L.; Huang, S.; Li, H. The antioxidant activities of six (1 → 3)-β-d-glucan derivatives prepared from yeast cell wall. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *98*, 216–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Oluk, A.C. Effect of production variations on the composition, textural and microstructural properties, and volatile compounds of turkish white cheese during ripening. *Food Sci. Technol.* **2023**, *173*, 114348. [[CrossRef](#)]
34. Fritzen-Freire, C.B.; Müller, C.M.O.; Laurindo, J.B.; Prudêncio, E.S. The influence of bifidobacterium bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of minas frescal cheese. *J. Food Eng.* **2010**, *96*, 621–627. [[CrossRef](#)]
35. Moynihan, A.C.; Govindasamy-Lucey, S.; Molitor, M.; Jaeggi, J.J.; Johnson, M.E.; McSweeney, P.L.H.; Lucey, J.A. Effect of standardizing the lactose content of cheese milk on the properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* **2016**, *10*, 7791–7802. [[CrossRef](#)]
36. Fröhlich-Wyder, M.; Arias-Roth, E.; Jakob, E. Cheese yeasts. *Yeast* **2019**, *36*, 129–141. [[CrossRef](#)]
37. Guzman-Hernandez, R.; Contreras-Rodriguez, A.; Hernandez-Velez, R.; Perez-Martinez, I.; Lopez-Merino, A.; Zaidi, M.B.; Estrada-Garcia, T. mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella* spp., non-0157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. Coli* strains: A public health risk. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *237*, 10–16. [[CrossRef](#)]
38. Murtaza, M.A.; Anees-Ur-Rehman, M.; Hafiz, I.; Ameer, K.; Celik, O.F. Effects of probiotic adjuncts on physicochemical properties, organic acids content, and proteolysis in cheese prepared from buffalo milk. *J. Food Process. Preserv.* **2022**, *46*, e16385. [[CrossRef](#)]
39. Kondyli, E.; Pappa, E.C.; Bosnea, L.; Vlachou, A.-M.; Malamou, E. Chemical, textural and organoleptic characteristics of greek semihard goat cheese made with different starter cultures during ripening and storage. *Int. Dairy J.* **2023**, *145*, 105717. [[CrossRef](#)]
40. Delgado, F.J.; González-Crespo, J.; Cava, R.; Ramírez, R. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1156–1163. [[CrossRef](#)]
41. Jia, R.; Zhang, F.; Song, Y.; Lou, Y.; Zhao, A.; Liu, Y.; Peng, H.; Hui, Y.; Ren, R.; Wang, B. Physicochemical and textural characteristics and volatile compounds of semihard goat cheese as affected by starter cultures. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 270–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Li, Y.; Wang, T.; Li, S.; Yin, P.; Sheng, H.; Wang, T.; Zhang, Y.; Zhang, K.; Wang, Q.; Lu, S.; et al. Influence of gaba-producing yeasts on cheese quality, gaba content, and the volatile. *Food Sci. Technol.* **2022**, *154*, 112766. [[CrossRef](#)]

43. Curioni, P.M.G.; Bosset, J.O. Key Odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 959–984. [[CrossRef](#)]
44. Uzkuç, H.; Karagül Yüceer, Y. Effects of heat treatment, plant coagulant, and starter culture on sensory characteristics and volatile compounds of goat cheese. *Int. Dairy J.* **2023**, *140*, 105588. [[CrossRef](#)]
45. Say, D. Physicochemical composition, nitrogen fraction and volatile profiles of goat cheese made with artisanal liquid coagulant. *J. Food Sci. Technol.* **2022**, *59*, 2469–2478. [[CrossRef](#)]
46. Sulejmani, E.; Sahingil, D.; Hayaloglu, A.A. A comparative study of compositional, antioxidant capacity, ace-inhibition activity, rp-hplc peptide profile and volatile compounds of herbal artisanal cheeses. *Int. Dairy J.* **2020**, *111*, 104837. [[CrossRef](#)]
47. Ianni, A.; Bennato, F.; Martino, C.; Grotta, L.; Martino, G. Volatile flavor compounds in cheese as affected by ruminant diet. *Molecules* **2020**, *25*, 461. [[CrossRef](#)]
48. Gao, P.; Zhang, W.; Wei, M.; Chen, B.; Zhu, H.; Xie, N.; Pang, X.; Marie-Laure, F.; Zhang, S.; Lv, J. Analysis of the non-volatile components and volatile compounds of hydrolysates derived from unmaturred cheese curd hydrolysis by different enzymes. *Food Sci. Technol.* **2022**, *168*, 113896. [[CrossRef](#)]
49. Ricci, M.; Gasperi, F.; Betta, E.; Menghi, L.; Endrizzi, I.; Clicerì, D.; Franceschi, P.; Aprea, E. Multivariate data analysis strategy to monitor trentingrana cheese real-scale production through volatile organic compounds profiling. *Food Sci. Technol.* **2023**, *173*, 114364. [[CrossRef](#)]
50. Santamarina-García, G.; Amores, G.; Hernández, I.; Morán, L.; Barrón, L.J.R.; Virto, M. Relationship between the dynamics of volatile aroma compounds and microbial succession during the ripening of raw ewe milk-derived idiazabal cheese. *Curr. Res. Food Sci.* **2023**, *6*, 100425. [[CrossRef](#)]
51. Collins, Y.F.; McSweeney, P.L.H.; Wilkinson, M.G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *Int. Dairy J.* **2003**, *13*, 841–866. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Artigo 2

Efeito protetivo de um queijo fermentado com *Kluyveromyces lactis* B10 em camundongos infectados por *Salmonella* subsp. *entérica* sorovar Typhimurium

Formatado de acordo com as normas NBR 6062 (ABNT 2018)

RESUMO

Atualmente há um grande interesse socioeconômico no desenvolvimento de produtos lácteos contendo probióticos pois estes oferecem uma alternativa na prevenção ou terapia de diversas doenças. Na maioria das vezes os produtos lácteos apresentam sucesso na entrega dos probióticos devido ao seu efeito tamponante e concentração de gorduras que garantem a viabilidade do microrganismo. No presente trabalho, um queijo probiótico contendo a levedura *Kluyveromyces lactis* B10 foi desenvolvido e testado em camundongos desafiados com *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium. Como controle negativo foi utilizada solução salina enquanto o queijo probiótico foi utilizado como controle positivo. Ambos foram administrados oralmente a camundongos antes e durante o desafio com *S. Typhimurium*. Os resultados mostraram que os camundongos tratados com *S. Typhimurium* apresentaram maior taxa de mortalidade e perda de peso. Em contrapartida, os animais infectados com *S. Typhimurium* e tratados com o queijo probiótico exibiram redução nesses parâmetros. Contagens elevadas de leveduras foram detectadas nas fezes dos camundongos que receberam o queijo probiótico, o que pode ter contribuído para a redução na permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, para a redução da translocação para o baço e fígado, conforme observado nesses animais. Além disso, a contagem de *Salmonella* e enterobactérias foi menor no grupo que recebeu o queijo probiótico em comparação com o grupo não tratado, indicando um possível efeito antagônico ou ligação da *Salmonella* na parede celular da levedura. A administração do queijo probiótico também reduziu os níveis de IgA intestinal. Os ensaios de avaliação da mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) do fígado e íleo indicaram a intensa infiltração de células pró inflamatórias para esses tecidos em animais infectados com *S. Typhimurium*. Entretanto, essa infiltração foi menor no grupo que recebeu o queijo, indicando uma modulação da resposta inflamatória. Os testes histopatológicos confirmaram os resultados e mostraram a redução das lesões hepáticas e intestinais quando os animais foram tratados com o queijo probiótico. Portanto, concluímos que o queijo produzido com a levedura *K. lactis* B10 manteve as propriedades probióticas dessa levedura, contribuindo com a sobrevivência e proteção sistêmica, além de facilitar a entrega viável do microrganismo probiótico e agregar valor a um produto de amplo consumo e interesse econômico.

Palavras chave: probióticos, leveduras, produtos lácteos

1.0 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a febre tifóide representa um grande problema de saúde pública, sendo responsável pelo aparecimento de, aproximadamente, 27 milhões de casos anuais, dos quais cerca de 200.000 resultam em mortes somente em áreas endêmicas (Fadare *et al.*, 2022). No Brasil, entre 2014 e 2023, foram registrados 722 casos com média anual de 72 casos, aproximadamente (Oliveira *et al.*, 2024). A febre tifóide é causada pela bactéria *Salmonella* Typhi que geralmente é adquirida por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados, alcançando o trato digestório e ocasionando diversos problemas. Entre seus mecanismos de infecção, a *S. Typhimurium*

possui a capacidade de translocar-se do intestino para o fígado através do sistema porta hepático podendo provocar lesões também no baço, íleo e rim (Cordeiro *et al.* 2019).

Os principais mecanismos de patogenicidade de *S. Typhimurium* envolvem o sistema de secreção tipo 3 (T3SS), ilha de patogenicidade de *Salmonella* (SPIs) e os plasmídeos de virulência. No mecanismo T3SS, a bactéria libera proteínas que interferem nos componentes celulares como citoesqueleto e, conseqüentemente, alteram funções celulares como o transporte e sinalização celular. Uma vez inativados, esses mecanismos não podem impedir a infecção através do sistema imune e ocorre a colonização do intestino por *S. Typhimurium* (Geng *et al.*, 2023). Além disso, um grupo de genes relacionados com a produção de citocinas pró inflamatórias são ativados em resposta à indução mediada pela *S. Typhimurium*, o que resulta em fortes dores intestinais, febre, cólicas, náuseas e vômitos, podendo em alguns casos ser fatal (Martins *et al.*, 2013). Os antibióticos costumam ser uma alternativa terapêutica, no entanto, não podem ser utilizados como agentes preventivos. Além disso, o surgimento de cepas cada vez mais resistentes tem causado ineficácia para alguns tratamentos (Fadare *et al.*, 2022). Por outro lado, os alimentos funcionais tem sido alvo de amplo estudo como alternativa para combater ou prevenir diversas doenças que acometem o sistema gastrointestinal (Fadare *et al.*, 2022).

Os alimentos funcionais são descritos como alimentos naturais ou processados que quando consumidos regularmente promovem benefícios à saúde, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças de modo geral, mas principalmente doenças gastrointestinais através da modulação do sistema imunológico. Esses mecanismos estão relacionados à presença de microrganismos probióticos adicionados a esses alimentos (Fadare *et al.*, 2022). Os microrganismos probióticos apresentam diversos mecanismos de ação por meio dos quais contribuem para o bom funcionamento do sistema gastrointestinal, entre eles o suporte contra adesão e colonização de patógenos ao epitélio intestinal e produção de metabólitos com funções imunomoduladoras (Cordeiro *et al.*, 2019). Essas funções são desempenhadas devido à capacidade dos probióticos de liberação de biomoléculas como exopolissacarídeos, citocinas anti-inflamatórias, vitaminas, ácidos graxos de cadeia curta, aminoácidos, peptídeos e bacteriocinas com atividades bioativas que coordenam direta ou indiretamente os mais diversos sistemas do corpo humano (Joshi *et al.*, 2024).

Produtos lácteos principalmente leite fermentado, iogurte e queijos são matrizes frequentemente utilizadas para o transporte de probióticos devido à sua ampla aceitação e seu perfil nutricional adequado para o crescimento e desenvolvimento de diversos probióticos. O

queijo representa uma matriz de entrega promissora devido à disponibilidade de nutrientes, concentração de gordura e proteínas, bem como sua capacidade tamponante. Esses componentes são uma alternativa de proteção ao probiótico, reduzindo a exposição direta às condições gastrointestinais adversas (Fonseca *et al.*, 2024).

O principal desafio da adição de microrganismos probióticos em queijos é a capacidade do microrganismo de tolerância a concentrações elevadas de sal, baixo pH e baixa atividade de água, fatores intrínsecos ao processo de maturação do queijo. Entretanto, pesquisas anteriores desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa com *K. lactis* B10, demonstraram que essa levedura possui capacidade de fermentar a lactose e o soro de queijo. Além disso, foram observadas altas taxas de auto agregação e de sobrevivência dessas cepas após a passagem pelo TGI simulado. A atividade de beta galactosidase e tolerância a elevadas concentrações de sal também foram avaliados com resultados satisfatórios (Andrade *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2019). Com relação à sua atividade *in vivo*, posteriormente foi demonstrado que a levedura *K. lactis* B10, administrada pelo método de gavagem a camundongos, foi capaz de resistir às condições gastrointestinais mantendo uma população de 10^8 UFC observadas nas fezes dos animais. Além disso, *K. lactis* B10 foi capaz de manter a sobrevivência dos camundongos até 24 dias após a infecção, com uma taxa de mortalidade de apenas 10% ao final da análise, enquanto no tratamento controle a taxa de mortalidade foi de 50% (Andrade *et al.*, 2021). Esses ensaios, no entanto, não puderam fornecer respostas sobre o efeito protetivo da levedura quando administrada via um alimento. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor da levedura *K. lactis* B10 quando veiculada a um queijo, contra os efeitos adversos causados por *S. Typhimurium* em camundongos.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

A levedura utilizada neste trabalho foi previamente isolada do processo de produção do queijo Canastra e armazenada a -80 °C em glicerol 40% (Andrade *et al.*, 2017). A reativação da levedura *K. lactis* B10 foi feita em YEPG (1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 2% de dextrose) e incubada a 28 °C por 24h. Posteriormente, foi feita a multiplicação até a obtenção de uma população com log de 10^8 células/mL. Após a obtenção da população desejada, a levedura foi centrifugada a 10.000 g em uma temperatura de 4 °C por 7 min e armazenada em água peptonada a 0,1% até sua utilização.

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14.028 utilizada neste trabalho é de origem humana e pertence ao acervo de culturas do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, sendo mantida a -80 °C, em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Sparks, EUA) suplementado com 20% de glicerol.

2.2 Camundongos

Todos os ensaios foram realizados conforme descrito por Oliveira *et al.* (2023) com algumas modificações. Foram utilizados camundongos BALB/c com aproximadamente três a quatro semanas de idade, de ambos os sexos. Esses animais foram mantidos em microisoladores de polipropileno (Alesco, Monte Mor, Brasil) e posteriormente colocados em rack ventilada (Alesco), com iluminação (ciclo claro-escuro – 12 horas), umidade (50-60%) e temperatura (22 ± 1 °C) controladas. Os animais receberam água estéril e dieta comercial (Nuvital, Curitiba, Brasil) ad libitum. Os procedimentos realizados estavam em concordância com as Normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, disponível em: <http://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/index.html>). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG, protocolo n°:175/2024).

2.3 Produção do Queijo

Para a fabricação dos queijos, um volume total de 20 litros de leite foi adicionado a um recipiente de aço inoxidável previamente sanitizado. O leite foi pasteurizado a 65 °C e, posteriormente, foi resfriado até a temperatura de 37 °C. A coagulação do leite foi realizada com coalho comercial (HA-LA® Chr. Hansen, Lavras, Brasil) na concentração de 1 mL/L (75 IMCU/mL). Em seguida, o inóculo contendo a levedura foi adicionado ao recipiente onde foi realizada a homogeneização por 5 minutos seguida do repouso por 30 minutos. A coalhada obtida foi cortada com um cortador de aço inoxidável e homogeneizada por 5 minutos. Em seguida, o soro foi retirado e a massa de queijo adicionada aos moldes. Após a enformagem os queijos foram salgados via salga seca. Após 24 horas foram retirados das formas e armazenados em câmaras de maturação em temperatura ambiente, sendo virados todos os dias para garantir a uniformidade do produto.

Os queijos foram maturados ao longo de 28 dias sendo retiradas amostras a cada 7 dias para a realização do plaqueamento para determinar a população de leveduras.

2.4 Procedimentos de tratamento e infecção

Os animais receberam 3 gramas de queijo por dia, durante 28 dias. O desafio com *Salmonella* iniciou-se após o décimo dia de alimentação dos animais. A bactéria *S. Typhimurium* foi cultivada em caldo BHI (Difco) por 18 horas a 37 °C, sem agitação. O inóculo de 10⁵ UFC de bactérias patogênicas por animal foi obtido por diluições decimais seriadas da cultura ativa em solução salina estéril e administrado por gavagem intragástrica.

2.5 Design experimental

Para determinar a porcentagem de sobrevivência e do peso corporal, os animais foram divididos em 2 grupos (10 camundongos/grupo): tratados com solução salina e infectados com *S. Typhimurium* (grupo 1) e infectados com *S. Typhimurium* e tratados com o queijo probiótico (grupo 2). Para as demais análises os animais foram divididos em 4 grupos (10 camundongos/grupo): tratados com solução salina estéril (grupo 1), tratados com o queijo probiótico (grupo 2), infectados com *S. Typhimurium* (grupo 3), e infectados com *S. Typhimurium* e tratados com o queijo probiótico (grupo 4). O tratamento diário com solução salina ou queijo foi aplicado durante nove dias antes do desafio com *S. Typhimurium* ATCC 14.028 e mantidos até o final de cada experimento (28 dias após a infecção).

2.6 Análises

2.6.1 Sobrevivência e peso corporal

Os resultados de sobrevivência e peso corporal dos animais tratados ou não com queijo contendo a levedura e desafiados com *S. Typhimurium* foram registrados até o 28º dia após a infecção. Os resultados foram expressos como a porcentagem de animais que sobreviveram à infecção e a porcentagem de evolução ponderal em relação ao peso corporal inicial, respectivamente.

2.6.2 Permeabilidade Intestinal

Para determinação da permeabilidade intestinal, os animais receberam por via oral 0,1 mL de ácido dietilenotriaminopentaacético marcado com 17,8 MBq de tecnécio-99m (99m Tc-DTPA). Aproximadamente quatro horas após a gavagem, os animais foram anestesiados e foram coletados 500 µL de sangue para determinação da radioatividade utilizando contador gama automático (ANSR-Abbott, Chicago, IL, EUA). Os resultados foram apresentados como a porcentagem da dose de radiação no sangue e esta foi calculada usando a equação: % dose/g = (cpm de sangue/cpm do padrão) × 100, onde cpm representa as contagens de radioatividade por minuto (Oliveira et al., 2023; Campos *et al.*, 2024).

2.6.3 Translocação

Após a eutanásia, pedaços do fígado e o baço foram removidos assepticamente, pesados e macerados em PBS estéril. Diluições seriadas foram preparadas e 0,1 mL de cada diluição foram plaqueados em Ágar MacConkey (Difco). As colônias (apenas lactose negativas) foram contadas após 24 h de incubação a 37 °C. O crescimento bacteriano foi expresso como log₁₀ UFC / g de órgão (Oliveira *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2024).

2.6.4 Microbiota intestinal

Para avaliar a população fecal de leveduras totais, imediatamente antes da eutanásia, fezes recém-evacuadas foram pesadas, homogeneizadas e submetidas a diluições decimais seriadas em tampão fosfato salina (PBS — 0,4 M NaCl e 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,2). Cem microlitros das diluições foram semeados, em triplicata, em Ágar Sabouraud Dextrose (Difco) suplementado com 100 mg/L de cloranfenicol e incubados a 28 °C por 48 h para contagem de levedura, que foi expressa como log₁₀ UFC/g de fezes. Para a contagem de enterobactérias totais, as amostras foram cultivadas em ágar MacConkey (Difco, Sparks, EUA). As placas foram incubadas em condições aeróbicas a 37 °C por 24 h. As contagens bacterianas foram expressas como log₁₀ UFC por grama de fezes. Por fim, para confirmar e determinar a contagem de *S. Typhimurium*, as amostras foram cultivadas em meio Ágar Salmonella-Shigella e as placas foram mantidas a 37 °C por 24 h (Oliveira *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2024).

2.6.5 Quantificação do acúmulo de neutrófilos

A extensão do recrutamento de neutrófilos no íleo e nos tecidos hepáticos foi avaliada indiretamente através da medição da atividade da mieloperoxidase (MPO). Os tecidos foram homogeneizados, separadamente, com 1,9 mL de tampão (NaCl 0,1 M, NaH₂PO₄ 0,02 M, Na₂EDTA 0,015 M, pH 4,7) e centrifugados a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido a lise hipotônica. Após uma nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensão em tampão NaH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB; Sigma-Aldrich) em PBS. Após três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, finalmente as amostras foram centrifugadas a 4 °C nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi utilizado em um ensaio enzimático para atividade de MPO medindo a alteração na absorvância a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich). Os resultados foram

apresentados como unidades arbitrárias em relação à atividade de MPO induzida por caseína em neutrófilos peritoneais murinos (Oliveira *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2024).

2.6.6 Quantificação do acúmulo de eosinófilos

O acúmulo de eosinófilos no fígado e no íleo foi quantificado pela determinação da atividade de EPO. Para isso, 100 mg de tecido foram pesados, homogeneizados em 1,9 mL de PBS e centrifugados a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos lisados. As amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 1,9 mL de HTAB a 0,5% em PBS. As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido e centrifugadas a 4°C nas mesmas condições. O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático. Resumidamente, 10 mg de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 5,5 mL de água destilada e depois 1,5 mL desta solução foram adicionados a 8,5 mL de tampão Tris/HCl (pH 8,0), seguido pela adição de 7,5 mL de H₂O₂. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de solução de substrato e 50 µL de cada amostra. A reação foi interrompida com 50 µL de 1 M H₂SO₄, após 30 minutos, e a absorbância lida em 492 nm. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (Oliveira *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2024).

2.6.7 Determinação de IgA

Os níveis de imunoglobulinas tipo A secretadas (sIgA) no conteúdo intestinal de camundongos foram analisados pelo método ELISA conforme descrito por Martins *et al* (2011). Resumidamente, o intestino delgado dos camundongos foi removido através de cortes nas junções gastroduodenal e ileocecal e o líquido intestinal coletado, pesado e diluído na proporção de 500 mg de conteúdo intestinal para 2,0 mL de PBS, contendo 1% (v/v) de inibidor de protease (1 µM de aprotinina, 25 µM de leupeptina, 1 µM de pepstatina e 1 mM de PMSF). O material foi centrifugado a 12.000 g por 30 min a 4 °C, o sobrenadante coletado e armazenado a -20 °C. Para medir a sIgA total, as placas de ELISA foram revestidas no dia anterior ao teste com anticorpo de captura anti-IgA (M-8769, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Amostras de fluido intestinal foram diluídas 1:100 em PBS-Tween e a detecção foi realizada com anticorpos anti-IgA de camundongos conjugados com peroxidase (A-4789, Sigma-Aldrich). A concentração total de sIgA foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology, Birmingham, EUA). As leituras foram feitas a 492 nm em um leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments Inc., Winooski, EUA) e a

concentração de sIgA determinada como $\mu\text{g/g}$ de fluido intestinal (Oliveira *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2024).

2.6.8 Histopatologia e Morfometria

Para a análise histopatológica, foram analisados 8 animais por grupo. Para isso, foram coletadas amostras de fígado e íleo dos animais após eutanásia. Os lobos hepáticos foram seccionados longitudinalmente seguidos de fixação em formaldeído a 10% por pelo menos 12 horas. O íleo foi separado do mesentério, lavado em PBS e estendido com a serosa em contato com papel filtro. Todo o conteúdo fecal foi removido sem danificar a mucosa e os segmentos foram transferidos para solução de Bouin contendo ácido acético glacial 2% por 10 min. O íleo pré-fixado foi enrolado em espiral com a mucosa voltada para dentro formando um rolo da porção distal até a extremidade proximal, sendo posteriormente submetido ao processo de inclusão em parafina, corte, coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e montagem dos slides. Os cortes histológicos do fígado e do íleo foram codificados e examinados sequencialmente pelo mesmo patologista que desconhecia as condições experimentais de cada grupo.

As lâminas coradas de fígado e íleo foram fotografadas usando um microscópio óptico de luz direta Olympus BX51 equipado com o software Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, Bethesda, EUA). Para o fígado, foram capturadas imagens das regiões mais afetadas pelo infiltrado inflamatório com objetiva de 20 \times . Todas as capturas foram feitas com resolução de 1392 \times 1040 pixels e transferidas por meio de uma câmera de vídeo Cool SNAP-Proof Color (Media Cybernetics) para um sistema de vídeo acoplado a um computador. A análise quantitativa da celularidade foi medida utilizando o programa ImageJ (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, EUA — disponível online em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Para isso, as lâminas coradas com H&E foram medidas automaticamente em termos de área de tecido e quantificadas em termos do número de núcleos celulares presentes por área, através da varredura das imagens através do programa, excluindo assim áreas que não continham tecido. O resultado foi expresso como o número de núcleos celulares por área analisada em micrômetros (Oliveira *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2024).

2.6.9 Análise Estatística

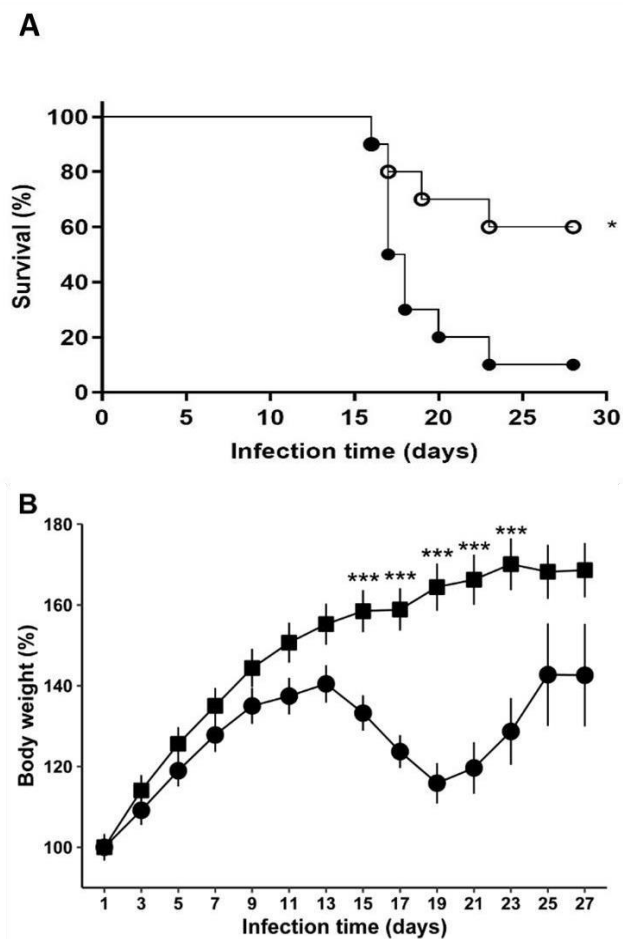
As variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação de médias. A curva de sobrevivência foi analisada pelo

teste Log-rank (Mantel-Cox). A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Valores com nível de significância inferior a 5% foram considerados diferentes estatisticamente (Oliveira *et al.*, 2023).

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de confirmar o efeito protetivo da levedura *K. lactis* B10 verificado no trabalho de Andrade *et al.* (2021), esta levedura foi agora veiculada no queijo. A Figura 1A mostra que o queijo probiótico foi capaz de reduzir a mortalidade causada pela *Salmonella* quando comparado ao grupo que não recebeu o queijo. O queijo probiótico manteve a sobrevivência dos camundongos por até 4 dias após a infecção e a taxa de sobrevivência desses animais foi de 60%, enquanto o grupo que não recebeu o queijo apresentou sobrevivência de apenas 10% ao final do desafio. Além disso, o desafio com *S. Typhimurium* causou perda de peso significativa nos animais. A presença da levedura, no entanto, preveniu a perda de peso conforme demonstrado na Figura 1B.

Figura 1: Sobrevivência e evolução do peso corporal de camundongos infectados com *S. Typhimurium*, tratados e não tratados com queijo probiótico.



Legenda: Sobrevivência (A) e evolução do peso corporal (B) de camundongos. Em A: animais tratados com solução salina estéril e infectados com *Salmonella* (●) e tratados com queijo probiótico e infectados com *Salmonella* (○). Em B: animais tratados com solução salina estéril e infectados com *Salmonella* (●) e tratados com queijo probiótico e infectados com *Salmonella* (■). *Asterisco indica uma diferença significativa entre o grupo tratado com o queijo probiótico e o grupo não tratado pelo teste de Sobrevivência Log-Rank ($P < 0,01$). (N=10)

Fonte: Do autor (2025).

De acordo com dados divulgados pela OMS, *Salmonella* causa aproximadamente 1,3 bilhões de infecções anuais com consequências que podem levar a óbito (Kurtz *et al.*, 2017). No entanto, diferentemente do que ocorre em humanos, *Salmonella Typhi* não possui mecanismos de virulência contra a maioria dos animais, incluindo camundongos. *Salmonella Typhimurium*, no entanto, desencadeia em camundongos efeitos adversos que se assemelham muito aos efeitos causados por *S. Typhi* em humanos. Dessa forma, a condução experimental de infecção de camundongos por *S. Typhimurium* serve como modelo amplamente aceito para elucidar os mecanismos de infecção e ajudar a solucionar um problema da febre tifoide que acomete extensivamente a população (Martins *et al.*, 2013; Acurcio *et al.*, 2017).

Pouco tempo após a ingestão, *S. Typhimurium* coloniza a porção terminal do intestino delgado, o íleo, provocando em menos de 24 horas sintomas de gastroenterite. A inflamação desencadeada por *S. Typhimurium* gera espécies reativas de oxigênio que se combinam com compostos de enxofre e formam o tetrionato que pode ser utilizado por esse patógeno comoceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbica. A microbiota nativa, por outro lado, utiliza a fermentação como forma de obtenção de energia não sendo capaz de utilizar o tetrionato (Gill *et al.*, 2012). Além disso, alguns trabalhos demonstraram que os produtos da fermentação da microbiota comensal, como o 1,2 propanodiol e carboidratos derivados do muco intestinal como fucose e ácido siálico podem ser utilizados por *Salmonella*, mecanismos que ajudam a alimentar a proliferação do patógeno durante a infecção em detrimento da microbiota benéfica (Wotzka *et al.* 2017). Portanto, a redução da barreira de microrganismos benéficos, permite que *Salmonella* comprometa a integridade da barreira intestinal levando a translocação da bactéria para órgãos como o fígado e/ou absorção de endotoxinas na corrente sanguínea podendo causar bacteremia ou endotoxemia, que podem evoluir para sepse e morte (Huang *et al.*, 2010). Em nosso estudo, observamos a redução da mortalidade quando os camundongos foram tratados com o queijo probiótico, contrariamente ao que foi observado no grupo que não recebeu o queijo (Figura 1A). Esses resultados indicam que o queijo probiótico exerceu efeito sistêmico de proteção aos tecidos dos animais.

Embora no presente trabalho não haja análises relacionadas aos mecanismos pelos quais o queijo atenua os efeitos causados por *S. Typhimurium*, reduzindo, conseqüentemente, a taxa de mortalidade, alguns autores se propuseram a elucidar tais mecanismos, especialmente com leveduras não *Saccharomyces*. Alguns desses mecanismos incluem capacidade de algumas leveduras de adesão à célula patogênica impedindo sua ligação e invasão ao epitélio do hospedeiro com conseqüente injúria ao tecido e danos a outros órgãos (Tiago *et al.*, 2012). Além disso, também foram propostos mecanismos envolvidos com a liberação de antimicrobianos, competição por nutrientes e modulação das rotas metabólicas de sinalização que estão envolvidas com o processo inflamatório (França *et al.*, 2015).

Com relação a perda de peso corporal, foi observado um decréscimo acentuado do peso dos animais desafiados com *S. Typhimurium*, e, por outro lado, os animais que receberam o queijo probiótico sofreram uma menor perda de peso (Figura 1B). Os mecanismos responsáveis ainda não estão completamente elucidados, no entanto sabe-se que a infecção por *S. Typhimurium* ativa respostas inflamatórias sistêmicas levando a liberação de citocinas pró inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Já foi demonstrado que essas citocinas

induzem a perda de apetite, através da indução de funções hipotalâmicas, e aumentam o gasto energético basal levando a perda de massa muscular (Rao *et al.*, 2017; Wensveen *et al.*, 2024). Além disso, a inflamação desencadeada por *S. Typhimurium* leva a dificuldade de absorção de nutrientes pelo epitélio intestinal (Radlinski *et al.*, 2024). Em última análise, a alteração em rotas metabólicas em resposta ao estresse oxidativo causa maior gasto energético, o que reflete em maior perda de peso corporal (Li *et al.*, 2024).

A presença de enterobactérias e de *Salmonella* foram avaliadas nas fezes dos camundongos (Figura 2A e B). Além disso, para avaliar se a levedura, associada à matriz do queijo, sobreviveu em concentrações adequadas após a passagem pelo trato gastrointestinal, as contagens fecais foram determinadas (Figura 2C). Como esperado, não foram observadas contagens de *Salmonella* no grupo que recebeu apenas o queijo probiótico ou no grupo que recebeu apenas solução salina. No entanto no grupo desafiado com *S. Typhimurium* a contagem observada foi significativamente superior (7,95 Log de UFC/g de fezes) àquela encontrada no grupo desafiado com *S. Typhimurium* e tratado com o queijo probiótico (7,15 Log de UFC/g de fezes) (Figura 2A).

A contagem de enterobactérias totais foi de aproximadamente 7,95 Log de UFC/g para o grupo controle (solução salina) e para grupo que recebeu o queijo probiótico. No entanto essa concentração se mostrou significativamente maior no grupo desafiado com *S. Typhimurium* (8,20 Log de UFC/g), reduzindo significativamente no grupo infectado com *S. Typhimurium* e tratado com o queijo probiótico (5,73 Log de UFC/g). Esses resultados indicam o efeito protetivo da levedura através da inibição do crescimento de *S. Typhimurium* (Figura 2B).

A contagem de leveduras foi observada em níveis elevados no grupo controle e no grupo que recebeu apenas o queijo probiótico. No entanto, houve uma redução significativa no grupo desafiado com *S. Typhimurium* (6,60 Log de UFC/g), comparado ao grupo desafiado com *S. Typhimurium*, mas que foi tratado com o queijo (7,57 Log UFC/g) (Figura 2C).

Como esperado, não houve contagem de *Salmonella* nos grupos que receberam apenas solução salina ou o queijo probiótico. No entanto foi interessante observar que o queijo probiótico foi capaz de reduzir significativamente a contagem de *Salmonella* no grupo desafiado com *S. Typhimurium*, o que sugere um efeito inibidor do queijo com relação a multiplicação do patógeno (Figura 2A). Esses resultados são consistentes com aqueles

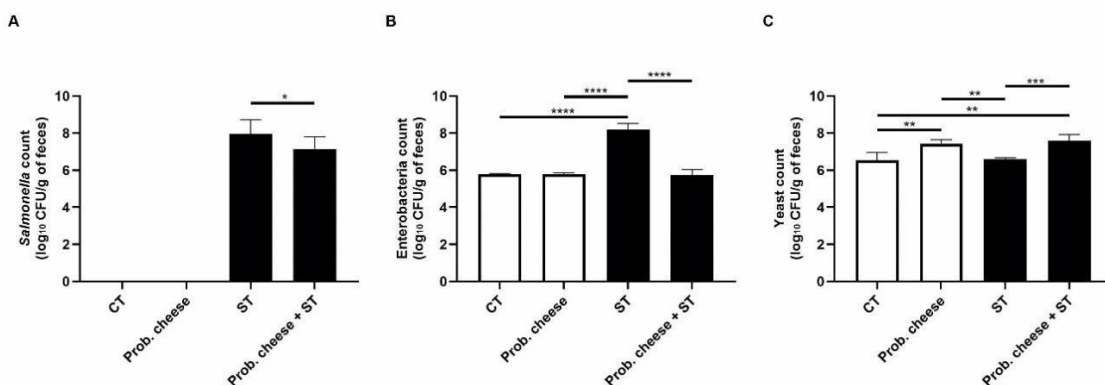
encontrados por Acursio *et al.* (2017) e Andrade *et al.* (2021) que notaram um decréscimo na população de *S. Typhimurium* quando camundongos foram tratados com *Lactobacillus plantarum* B7 e *K. lactis* B10, respectivamente. O ácido láctico foi apontado como o principal componente com efeito inibidor do crescimento de *S. Typhimurium*. Dessa forma, as elevadas concentrações de ácido láctico produzido pela levedura associada à matriz do queijo e que foi recentemente documentado por Silva *et al.* (2025), pode ter sido um dos fatores que contribuíram para a diminuição da carga de *Salmonella* nas fezes dos camundongos.

As enterobactérias são bactérias Gram negativas, fermentadoras de glicose e que apresentam distribuição ubíqua no ambiente. Esses microrganismos também podem ser encontrados no trato gastrointestinal (TGI) de animais, incluindo os humanos causando infecções entéricas (Kang *et al.*, 2018). No entanto, alguns gêneros das enterobactérias podem ser encontrados no TGI como microrganismos comensais, sem causar efeitos adversos desde que suas populações estejam em equilíbrio. Algumas situações, como as de enterocolite desenvolvida por *S. Typhimurium*, podem desencadear mudanças da população microbiana benéfica causando um desequilíbrio e, dentro desse contexto, as enterobactérias presentes podem causar infecções oportunistas aumentando o processo inflamatório através de uma série de mecanismos infecciosos que já são bem estabelecidos (Morales-López *et al.*, 2019). Alguns dos principais gêneros de enterobactérias encontradas no TGI e que são conhecidas por causarem infecções oportunistas são, além da *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* e *Yersinia* (Kang *et al.*, 2018). Portanto, a manutenção da população de enterobactérias em níveis comuns a população encontrada no grupo controle ou que recebeu apenas o queijo probiótico, demonstra que o queijo foi efetivo contra o aumento da população desses microrganismos mesmo diante da infecção causada por *S. Typhimurium* (Figura 2B), possivelmente por reduzir a inflamação e, conseqüentemente, a suscetibilidade imunológica dos camundongos.

Em contraste, a população de leveduras no grupo desafiado com *S. Typhimurium* e tratado com o queijo probiótico se manteve semelhante aos grupos controle, indicando que mesmo diante da infecção, a população de levedura prevaleceu (Figura 2C). Alguns mecanismos foram propostos para explicar como a população de leveduras pode permanecer inalterada diante de um processo infeccioso com *S. Typhimurium* (França *et al.*, 2015). Entretanto, foi interessante observar que no grupo controle que não recebeu o queijo probiótico a população de leveduras foi pelo menos 10 vezes menor que o grupo que recebeu o queijo, indicando a capacidade de sobrevivência das leveduras presentes no queijo após a passagem pelo TGI dos camundongos, o que pode estar associada a proteção que a matriz do

queijo exerce às células microbianas (Madureira *et al.*, 2011). Além disso, algumas leveduras tem a capacidade de aumentar a expressão de proteínas de tolerância ao estresse para sobreviver ao trânsito gastrointestinal, o que pode justificar a viabilidade da *K. lactis* nas fezes dos camundongos (Morales-Amparano *et al.*, 2019). Já foi demonstrado que a viabilidade das leveduras não é um pré requisito para que a mesma exerça efeitos antagônicos contra *Salmonella*, uma vez que sua parede celular apresenta componentes que aderem a superfície da bactéria evitando sua ligação ao epitélio hospedeiro e esse fator independe da viabilidade (Generoso *et al.*, 2010). No entanto, alguns mecanismos como a liberação de citocinas anti-inflamatórias foram descritos a partir de microrganismos vivos (Castillo *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2011).

Figura 2: Contagens fecais de *Salmonella*, enterobactérias e leveduras (log₁₀ UFC/g de fezes) em camundongos infectados com *S. Typhimurium*, tratados e não tratados com queijo probiótico.



Legenda: Contagens fecais de *Salmonella*, enterobactérias e leveduras (log₁₀ UFC/g de fezes) em camundongos tratados apenas com solução salina estéril (CT); tratados apenas com o queijo probiótico (Prob. cheese); tratados com solução salina estéril e infectados com *Salmonella* (ST) e tratados com queijo probiótico e infectados com *Salmonella* (Prob. cheese + ST). *, **, ***, **** Asteriscos indicam uma diferença significativa entre os grupos por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (P<0,05, 0,01, 0,001 e 0,0001, respectivamente). (N=10)

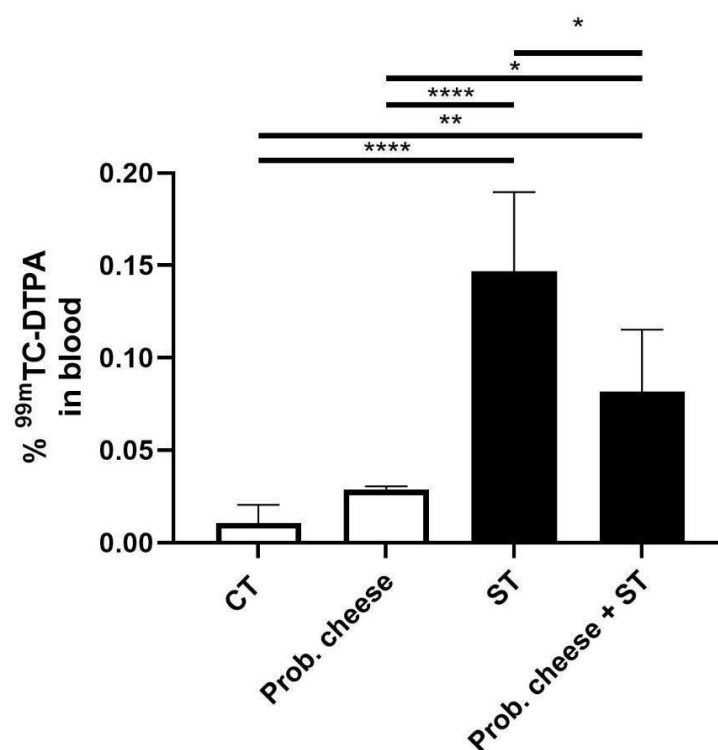
Fonte: Do autor (2025).

A infecção com *S. Typhimurium* causou aumento significativo da permeabilidade intestinal. No entanto, no grupo tratado com o queijo probiótico esse aumento foi prevenido conforme demonstrado na Figura 3.

O ^{99m}Tc-dietilenotriaminopentaacetato (^{99m}Tc-DTPA) é uma macromolécula com polaridade hidrofílica, que dificilmente atravessa a barreira epitelial em condições fisiológicas

normais (Coutinho *et al.*, 2021). Portanto a sua detecção no sangue indica alteração na permeabilidade da barreira intestinal que pode ocorrer de forma reversível ou irreversível e que, em alguns casos, pode ser decorrente de processos inflamatórios desencadeados por microrganismos patogênicos, assim como no presente trabalho (Generoso *et al.*, 2010). Dentro desse contexto a permeabilidade intestinal observada no grupo que foi infectado com *S. Typhimurium* é um indicador do dano causado por esse patógeno ao epitélio intestinal. Em contrapartida, nos grupos que foram tratados com o queijo probiótico, a integridade intestinal foi parcialmente preservada (Figura 3). Alguns autores relatam o envolvimento de ácidos graxos de cadeia curta, produzido por muitos microrganismos, como sendo responsável pela restituição do epitélio intestinal, o que pode explicar a diminuição da permeabilidade observada nos animais tratados com o queijo probiótico (Peng *et al.*, 2007). Por outro lado, também é evidente que concentrações fisiológicas normais de ácidos graxos, apesar de benéficas, podem ser responsáveis pela permeabilidade discreta o que pode explicar discreta elevação da permeabilidade intestinal observada no grupo que recebeu apenas o queijo probiótico.

Figura 3: Permeabilidade intestinal em camundongos infectados com *S. Typhimurium* e tratados ou não com o queijo probiótico.



Legenda: Permeabilidade intestinal em camundongos tratados apenas com solução salina estéril (CT); tratados apenas com o queijo probiótico (Prob. cheese); tratados com solução salina estéril e infectados com *Salmonella* (ST) e tratados com queijo probiótico e infectados com *Salmonella* (Prob. cheese + ST). *, **, **** Asteriscos indicam uma diferença significativa entre os grupos por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (P<0,05, 0,01 e 0,0001, respectivamente). (N=10)

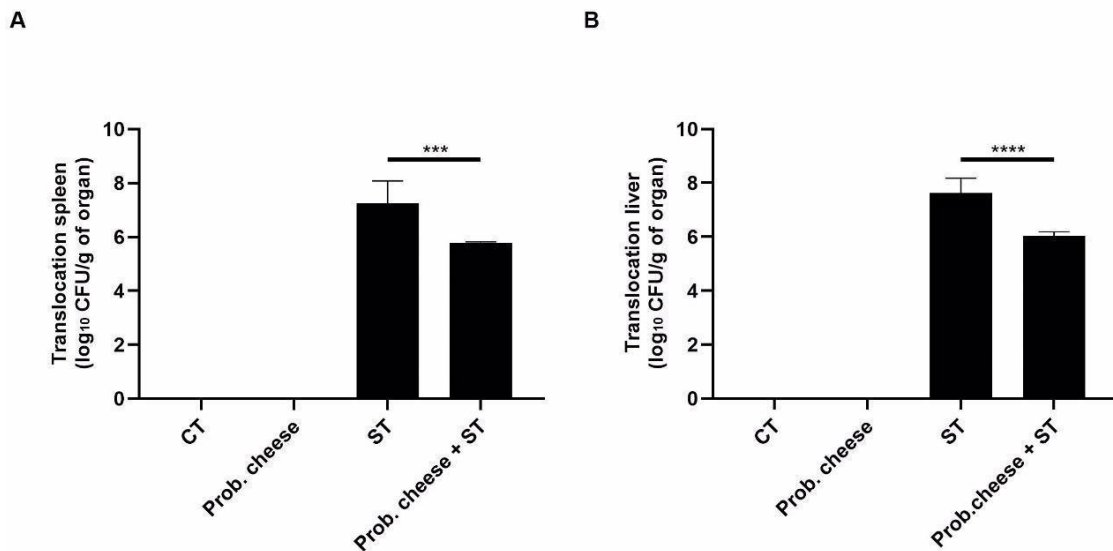
Fonte: Do autor (2025).

Conforme previsto, os resultados observados mostraram altos níveis de translocação bacteriana para o baço e o fígado dos animais desafiados com *S. Typhimurium*. Um total de 57% dos animais apresentou contagens elevadas de *Salmonella* no baço e fígado (7,24 e 7,62 Log de UFC/g de órgão, respectivamente). Por outro lado, no grupo desafiado com *S. Typhimurium* e tratado com o queijo probiótico, as contagens de *Salmonella* foram significativamente menores em ambos os órgãos (5,78 e 6,03 Log de UFC/g de órgão, respectivamente) (Figura 4).

A translocação está relacionada com a passagem do patógeno do epitélio intestinal para outros órgãos, como o fígado, e que pode ocorrer intracelularmente, através da via linfática ou extracelularmente através da via vascular. No presente trabalho não houve translocação para o baço e fígado dos animais que foram tratados apenas com solução salina ou o queijo probiótico, embora já tenha sido demonstrado que pode ocorrer a translocação fisiológica direcionada a modulação do sistema imune em condições normais (Martins *et al.*, 2007) (Figura 4). No grupo desafiado com *S. Typhimurium*, no entanto, foram observados elevados níveis de translocação, refletindo, o grau de inflamação da mucosa intestinal e confirmado através do infiltrado inflamatório observado nos testes histopatológicos (Figura 4 e 8C). Esse processo foi reduzido quando os animais foram alimentados previamente com o queijo probiótico (Figura 4). De acordo com Martins *et al.* (2007), sIgA inibe a ligação do patógeno ao epitélio intestinal através de mecanismos que serão abordados mais adiante. Além disso, acredita-se que imunoglobulinas com função de opsoninas aumentem a eficácia da fagocitose por macrófagos e leucócitos polimorfonucleares causando a morte dessas bactérias. No entanto, em alguns casos em que a bactéria consegue vencer a barreira epitelial e translocar-se, o sistema reticulo endotelial (RES) remove bactérias de sistema circulatório ou induz a fagocitose desses microrganismos pelas células de kuppfer. Foi demonstrado que polímeros de glicose extracelulares produzidos por *Saccharomyces* são estimuladores do sistema RES (Martins *et al.*, 2007). Martins *et al.* (2013) demonstraram que, além dos mecanismos citados, a ligação da bactéria patogênica à célula da levedura, pode ser

responsável por um menor número de bactérias livres que potencialmente se ligariam ao epitélio intestinal. Ao não se ligar às células epiteliais, a indução de vias de sinalização pró inflamatórias não ocorre, diminuindo a inflamação e, conseqüentemente, os níveis de translocação para fígado e baço, por exemplo.

Figura 4: Translocação bacteriana para o baço (A) e fígado (B) em camundongos infectados com *S. Typhimurium* e tratados e não tratados com o queijo probiótico.



Legenda: Translocação (log₁₀ UFC/g de órgão) em camundongos tratados apenas com solução salina estéril (CT); tratados apenas com o queijo probiótico (Prob. cheese); tratados com solução salina estéril e infectados com *Salmonella* (ST) e tratados com o queijo probiótico e infectados com *Salmonella* (Prob. cheese + ST). *** e **** Asteriscos indicam uma diferença significativa entre os grupos por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (P<0,001 e 0,0001) (N=10).

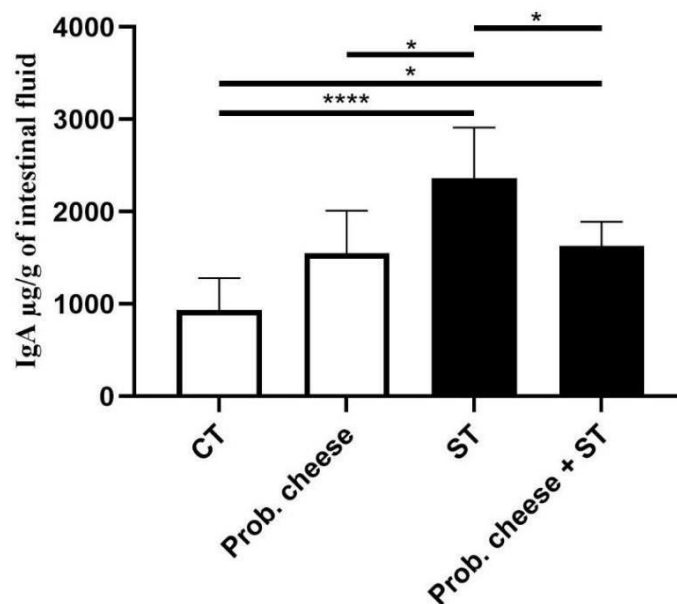
Fonte: Do autor (2025).

A Figura 5 mostra que a infecção experimental com *S. Typhimurium* induziu um aumento nos níveis de IgA no fluido intestinal de camundongos, com diminuição significativa nos animais tratados com o queijo probiótico.

Após as primeiras 24 horas mais críticas da infecção por *S. Typhimurium*, anticorpos de alta afinidade, como as IgAs, são secretadas no lúmen intestinal e se ligam ao patógeno bloqueando o seu acesso à superfície mucosa. As IgAs são um tipo de anticorpo produzido por linfócitos B ativados na lâmina própria. Para que ocorra a ativação de células B para produção de IgA, existem mecanismos que são dependentes ou independentes de linfócitos T. Já foi demonstrado que, em camundongos, grande parte das IgAs são produzidas por vias

independentes de células T, diferentemente do que ocorre em humanos (Frasen *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2023). Alguns experimentos já demonstraram que as IgAs exercem mecanismos relacionados com o lipídeo O, presente nas bactérias. As IgAs atuam bloqueando o acesso do patógeno à mucosa e/ou acelerando a eliminação do patógeno. A afinidade do IgA é atribuída a aglutinação, interrupção e neutralização do fator de virulência. No entanto, pesquisas mais recentes sugerem que a proteção está relacionada com o mecanismo de crescimento encadeado, onde IgAs revestem as bactérias e fazem a ligação cruzada com as células-filhas durante a divisão celular, impedindo sua dissociação, o que força indiretamente o patógeno a formar grandes aglomerados monoclonais. Esses aglomerados previnem a invasão do tecido, reduz a taxa de transferência de plasmídeos de resistência, e consequentemente, acelera a eliminação do patógeno (Wotza *et al.* 2017). Portanto, níveis reduzidos de IgA no grupo tratado com o queijo probiótico demonstram, indiretamente, que uma menor população de *Salmonella* pode ter ocorrido devido ao efeito inibidor exercido pela levedura *K. lactis* B10 (Figura 5). Tiago *et al.* (2012) demonstraram a capacidade de alguns microrganismos, especialmente leveduras, de aprisionarem células patogênicas à superfície de suas células, resultando em uma menor população de *Salmonella* livre e, portanto, desencadeando uma menor resposta, especialmente na produção de IgA.

Figura 5: Níveis de sIgA no fluido intestinal de camundongos infectados com *S. Typhimurium* e tratados e não tratados com o queijo probiótico.



Legenda: Níveis de sIgA no fluido intestinal de camundongos tratados apenas com solução salina estéril (CT); tratados apenas com o queijo probiótico (Prob. cheese); tratados com solução salina estéril e infectados com *Salmonella* (ST) e tratados com o queijo probiótico e infectados com

Salmonella (Prob. cheese + ST). * e ****Asteriscos indicam uma diferença significativa entre grupos por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$ e $0,0001$). (N=10).

Fonte: Do autor (2025).

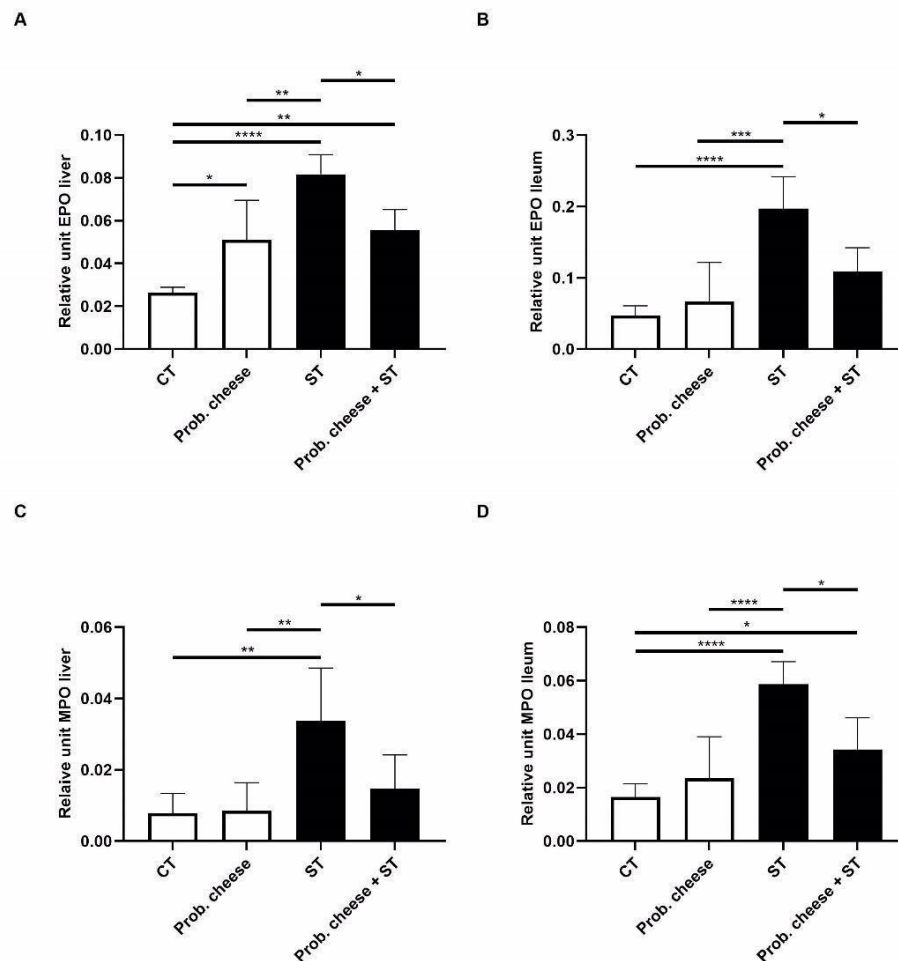
Durante a infecção, *S. Typhimurium* apresenta a capacidade de translocar-se do lúmen intestinal e atingir compartimentos internos, podendo alcançar o fígado que é o local onde, geralmente, as lesões causadas são letais. Portanto, quando bactérias patogênicas como *S. Typhimurium* alcançam o fígado, elas tendem a causar processos inflamatórios que são desencadeados pelo recrutamento de células eosinófilas e neutrófilas (LeBlank et al., 2010). Esse quadro inflamatório é possível de ser observado indiretamente através de testes com marcadores, a exemplo da avaliação do aumento da atividade das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e da mieloperoxidase (MPO) no fígado e íleo de camundongos desafiados com *S. Typhimurium* (Fig. 6A). No presente trabalho, este aumento foi prevenido pelo tratamento com o queijo probiótico antes da infecção. De forma semelhante, esse efeito protetor foi observado no íleo (Fig. 6C).

Um dos principais motivos da disbiose durante a infecção ocorre porque *S. Typhimurium* apresenta mecanismos que induzem a liberação de citocinas pró inflamatórias, bem como IL-8, responsável pelo recrutamento de neutrófilos que atravessam a barreira trans epitelial desencadeando um processo inflamatório (LeBlanc et al., 2010). Esse acúmulo de neutrófilos auxilia no crescimento do patógeno enquanto a microbiota benéfica é afetada. Recentemente Gill et al (2012) demonstraram que uma serina protease de alta especificidade de substrato (elastase) que é produzida por neutrófilos e que apresenta efeito antimicrobiano atua diretamente na microbiota natural, o que favorece indiretamente o crescimento do patógeno, uma vez que *Salmonella* pode subverter esse efeito, além de ser resistente a outros diversos antimicrobianos. Assim, a infiltração dessas células pode aumentar o processo inflamatório além de contribuir para o dano e disfunção da mucosa intestinal. Diante disso, uma forma indireta de medir os níveis de infiltração de neutrófilos e eosinófilos e, conseqüentemente, estabelecer os níveis de inflamação tecidual é através da quantificação da atividade da enzima MPO (enzima lisossomal encontrada especificamente em neutrófilos), assim como a quantificação da atividade da enzima EPO permite a determinação da infiltração de eosinófilos (Cordeiro et al., 2019). Portanto, a atividade enzimática foi medida no íleo e no fígado dos camundongos. Foi possível observar que o queijo probiótico foi efetivo em reduzir a infiltração de neutrófilos e eosinófilos tanto no íleo, quanto no fígado (Figura 6). De acordo com Abrantes et al. (2020) esses resultados sugerem que o queijo

probiótico favoreceu a migração controlada de leucócitos para o local da inflamação, uma característica importante no controle do processo inflamatório e melhora no quadro clínico. Além disso, Coutinho *et al.* (2021) observaram que a menor infiltração de neutrófilos e eosinófilos se deve a menor capacidade de adesão da *Salmonella* ao epitélio na presença do probiótico, o que compromete a ligação a receptores específicos e conseqüentemente, menor recrutamento de células inflamatórias.

O aumento nos níveis de EPO observados do fígado dos animais que receberam o queijo probiótico foi confirmado através do aumento da celularidade intraparenquimatosa observada nos testes histopatológicos. Algumas pesquisas demonstraram que o zimosano, um β -glucano da parede celular de leveduras, pode ativar células da imunidade inata como células dendríticas e macrófagos, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio no combate contra patógenos. Além disso, esse polissacarídeo também pode induzir a liberação de citocinas pró inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Portanto, o aumento de células eosinofílicas pode estar relacionado com a capacidade imuno estimuladora que a levedura, presente no queijo, apresenta (Jawhara *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2023).

Figura 6: Atividades da peroxidase eosinofílica (EPO) e da mieloperoxidase (MPO) no fígado (A e C, respectivamente) e no íleo (B e D, respectivamente) de camundongos infectados com *S. Typhimurium* e tratados e não tratados com o queijo probiótico.



Legenda: CT: solução salina estéril; Prob cheese: queijo probiótico; ST: solução salina estéril e infectados com *Salmonella* e Prob, cheese + ST: queijo probiótico e infectados com *Salmonella* (Prob. cheese + ST). *, **, *** e **** Asteriscos indicam uma diferença significativa entre os grupos por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$, 0,01, 0,001 e 0,0001, respectivamente) (N=10). Fonte: Do autor (2025).

Com relação a análise histológica, ao avaliar o intestino, foi observado que o grupo tratado apenas com solução salina não apresentou alterações histopatológicas nas análises (Figura 7A). O grupo tratado com o queijo probiótico apresentou um aumento discreto das células, predominantemente de células mononucleares, na camada submucosa em metade dos animais analisados (Figura 7B). O grupo infectado com *S. Typhimurium*, apresentou alterações homogêneas e focais, parede intestinal muscular íntegra com grau de edema da submucosa e da lâmina das vilosidades, discreto. Foram observados focos de erosão epitelial superficial associado com o aumento da celularidade nas vilosidades (células inflamatórias mononucleares) e alterações reacionais celulares do epitélio (hipercromasia e mitose) também foram observados. Além disso foram observados raríssimos linfócitos intraepiteliais (Figura 7C). O grupo infectado com *S. Typhimurium* e tratado com o queijo probiótico apresentou

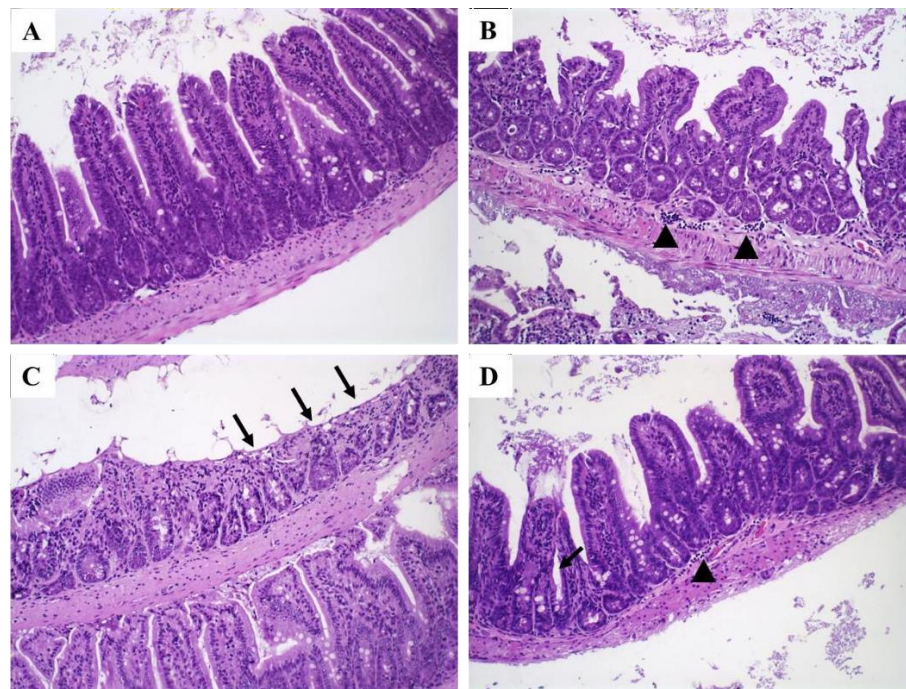
parede intestinal íntegra com discreto edema de vilosidade, discreto aumento da celularidade na camada submucosa (células inflamatórias mononucleares), ausência de mitose e presença de discreto foco de erosão epitelial em 3 dos 8 animais avaliados (Figura 7D).

Por outro lado, a análise do fígado mostrou que o grupo tratado com solução salina apresentou preservação da estrutura lobular hepática sem alterações da celularidade e aspectos histológicos dentro da normalidade (Figura 8A). O grupo tratado apenas com o queijo probiótico apresentou arquitetura lobular e celular preservada sem alterações significativas, exceto por um único local que apresentou discreto aumento de celularidade intraparenquimatosa em um dos cortes amostrados (Figura 8B). O grupo infectado com *S. Typhimurium* apresentou corte histológico com perda da arquitetura lobular hepática, provavelmente por conta do intenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear de distribuição irregular no parênquima hepático (Figura 8C – seta preta), por vezes associado a áreas de necrose focal hepatocitária (Figura C – setas vermelhas). Nas análises dos animais do grupo infectado com *S. Typhimurium* e tratado com o queijo probiótico foi observado que em metade dos cortes histológicos do fígado ocorre perda da arquitetura lobular hepática devido a intenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear de distribuição irregular no parênquima hepático (Figura 8D – setas pretas), com um foco de área de necrose (Figura 8D – setas vermelhas). Também é possível observar a arquitetura lobular preservada com discreto foco inflamatório predominantemente mononuclear interrompendo fileiras hepatocitárias (Figura 8D – seta preta).

Os resultados observados foram consistentes com os demais resultados. A presença de aumento de celularidade, especialmente, células mononucleadas no grupo que recebeu apenas o queijo probiótico pode estar relacionada a capacidade que alguns microrganismos apresentam de estimular o recrutamento de células imunes associadas ao intestino, principalmente aquelas células relacionadas com a imunidade inata (LeBlank *et al.*, 2010) (Figura 7B). As células em mitose assim como a hipercromasia observadas no grupo infectado com *S. Typhimurium* podem estar relacionadas com uma resposta ao quadro inflamatório que pode refletir uma tentativa de reparo do epitélio pelo sistema imune (Figura 7C). Além disso, de acordo com Coutinho *et al.* (2021), na situação de infecção por *Salmonella*, o epitélio intestinal tende a perder a arquitetura e integridade ocasionando o afrouxamento das vilosidades, bem como a presença de células inflamatórias infiltradas no tecido. Esses fatores em conjunto causam uma diminuição da relação existente entre altura das vilosidades e

profundidade das cristas, assim como foi observado nos camundongos infectados com *S. Typhimurium* e atenuados no grupo tratado com o queijo probiótico (Figuras 8B e C).

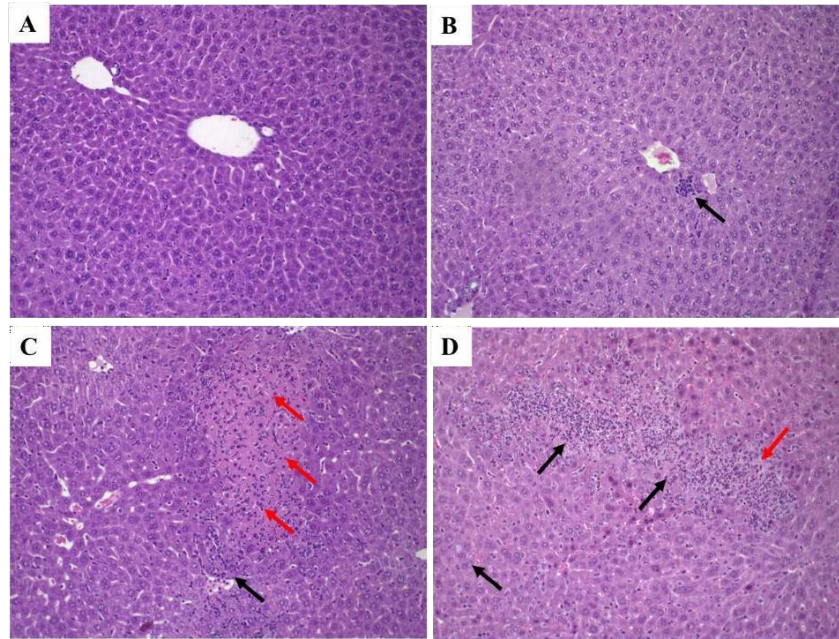
Figura 7: Aspectos histopatológicos do íleo de camundongos infectados com *S. Typhimurium* e tratados e não tratados com o queijo probiótico.



Legenda: Aspectos histopatológicos do íleo de camundongos tratados apenas com solução salina estéril (A); apenas tratados com o queijo probiótico (B); tratados com solução salina estéril e infectados com *Salmonella* (C) e tratados com queijo probiótico e infectados com *Salmonella* (D). As setas pretas indicam áreas de lesão de vilosidades com um ligeiro aumento na celularidade da lâmina própria e foco de infiltrado inflamatório. O asterisco indica edema associado à necrose de coagulação.

Legenda: Do autor (2025).

Figura 8: Aspectos histopatológicos do fígado de camundongos infectados com *S. Typhimurium* e tratados e não tratados com o queijo probiótico.



Legenda: Aspectos histopatológicos do fígado de camundongos tratados apenas com solução salina estéril (A); tratados apenas com queijo probiótico (B); tratados com solução salina estéril e infectados com *Salmonella* (C) e tratados com o queijo probiótico e infectados com *Salmonella* (D). As setas pretas indicam uma área de infiltrado inflamatório e a seta vermelha necrose hepatocítica focal.

Fonte: Do autor (2025).

4.0 CONCLUSÃO

As descobertas feitas no presente trabalho sugerem que o queijo suplementado com a levedura *K. lactis B10*, exerce papel terapêutico diante do quadro de infecção por *S. Typhimurium*. Os mecanismos envolvidos nesse processo parecem estar relacionados com a interferência nas vias de sinalização que levam ao processo inflamatório, bem como a produção de biomoléculas ou interferência direta na ligação de *S. Typhimurium* ao epitélio intestinal. No entanto, novas pesquisas são necessárias a fim de melhor elucidar tais mecanismos e distingui-los daqueles induzidos por biomoléculas presentes no próprio queijo, oriundas do leite.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e pelo fomento à pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, F. A.; *et al.* Treatment with *Bifidobacterium longum* 51A attenuates intestinal damage and inflammatory response in experimental colitis. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 1, p. 47-57, 2020

ACURCIO, L. B.; *et al.* Protective effects of milk fermented by *Lactobacillus plantarum* B7 from Brazilian artisanal cheese on a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in BALB/c mice. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 436-445, 2017

ANDRADE, G. C.; *et al.* *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii*: Probiotic characterization, anti-*Salmonella* effect, and impact on cheese quality. **Food Science and Technology - LWT**, v. 151, p. 112240, 2021

ANDRADE, R. P.; *et al.* Survival of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii* to simulated gastrointestinal conditions and their use as single and mixed inoculum for cheese production. **Food Research International**, v. 125, p. 108620, 2019

ANDRADE, R. P.; *et al.* Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, v. 91, p. 72-79, 2017

CASTILLO, N. A.; PERDIGÓN, G.; LEBLANC, A. M. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 1-12, 2011

CORDEIRO, M. A.; *et al.* Fermented whey dairy beverage offers protection against *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium infection in mice. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 6756-6765, 2019

COUTINHO, J. O. A.; *et al.* Antarctic strain of *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 18,377 attenuates mucositis induced by 5-fluorouracil in Mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 3, p. 486-500, 2022

DE LEBLANC, A. M.; CASTILLO, N. A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 223-231, 2010

FADARE, O. S. *et al.* In vitro evaluation of the synbiotic effect of probiotic *Lactobacillus* strains and garlic extract against *Salmonella* species. **Food Science and Technology - LWT**, v. 153, p. 112439, 2022

FONSECA, M.; *et al.* Can a functional cheese spread incorporating *Akkermansia muciniphila* deliver beneficial physicochemical and biological properties while enhancing probiotic stability and viability during aerobic storage and in vitro digestion? **Food Science and Technology - LWT**, v. 200, p. 116187, 2024

FRANÇA, R. C.; *et al.* *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella* Typhimurium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 7953-7961, 2015

FRANSEN, F.; *et al.* BALB/c and C57BL/6 mice differ in polyreactive IgA abundance, which impacts the generation of antigen-specific IgA and microbiota diversity. **Immunity**, v. 43, n. 3, p. 527-540, 2015

GENEROSO, S. V.; *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Archives of Microbiology**, v. 192, p. 477-484, 2010

GENG, S.; *et al.* In vitro screening of synbiotics composed of *Lactobacillus paracasei* VL8 and various prebiotics and mechanism to inhibits the growth of *Salmonella* Typhimurium. **Food Science and Technology - LWT**, v. 180, p. 114666, 2023

GILL, N.; *et al.* Neutrophil elastase alters the murine gut microbiota resulting in enhanced *Salmonella* colonization. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e49646, 2012

HUANG, Fu-Chen. Upregulation of *Salmonella*-Induced IL-6 Production in Caco-2 Cells by PJ-34, PARP-1 Inhibitor: Involvement of PI3K, p38 MAPK, ERK, JNK, and NF- κ B. **Mediators of Inflammation**, v. 2009, n. 1, p. 103890, 2010

HUGOT, C.; *et al.* *Cyberlindnera jadinii* and *Kluyveromyces lactis*, two fungi used in food processes, have potential probiotic effects on gut inflammation. **Msystems**, v. 8, n. 6, p. e00841-23, 2023

JAWHARA, S.; *et al.* Modulation of intestinal inflammation by yeasts and cell wall extracts: strain dependence and unexpected anti-inflammatory role of glucan fractions. 2012
JOSHI, T. J.; *et al.* Functional metabolites of probiotic lactic acid bacteria in fermented dairy products. **Food and Humanity**, v. 3, p. 100341, 2024

KANG, E.; *et al.* Enterobacteria and host resistance to infection. **Mammalian Genome**, v. 29, p. 558-576, 2018

KURTZ, J. R.; GOGGINS, J. A.; MCLACHLAN, J. B. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. **Immunology Letters**, v. 190, p. 42-50, 2017

LI, M.; *et al.* Tecido adiposo marrom facilita a resposta febril após infecção por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em camundongos. **Journal of Lipid Research**, v. 65, n. 9, p. 100617, 2024

MADUREIRA, A. R.; *et al.* Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465-470, 2011

MARTINS, F. S.; *et al.* Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 4, p. 270-279, 2013

MARTINS, F. S.; *et al.* Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 4, p. 359-364, 2011

MARTINS, F. S.; *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 352-359, 2007

MORALES-AMPARANO, M. B.; *et al.* Proteomic response of *Saccharomyces boulardii* to simulated gastrointestinal conditions and encapsulation. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, p. 831-840, 2019

MORALES-LÓPEZ, S.; *et al.* Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 13, n. 04, p. 265-273, 2019

OLIVEIRA, S. R. M.; *et al.* Evaluation of a functional craft wheat beer fermented with *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 to treat *Salmonella Typhimurium* infection in mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 5, p. 1180-1192, 2023

PARK, H. J.; *et al.* In vivo zymosan treatment induces IL15-secreting macrophages and KLRG1-expressing NK cells in mice. **Molecules**, v. 28, n. 15, p. 5779, 2023

PENG, L.; *et al.* Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. **Pediatric Research**, v. 61, n. 1, p. 37-41, 2007

RADLINSKI, L. C.; *et al.* Salmonella virulence factors induce amino acid malabsorption in the ileum to promote ecosystem invasion of the large intestine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 121, n. 47, p. e2417232121, 2024

RAO, S.; *et al.* Pathogen-mediated inhibition of anorexia promotes host survival and transmission. **Cell**, v. 168, n. 3, p. 503-516. e12, 2017

SILVA, A. A. D.; *et al.* Physicochemical Profile of Canastra Cheese Inoculated with Starter Cultures of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii*. **Foods**, v. 14, n. 1, p. 121, 2025

TIAGO, F. C. P.; *et al.* Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 1194-1207, 2012

WENSVEEN, F. M.; ŠESTAN, M.; POLIĆ, B. The immunology of sickness metabolism. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 21, n. 9, p. 1051-1065, 2024

WOTZKA, S. Y.; NGUYEN, B. D.; HARDT, W-D. *Salmonella* Typhimurium diarrhea reveals basic principles of enteropathogen infection and disease-promoted DNA exchange. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 4, p. 443-454, 2017

Artigo 3

Caracterização tecnológica, avaliação de segurança e resposta proteômica de *Kluyveromyces lactis* B10 e *Torulaspora delbrueckii* B14 a condições gastrointestinais simuladas

Formatado de acordo com as normas NBR 6062 (ABNT 2018)

RESUMO

Probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde quando administrados em quantidades adequadas. Para serem considerados probióticos, os microrganismos devem obedecer a alguns critérios como ausência de genes de patogenicidade e capacidade de sobreviver ao trato gastrointestinal (TGI), o que representa um desafio devido às variações de pH, sais biliares e presença de proteases. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a segurança de *Kluyveromyces lactis* B10 e *Torulaspora delbrueckii* B14 por meio de testes de dnase, gelatinase e hemólise, bem como a influência da liofilização na viabilidade das leveduras ao longo de 120 dias de prateleira e a resposta proteômica dessas leveduras quando submetidas às condições gastrointestinais simuladas. A avaliação de segurança mostrou que as leveduras não produziram enzimas, sendo consideradas, portanto, seguras para consumo. A viabilidade das leveduras foi influenciada significativamente pela temperatura de armazenamento após a liofilização. A 4 °C as leveduras apresentaram maior viabilidade (83,38% e 75,51% para *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14, respectivamente) aos 120 dias de armazenamento comparado com a população observada a 25 °C (75,51 e 32,60%). Além disso, quando submetidas a condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI), *K. lactis* B10 apresentou uma viabilidade de 96,72% enquanto *T. delbrueckii* B14 apresentou 9,75% de taxa de sobrevivência após 270 minutos de exposição. Os resultados da análise proteômica mostraram que as leveduras utilizam mecanismos como a produção de proteínas de tolerância ao estresse oxidativo (proteínas de choque térmico- HSPs), chaperonas moleculares (chaperona molecular não chaperonina ATPase), proteínas de manutenção do pH interno (adenosilmetionina sintase, S-metiltransferase), metabolismo de carboidratos (gliceraldeído-3-fosfato, glicose-6-fosfato, piruvato quinase, piruvato descarboxilase, entre outras), neutralização de radicais livres (álcool desidrogenase, NADH: flavina oxidoreductase), peptidases (carboxipeptidase, proteína contendo domínio peptidase A1 e proteína contendo domínio peptidase S8/S53), hidrolases (pirofosfatase inorgânica, adenosilhomocisteinase), transferência de elétrons (Subunidade 2 do complexo citocromo mitocondrial), proteínas de superfície celular (proteína semelhante a aglutinina contendo o domínio n-terminal), proteínas de transporte (proteína contendo o domínio SH3) e de replicação do DNA (DNA topoisomerase), entre outras, como forma de subverter os danos causados pelo baixo pH e bile. Esses resultados demonstram que ambas as leveduras apresentam potencial para serem utilizadas como probióticos na indústria de alimentos e fornecem insights sobre proteínas diretamente associadas à resposta ao estresse do TGI.

Palavras-chave: leveduras, liofilização, probiótico, alimentos funcionais

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos probióticos vem sendo, a muitos anos, o foco de um intenso esforço de estudos que buscam determinar seus possíveis benefícios à saúde e identificar os mecanismos pelos quais eles os exercem (Alcântara *et al.*, 2012). Embora algumas pesquisas demonstrem que a célula microbiana, inviável, ainda é capaz de exercer efeito antagônico contra patógenos devido à presença de componentes de parede como β -glucanas e mananas, há um consenso de que um microrganismo precisa sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), para que possa exercer benefícios na saúde do hospedeiro (Generoso *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2023).

Durante o trajeto pelo TGI, o microrganismo enfrenta condições adversas como acidez, que pode levar à desnaturação proteica e perda de funções celulares importantes para a sobrevivência e multiplicação da célula. Além disso, os sais biliares, principal componente da bile, pode exercer ação antimicrobiana, causando danos à membrana celular e ao DNA. Devido à sua natureza anfipática, os sais biliares podem ainda alterar a conformação de proteínas levando ao estresse oxidativo (Alcântara *et al.*, 2012).

Apesar da presença de microrganismos nos mais diversos alimentos, o grande número de associações de alguns microrganismos com doenças sistêmicas têm levado órgãos como a OMS a reconhecerem os riscos do seu consumo e estabelecerem alguns parâmetros a serem considerados antes mesmo da caracterização probiótica do microrganismo. Portanto, a ausência de atividades patogênicas, tais como atividade de degradação de gelatinase, dnase e hemólise são parâmetros que, assim como a capacidade de sobrevivência, devem ser avaliados (Fernandez-Pacheco *et al.*, 2021).

A utilização de leveduras como probióticos vem atraindo atenção devido à sua capacidade antioxidante, anticolesterolêmica, anti-hipertensiva e anticancerígena. Além disso, esses microrganismos são capazes de produzir diversas substâncias bioativas como ácido gama aminobutírico (GABA), ácido fólico, carotenoides, peptídeos antimicrobianos, ácidos graxos de cadeia curta, exopolissacarídeos (EPS), entre outros que podem ser utilizados nos mais diversos processos tecnológicos (Goel *et al.*, 2024).

As leveduras são um grupo amplo de microrganismos que apresentam propriedades atrativas como tolerância ao baixo pH, oxigênio, variações de pressão osmótica, resistência aos sais biliares, baixa atividade de água e a antibióticos (Andrade *et al.*, 2019; Jan *et al.*,

2023). Além disso, as leveduras apresentam ampla flexibilidade nutricional, o que as tornam promissoras para serem aplicadas no mercado de alimentos funcionais (Syal & Vohra, 2013).

Alguns trabalhos já relatam a capacidade de sobrevivência de diversas leveduras, durante a passagem pelo TGI simulado, especialmente quando liofilizadas. A liofilização é um método eficaz que protege o microrganismo e aumenta a taxa de sobrevivência durante a passagem pelo TGI, além de permitir a sua viabilidade durante longos períodos de armazenamento. Devido às condições adversas durante o processo, são utilizados crioprotetores, como carboidratos e substâncias proteicas, entre elas o leite, garantindo a sobrevivência dos microrganismos durante o processo (Bolla *et al.*, 2011).

Abordagens como genômica, transcriptômica e proteômica podem ser utilizadas para estudar a tolerância e as respostas metabólicas dos probióticos sob condições de estresse. A proteômica pode fornecer respostas sobre os mecanismos que permitem a tolerância das leveduras ao processo de liofilização e a exposição às condições gastrointestinais, identificando variações no metabolismo central da célula (Baig *et al.*, 2022). No entanto, atualmente, as pesquisas concentram-se em análises proteômicas de bactérias probióticas como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, entre outras (Baig *et al.*, 2022; Lau *et al.*, 2025), levando à necessidade de pesquisas voltadas a elucidar os mecanismos utilizados pelas leveduras, microrganismos igualmente importantes do ponto de vista biotecnológico.

K. lactis B10 e a *T. delbrueckii* B14 são duas leveduras isoladas do queijo Canastra e que apresentam potencial para serem utilizadas como probióticos (Andrade *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2025). Diante disso, esse trabalho teve como objetivo a avaliação dos aspectos de segurança, avaliação do tempo de viabilidade em diferentes temperaturas, após liofilização e a avaliação da resposta proteômica por meio da caracterização de proteínas intracelulares expressas por *K. lactis* B10 e a *T. delbrueckii* B14 durante a passagem pelo TGI simulado.

2. METODOLOGIA

2.1 Preparação dos microrganismos

As leveduras avaliadas no presente estudo foram previamente isoladas da produção de queijo Canastra (Andrade *et al.*, 2017) e encontram-se armazenadas em glicerol a -20 °C no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 foram reativadas em 1 mL de YPD (2% peptona, 2% glicose e 1% extrato de

levedura) e incubadas a 28 °C por 24 horas. A biomassa obtida foi utilizada para os testes subsequentes.

2.2 Avaliação de segurança

2.2.1 Atividade gelatinase

O teste de turbidez e liquefação da gelatina foi realizado conforme descrito por Faddin, (2000) utilizando as seguintes concentrações em g/L: 3 g de extrato de carne; 5,0 g de peptona; 120,0 g de gelatina comercial. Após a reativação, 5 µl de inóculo de *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 foram adicionados, separadamente, aos tubos de ensaio contendo o meio de gelatina. A bactéria *Staphylococcus aureus* 3165 foi utilizada como controle positivo e reativada em meio BHI a 37 °C por 24h. Os tubos de ensaio foram mantidos a 37 °C por 15 dias. Além disso, as leveduras também foram mantidas em sua temperatura ótima de 28 °C e 37 °C, simulando as condições corporais. A liquefação foi observada através do banho de gelo por 2 horas, o que permite a solidificação da gelatina. Na condição de produção enzimática da gelatinase, ocorre a liquefação do meio, caracterizando a reação como positiva.

2.2.2 Teste de dnase

A produção desta enzima foi analisada por cultivo em estrias após 24 horas de reativação na fase log do crescimento dos microrganismos no meio ágar DNase (HiMedia). Desta forma, *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 foram incubados a uma temperatura de 28 °C e 37 °C por 72 horas. Como controle positivo, foi utilizada a cepa *S. aureus* Saur ATCC 33592, mantida a 37 °C por 72 horas. Após a incubação, uma solução de ácido clorídrico a 0,1% foi adicionada às placas por 5 minutos. A reação foi caracterizada como positiva pela formação de halos claros ao redor das colônias (Syal & Vohra, 2013; Gupta & Malik, 2007).

2.2.3 Teste de hemólise

As cepas de levedura foram previamente semeadas em meio YPD, incubadas a 28 °C por 48 horas para obtenção de colônias puras e isoladas. Posteriormente, as colônias foram transferidas para placas de Ágar Sangue Base (HiMedia) suplementadas com 5% de sangue bovino fresco. Como controle positivo, foi utilizada a bactéria ATCC *Streptococcus pneumoniae* 40619. As placas foram incubadas por 3 dias a 28 °C e 37 °C, respectivamente (Fadda *et al.*, 2017).

2.3 Preservação de *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 por liofilização

K. lactis B10 e *T. delbrueckii* B14 foram cultivadas até atingir a quantidade desejada de células para liofilização seguindo a metodologia adaptada descrita por Pietrowski *et al.*, (2012) e Bolla *et al.*, (2011). Resumidamente, 20 µL de cada levedura armazenada a -20 °C foi reativada em 1 ml de YPD e incubada a 28 °C por 24 h. Esta cultura foi transferida para um frasco de Erlenmeyer contendo 10 ml do mesmo meio e incubada nas mesmas condições. Posteriormente, foram transferidas para 100 ml para obter uma população de aproximadamente 10⁷ UFC/ml. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 9000 rpm por 5 min e lavadas duas vezes com água destilada estéril. Em seguida, a biomassa de levedura foi ressuspensa em 500 µL de leite UHT estéril. As amostras foram congeladas a -80 °C por aproximadamente 8h em ampolas e levadas sucessivamente ao liofilizador com temperatura inicial de -56 °C e vácuo inicial de 1335 Vac e 66 µHg. As células liofilizadas foram armazenadas a 4 °C e temperatura ambiente por 120 dias. Após liofilização e em diferentes intervalos de tempo (0, 30, 60, 90, 120), as amostras foram reidratadas ao volume original com água deionizada estéril e plaqueadas em meio YPD e permaneceram incubadas a 28 °C por 24 horas para contagem de células viáveis.

A viabilidade das cepas foi determinada pelo número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). As amostras foram submetidas a diluição seriada preparadas em 0,1% de triptona, semeadas em YPD e incubadas a 28 °C por 48 horas (Bolla *et al.*, 2011).

2.4 Simulação das condições gastrointestinais

Para a avaliação da sobrevivência das leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14, as células foram expostas a condições que simulavam àquelas encontradas no estômago e trato intestinal superior aos 90 e 270 minutos, respectivamente, simulando a passagem pelo TGI. Para isso, as leveduras foram reativadas conforme descrito anteriormente até uma população de 10⁸ UFC/mL. Em seguida, foram liofilizadas e inoculadas em 10 mL de suco gástrico simulado (6,2 g/L NaCl, 2,2 g/L KCl, 0,22 g/L CaCl₂, 1,2 g/L NaHCO₃, 0,3% pepsina e pH 3,0) e incubadas a 37 °C com agitação de 150 rpm. Após 90 min, 17,5 mL de suco duodenal sintético (6,4 g/L NaHCO₃, 0,239 g/L KCl, 1,28 g/L NaCl, 0,1% pancreatina, 0,3% bile de boi, pH ajustado para 7,4 com HCl 5M) foram adicionados e novamente agitados a 37 °C, 150 rpm por 270 min simulando a passagem pelo trato intestinal. A taxa de sobrevivência das estirpes foi avaliada em 0 (T0), 90 (T1) e 270 (T2) min, utilizando a técnica de revestimento de superfície no meio YPD. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h para realização da contagem das unidades formadoras de colônias (Fadda *et al.*, 2017).

2.5 Análise proteômica

Para a simulação do trato gástrico intestinal, as leveduras foram cultivadas conforme descrito anteriormente. Em seguida, foram expostas às condições estomacais e intestinais de acordo com a metodologia proposta por Fadda *et al.* (2017). Foram obtidos 3 extratos proteicos, um extrato antes da exposição às condições simuladas (T0), após a passagem pelas condições estomacais (T90) e ao final de toda a simulação (T270).

Para a extração das proteínas, as células foram centrifugadas a 4 °C por 10 min e lavadas duas vezes com tampão PBS (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na₂HPO₄ e 0,24 g/L de KH₂PO₄). Aproximadamente 1 g de biomassa foi adicionada a 300 µL de tampão de extração (solução 1: 888 mg de dectrizima HCl, 530 mg de trizma base, 652 µL de triton X-100 e o volume completado para 100 mL com água milliQ, solução 2: 32 mL da solução 1,45 g de uréia, 15,2 g de thiuréia, 3,6 g de CHAPS e o volume completado para 100 mL também com água milliQ), 6 µL de inibidor de protease, 14 µL 1M de DTT, DNA'se (com concentração final de 12 unidades kunitz) e 20 µL de RNA'se 1 mg/mL. 20 glass beads de 0,5 mm de diâmetro foram adicionadas a esta solução e a extração das proteínas foi realizada em um Digital Disruptor Genie por 10 min (Szopinska *et al.*, 2016). O extrato proteico obtido foi centrifugado duas vezes a 4 °C, durante 10 min e 35.000 g e o sobrenadante obtido corresponde ao extrato proteico total. Foi realizada uma extração para cada tempo, T0, T90 e TF.

O extrato obtido foi concentrado de acordo com especificações do fabricante (GE-Healthcare) e adicionado em uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% e acetona na proporção de 1:1 e incubados a -20 °C over night. Após a incubação a solução foi centrifugada a 10.000 g por 15 min a 4 °C e o precipitado foi lavado em solução de acetona 80% duas vezes. Entre as lavagens o precipitado foi agitado por 1 min em vortex. O precipitado final foi ressuspensionado em tampão de extração e a quantificação das proteínas nos demais extratos foi realizada de acordo com Bradford (1976), via espectrofotometria utilizando GeneQuant com albumina sérica bovina como padrão.

A eletroforese bidimensional foi realizada utilizando o kit de limpeza 2D, seguindo as instruções do fabricante (GE Healthcare Handbook, 2005) e conforme descrito anteriormente por Rodrigues *et al.* (2015). Para isso, 500 µg de proteínas foram adicionadas a solução DeStreak completando um volume total de 340 µL, e distribuídas em uma tira de gel com gradiente de pH 3 a 10. A tira foi hidratada por 12 h a 25 °C e então realizada a focagem isoelétrica, onde foram colocadas em um IPGphor3 sob as seguintes condições: 1 step 500

V/8 h/0,5 kVh, 2 step 1000 V/1 h/ 0,8 kVh, 3 step 10.000 V/3 h/ 16.5 kVh e 4 step 10.000 V/ 0.20 h/ 3,2 kVh. Após a focalização foi realizado a alquilação das fitas, onde foram adicionados 5 mL de tampão I (25 mL de tampão II e 0,25 g de DTT) em cada fita e colocadas em agitador por 15 min. Em seguida, o tampão I foi descartado e 5 mL de tampão II (36 g de uréia, 5 mL de trizma base pH 8.8, 10 mL de SDS 20% e completado o volume para 100 mL com água milliQ) foi adicionado. As fitas foram colocadas novamente em agitador por 10 min. Foram realizadas duas lavagens com os dois tampões. Ao final da última lavagem as fitas foram adicionadas ao tampão III (25 mL de tampão II e 1g de iodoacetamida) e agitadas por 15 min.

A segunda dimensão foi realizada com géis 12,5% de acrilamida à temperatura de 15 °C. Em seguida, os géis foram colocados em um Multiphor II (GE Healthcare) sob duas fases. Na primeira fase foram expostos a 80 V/ 15 mA/ 1 W/ 1h e na segunda fase foram expostos a 500 V/ 60 mA/ 13 W/ 6h por gel. Após a eletroforese os géis foram corados por 72 h com solução Comassie blue G250, lavados com água milliQ e armazenados em solução de ácido acético 5% a 4 °C (Livramento *et al.*, 2017).

Os géis já corados foram digitalizados utilizando um scanner (ImageScanner, GE-Healthcare) e avaliados no software Ulmax MagicScan 4.6. As análises de imagem foram realizadas utilizando o software ImageMaster 2D Platinum 5.5 (GE-Healthcare). Para avaliar as diferenças entre os tratamentos, a abundância das proteínas entre os géis foi avaliada, utilizando como parâmetro a proteína normalizada e volume de spot (área do spot x sua intensidade (medida por densidade óptica)). Os spots de proteínas com alterações significativas foram considerados expressamente diferentes. Os spots de cada repetição foram avaliados utilizando a ANOVA ($P < 0,05$) e apenas os dados significativos com uma diferença de pelo menos 1,7 entre os tratamentos foram considerados (Livramento *et al.*, 2017).

Os spots obtidos foram excisados e adicionados a tubos eppendorfs contendo 350 µl de água por 5 minutos. Após isso, foram adicionados 190 µl de acetonitrila por 20 minutos. Esse processo foi realizado duas vezes e, em seguida, a acetonitrila foi removida e os tubos adicionados no speed vac por cerca de 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µl da solução de tripsina (33 ng/µl – 1,5 µM) diluída de forma a cobrir os spots. Essa solução foi mantida durante 60 minutos para a penetração da tripsina nos spots com consequente digestão proteica. Os tubos foram mantidos a 37 °C over night e, depois, foram adicionados 50 µl de ácido fórmico 5% + Acetonitrila 50%. As amostras foram ultrassonificadas por 10 minutos e vortexadas por 20 segundos. O líquido foi retirado e transferido para um tubo novo. Esse

processo foi repetido 3 vezes. Em seguida, as amostras foram levadas à rota evaporador até obtenção dos extratos concentrados e, posteriormente, foram adicionados 50 µl de acetonitrila 5% + ácido fórmico 0,1%.

2.5.1 Espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)

A separação por LC dos peptídeos trípticos foi realizada por cromatografia líquida de ultra performance. Foram injetados 40 µL das amostras (SIL-20A HT) em um sistema de HPLC composto por duas bombas (LC-20AD), um forno de colunas (CTO-20A) e um desgaseificador (DGU-20A3) (Shimadzu, Japão). A coluna utilizada foi uma C-18 de 150×2,1 mm, 2,7 µm, com pré-coluna (Supelco, Pensilvânia, EUA). A fase móvel consistiu de duas soluções de 0,1% de ácido fórmico em água (A) e em acetonitrila (grau LC-MS – Fluka, Buchs, Suíça). A eluição foi realizada com um fluxo de 200 µL.min⁻¹, conforme segue: 0–5 min: isocrático 5% B; 5–40 min: gradiente linear até 45% B; 40–45 min: isocrático 50% B; 45–47 min: gradiente linear até 10% B; 47–50 min: isocrático a 100% B; 50–55 min: isocrático a 5% B. Os peptídeos eluídos da coluna foram ionizados por eletrospray aplicando 4,5 kV e analisados por espectrometria de massas em tandem por meio de uma análise dependente de dados no sistema microTOF Q-II (Bruker Daltonik GmbH) operado em modo positivo. Os dados foram adquiridos no modo automático MS/MS, a faixa de massa no modo MS foi de 300–1800 m/z, estados de carga +2 a +4, máximo de 3 precursores por ciclo. Os dados obtidos por LC-MS/MS foram tratados com o software Bruker Data Analysis, versão 4.2 (Build 383.1). O espectro MS/MS obtido no intervalo de 5 a 30 minutos foi utilizado para busca no banco de dados por meio do software Biotoools versão 3.2 (Bruker Daltonik). O perfil de massa molecular da amostra, obtido por MS e MS/MS, foi submetido a uma análise comparativa usando o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) para realizar a comparação das massas dos peptídeos observados no banco de dados e, assim, determinar a identificação proteica mais provável. Os bancos de dados utilizados na análise foi o UniProt, na última versão disponível.

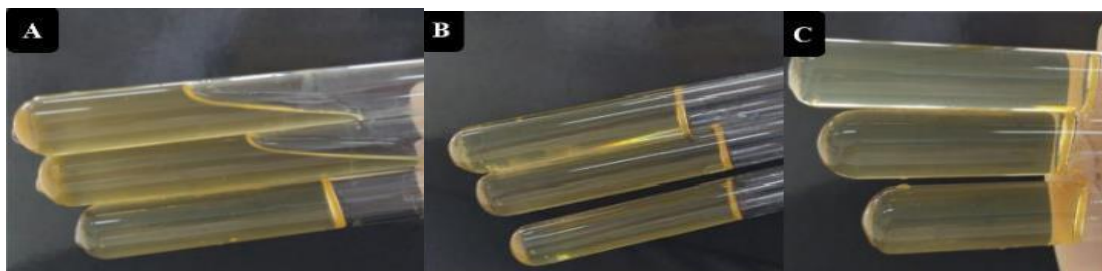
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos, publicado pela ANVISA, algumas análises de segurança devem ser realizadas incluindo as que os resultados apresentam a seguir.

3.1 Atividade gelatinase

A enzima gelatinase é produzida principalmente por microrganismos patogênicos, sendo capaz de degradar os componentes da matriz extracelular, bem como macromoléculas, incluindo caseína, gelatinas do tipo I, II, IV e V, fibronectina e proteoglicano (Zhao *et al.*, 2011). A gelatinase é classificada como uma metaloprotease hidrofóbica capaz de degradar proteínas como a hemoglobina, colágeno, insulina, caseína e gelatina. Essa protease já foi associada a virulência em espécies de *Enterococcus* (Goel & Halami, 2024). Portanto, a ausência desta enzima é um indicador de segurança e não citotoxicidade para que microrganismos possam ser utilizados como probióticos em alimentos. *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 não apresentaram atividade gelatinase. Apenas o microrganismo utilizado como controle positivo, *S. aureus* 3165, apresentou turbidez do meio e capacidade de liquefação (Figura 1)

Figura 1: Teste para avaliação da atividade de gelatinase para as leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14.



Legenda: Teste para atividade de gelatinase, em meio semi-sólido, após 15 dias a 37 °C. Em A- Duplicata do controle positivo *S. aureus* 3165 mostrando a liquefação do meio após o banho de gelo em comparação com o controle negativo, B- Triplicata da levedura *K. lactis* B10, C- Triplicata da levedura *T. delbrueckii* B14.

Fonte: Do autor (2025).

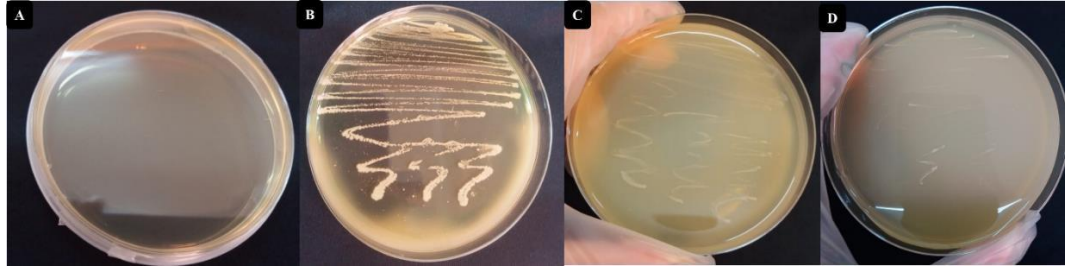
3.2 Teste de Dnase

Segundo Hasegawa *et al.* (2010), a produção de DNase extracelular está intimamente associada a fatores de patogenicidade, pois eles permitem a disseminação do patógeno, além de contribuir para a evasão da resposta imune. Geralmente, essa enzima é observada em microrganismos isolados de ambientes clínicos de pacientes imunossuprimidos. Entre as espécies de leveduras que apresentam essa atividade estão as leveduras *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *Candida albicans* (Fernandez-Pacheco *et al.*, 2021).

K. lactis B10 e *T. delbrueckii* B14 não apresentaram atividade da desoxirribonuclease em nenhuma das temperaturas testadas, o que as tornam interessantes e seguras para a

indústria de alimentos. Apenas o controle positivo contendo *S. aureus* Saur ATCC 33592 apresentou a formação de halos claros ao redor das colônias (Figura 2).

Figura 2: Teste de atividade de DNase para as leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14.



Legenda: Teste de atividade de DNase após 48 horas. As leveduras foram incubadas a 28 °C e o controle positivo a 37 °C. Em A: controle negativo; B: controle positivo (bactéria *Staphylococcus aureus* Saur ATCC 33592); C: *K. lactis* B10; D: *T. delbrueckii* B14.

Fonte: Do autor (2025).

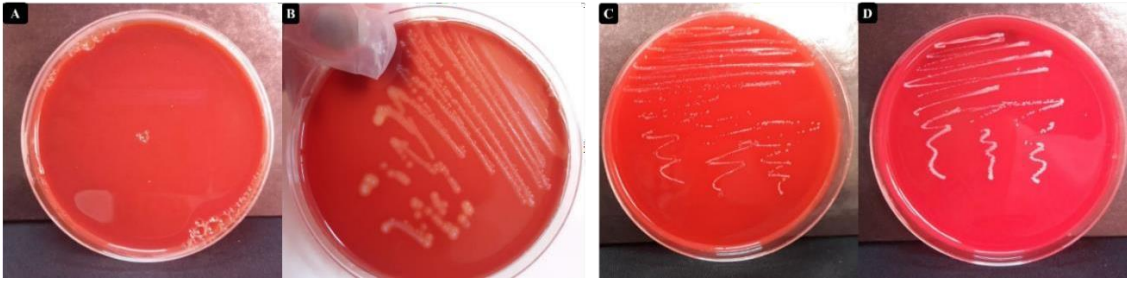
3.3 Teste de hemólise

A atividade hemolítica é caracterizada pela destruição prematura das hemácias causada pela ruptura da membrana plasmática, resultando na liberação de hemoglobina. Algumas bactérias patogênicas adquirem ferro por meio da capacidade hemolítica, o que resulta em anemia ou, até mesmo, edema ao hospedeiro (Dang *et al.*, 2024).

A reação hemolítica é classificada em α -hemólise, β -hemólise e γ -hemólise, de acordo com a intensidade da quebra das hemácias. A α -hemólise é caracterizada pela perda parcial das hemácias formando halos verdes ao redor das colônias. Por outro lado, a perda total das hemácias é classificada como β -hemólise, formando halos de hidrólise claros (Dang *et al.*, 2024).

As leveduras não apresentaram atividade enzimática (hemolisina) (Figura 3) e esses resultados foram consistentes com os achados por Fernandez-Pacheco *et al.* (2021), que avaliaram a produção de hemolisina por 20 cepas de leveduras incluindo *K. lactis*, com resultado negativo para todos os isolados. No presente trabalho, o controle positivo demonstrou a atividade enzimática identificados pelos halos claros bem evidentes, como era esperado. Não se conhece atividade tardia de hemolisina após 72 horas. Portanto, o uso dessas leveduras como culturas probióticas não representa risco para atividade hemolítica.

Figura 3: Teste de atividade hemolítica para as leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14.



Legenda: Teste de atividade hemolítica em ágar sangue suplementado com 5% de sangue bovino, após 72 horas. Em A: controle negativo; B: controle positivo (*S. pneumoniae* 40619); C: *K. lactis* B10; D: *T. delbrueckii* B14).

Fonte: Do autor (2025).

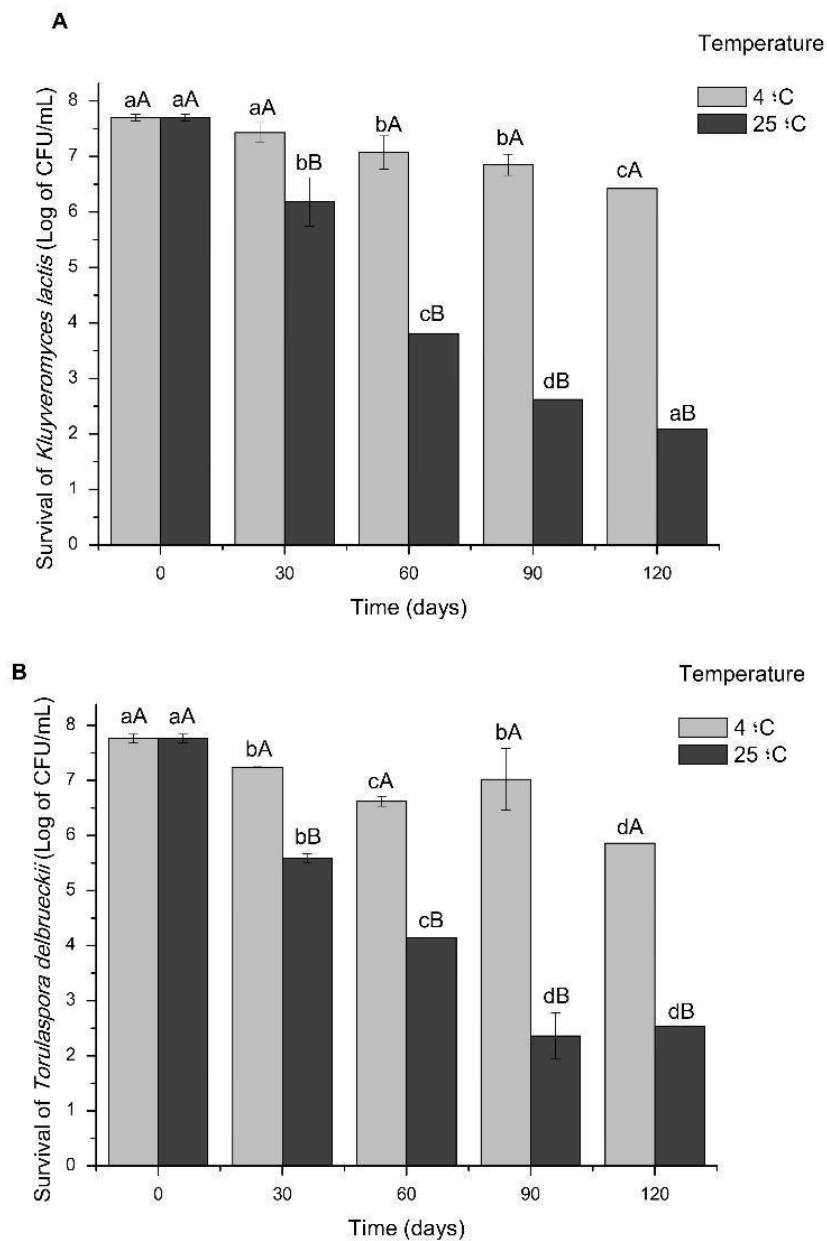
3.4 Preservação de *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 por liofilização

As células liofilizadas das leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 foram analisadas quanto à taxa de sobrevivência durante 120 dias de armazenamento, nas temperaturas de ambiente e de 4 °C.

As populações iniciais *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14, logo após a liofilização, foram de $3,04 \times 10^7$ UFC/ml e $3,44 \times 10^7$ UFC/ml, respectivamente, demonstrando que as leveduras foram capazes de sobreviver ao estresse submetido durante o processo de liofilização que envolve o congelamento com posterior desidratação.

Segundo Bolla *et al.* (2011) culturas com concentrações iguais ou superiores a 10^7 UFC/ml para liofilização, apresentam maiores chances de sucesso. Essas concentrações garantem que células suficientes permaneçam após o processo e, conseqüentemente, armazenamento em longo prazo, proporcionando reativação bem-sucedida da cepa. A viabilidade de *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 durante 120 dias de armazenamento está representada na Figura 4.

Figura 4: Sobrevivência das leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 liofilizadas ao longo de 120 dias armazenadas em temperatura ambiente (25°C) e 4°C.



Legenda: Sobrevivência das leveduras *K. lactis* B10 (A) e *T. delbrueckii* B14 (B) liofilizadas em leite UHT (Valores expressos em log/mL) ao longo de 120 dias de armazenamento nas temperaturas de 4 °C e ambiente. Letras minúsculas expressam a diferenças nas temperaturas de 4 °C e ambiente no mesmo tempo. Letras maiúsculas expressam a diferença entre os tempos na mesma temperatura. Letras distintas indicam diferença significativa de acordo com o teste Scott Knott a 0,05% de significância.

Fonte: Do autor (2025).

Foi possível observar que as células de *K. lactis* B10 apresentaram maior taxa de viabilidade na temperatura de 4 °C e se mantiveram estáveis até 30 dias de armazenamento (7,43 Log de UFC/mL). Aos 120 dias a população apresentou uma redução (6,42 Log de UFC/mL), mas ainda assim demonstrou boa estabilidade com uma taxa de sobrevivência de

83,38% com relação a população do tempo 0 (7,70 Log de UFC/mL). No entanto, em temperatura ambiente, a viabilidade foi afetada pelo tempo. A população observada, aos 30 dias, foi de 6,18 Log de UFC/mL e taxa de sobrevivência de 80,25% em relação a população inicial. No entanto, aos 120 dias, a viabilidade caiu para 27,14% (Figura 4A).

Para a *T. delbrueckii* B14 os resultados foram similares com maior viabilidade aos 4 °C. A população de *T. delbrueckii* B14, aos 120 dias de armazenamento, foi de 5,86 Log de UFC/mL, o que representa uma viabilidade de 75,51% em relação a população inicial (7,76 Log de UFC/mL). Na temperatura ambiente, no entanto, a viabilidade aos 120 dias, foi de 32,60% (Figura 4B).

A utilização de crioprotetores é uma técnica adotada a fim de melhorar a viabilidade de leveduras e bactérias durante processos de secagem como a liofilização (Silva *et al.*, 2025). De acordo com Ge *et al.* (2024), embora a liofilização a vácuo seja capaz de preservar a estrutura natural das células microbianas, a formação de cristais de gelo durante o processo pode impactar a integridade celular, o que pode causar a morte do microrganismo. Diferentes substâncias têm sido utilizadas como crioprotetores. O leite possui proteínas, lactose, sais minerais e vitaminas, e tem sido utilizado como agente crioprotetor, atuando contra a formação de cristais de gelo e oxigênio (Chen *et al.*, 2023; Ge *et al.*, 2024). Essas características se devem, principalmente, à proteína do soro, que imobiliza as enzimas liofilizadas, e à lactose que previne contra os danos, estabilizando os componentes da membrana celular (Chen *et al.*, 2023). Portanto, os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que a utilização do leite contribuiu para a maior viabilidade das cepas.

Bolla *et al.* (2011) e Ale *et al.* (2015) também demonstraram maior viabilidade das leveduras isoladas de vinho e de kefir na temperatura de 4 °C em contraste com àquelas armazenadas em temperatura ambiente (25 °C). Do mesmo modo, Guowei *et al.* (2019) encontraram maiores constantes para inativação das leveduras quando as mesmas foram liofilizadas e armazenadas a 4°C, enquanto àquelas armazenadas em temperatura ambiente apresentaram menores constantes de inativação.

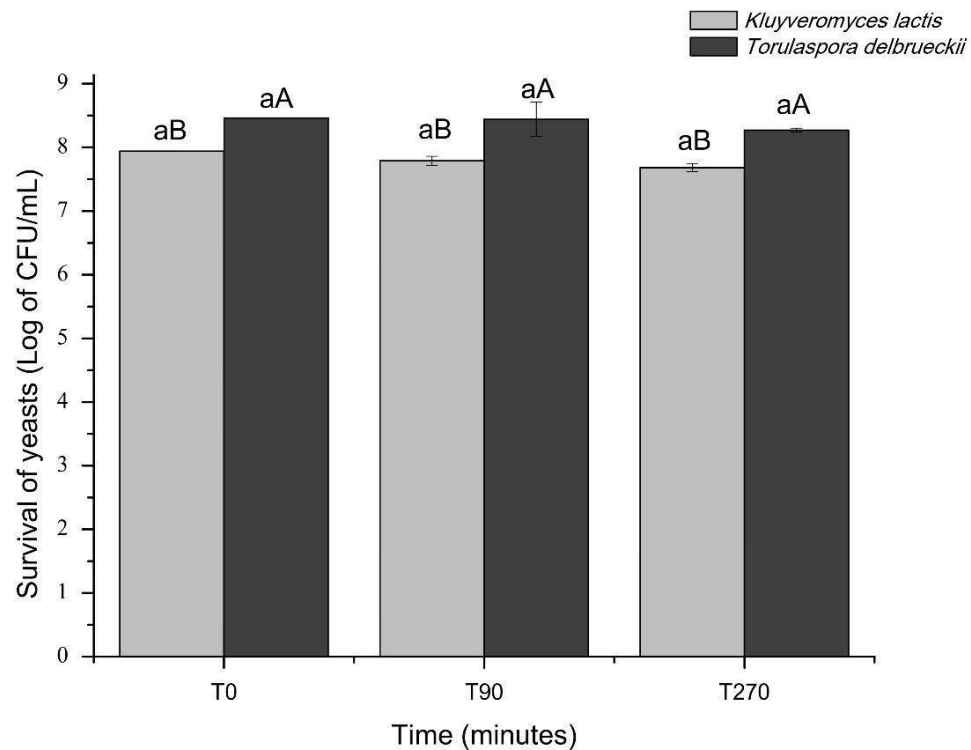
Fredua-Agyeman *et al.* (2024) e Ge *et al.* (2024) avaliaram a influência de diferentes crioprotetores, incluindo leite desnatado, no processo de liofilização de *Lactobacillus acidophilus* nas temperaturas de 4 °C e 25 °C. Esses autores observaram maior viabilidade quando o microrganismo foi mantido a 4 °C. Na temperatura ambiente, a viabilidade manteve-se sem redução significativa apenas até os 14 dias. Segundo esses

autores, a perda da viabilidade durante o armazenamento na temperatura ambiente pode ser atribuída a fatores como atividade de água e ausência de componentes antioxidantes. Além disso, foi demonstrado que a concentração do leite também influencia. Elevadas concentrações de leite desnatado (acima de 10%) podem aumentar a pressão osmótica ocasionando no extravasamento do conteúdo celular, o que não foi observado no presente trabalho. Esses resultados sugerem que a concentração do leite, apesar de não ter sido um atributo analisado, foi ideal para a análise. Portanto, a permanência da viabilidade das cepas de *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14, observadas durante o condicionamento de longo prazo contribuiu para as mesmas serem candidatas a futuras aplicações na indústria de probióticos.

3.5 Avaliação da viabilidade das leveduras liofilizadas após a passagem pelo TGI simulado

A resistência a componentes do sistema gastrointestinal como pepsina, pancreatina, lisozima e sais biliares em temperaturas fisiológicas é uma das características mais importantes para caracterizar um microrganismo como probiótico, pois permite que ele resista à passagem pelo trato gastrointestinal humano (Li *et al.*, 2021). De acordo com Chou & Weimer (1999), o principal estresse que precisa ser tolerado pelo microrganismo começa no estômago devido ao pH que pode chegar a 1,5. Após isso, o microrganismo alcança a primeira porção do intestino onde precisa tolerar a bile. No entanto, esta apresenta concentração variável e difícil de prever. Alguns trabalhos mais recentes, no entanto, já relatam uma faixa de bile que varia entre 0,3 a 0,6% (Helmy *et al.*, 2021). Só após percorrer esse caminho, o microrganismo coloniza o intestino inferior. Para isso, o microrganismo precisa tolerar ácidos, sais biliares e ser capaz de fixar-se no epitélio intestinal. No presente trabalho, *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 apresentaram alta viabilidade quando submetidas ao pH 3,0. Foram observadas populações de *K. lactis* B10 de 7,95 Log de UFC/mL no tempo 0 e, após 90 minutos de exposição às condições estomacais simuladas, a população foi de 7,79 Log de UFC/mL, representando uma sobrevivência de 97,98%. Aos 270 minutos, que corresponde ao tempo necessário para a passagem do microrganismo pelo trato intestinal superior, a população de 7,68 Log de UFC/mL correspondeu a taxa de sobrevivência de 96,72%. Para *T. delbrueckii* B14 os resultados foram semelhantes, aos 90 minutos a sobrevivência foi de 99,76% e aos 270 minutos de 97,75 % das células em relação ao tempo 0 (de 8,46 Log de UFC/mL) (Figura 5).

Figura 5: Sobrevivência das leveduras *Kluyveromyces lactis* B10 e *Torulaspora delbrueckii* B14 durante a passagem pelo TGI simulado.



Legenda: Sobrevivência das leveduras *Kluveromyces lactis* B10 e *Torulaspora delbrueckii* B14 em Log/mL (média \pm desvio padrão experimental) ao longo do tempo nas condições simuladas do trato gastrointestinal. Letras iguais significam ausência de diferença significativa de acordo com o teste Scott Knott a 0,05% de significância.

Fonte: Do autor (2025).

Além disso, alguns trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa já descreveram a capacidade de *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 de co-agregação com patógenos como *Salmonella Typhimurium*, auto agregação, hidrofobicidade, antagonismo contra bactérias patogênicas e resistência a antibióticos, o que demonstra que esses microrganismos possuem potencial para utilização como probióticos (Andrade *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2021).

Assim como no presente trabalho, Li *et al.* (2021) e Diguță *et al.* (2023) também avaliaram a sobrevivência de cepas de leveduras incluindo *K. lactis* e *T. delbrueckii* e encontraram taxas de aproximadamente 85% e 99% de sobrevivência. Bitew *et al.* (2024) também avaliaram a sobrevivência de 11 isolados de leveduras a condições intestinais simuladas. Esses autores, no entanto, demonstraram que nenhum dos isolados foi capaz de sobreviver ao pH 1,5 embora a sobrevivência de alguns em pH 2,0 tenha sido significativa (62,5%). Esses resultados estão em discordância com os encontrados por outros autores que

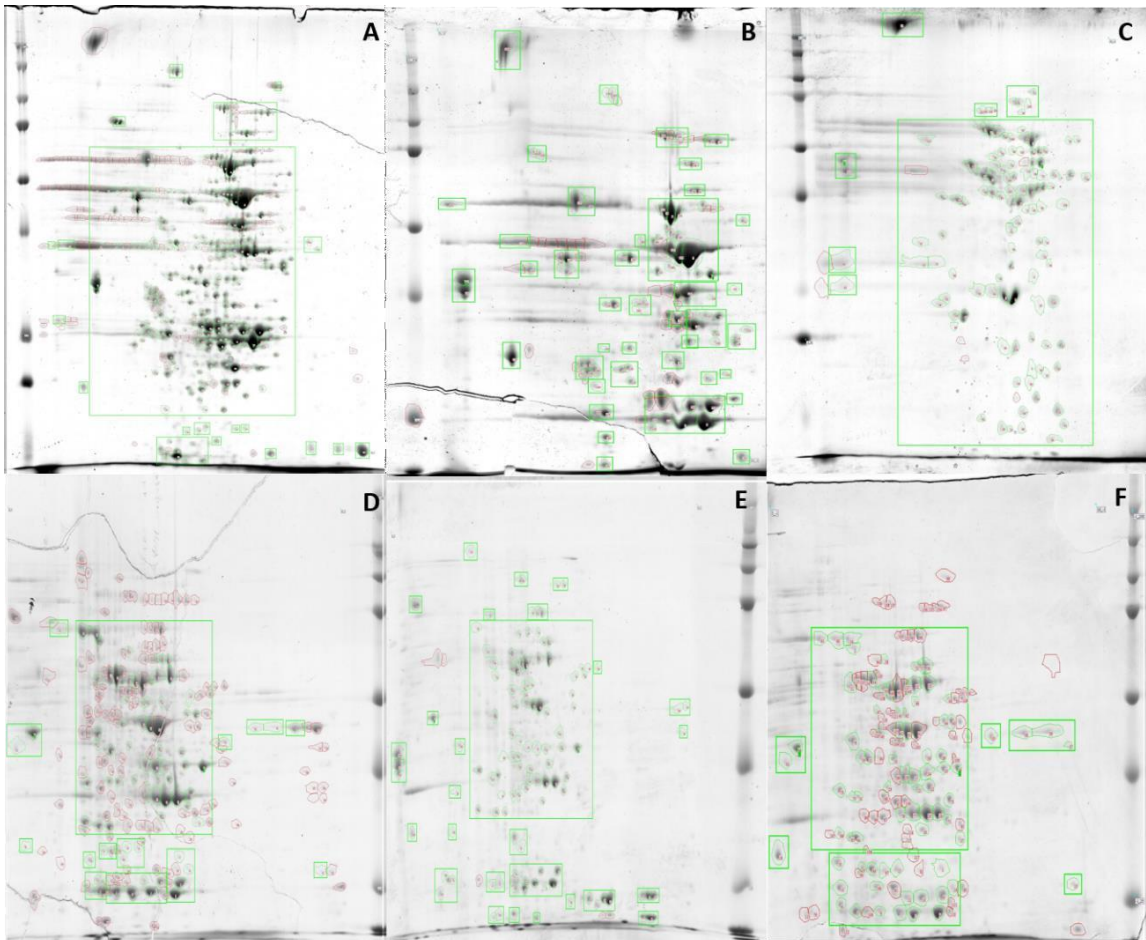
demonstraram a tolerância de algumas espécies de leveduras (Diguță *et al.*, 2023) ao pH 1,5. Segundo Bitew *et al.* (2024), essas diferenças podem ocorrer devido às variações entre as linhagens, fontes de isolamento, conteúdo da parede celular, conteúdo lipídico, assim como genes de resistência a acidez.

A sobrevivência dessas leveduras em pH baixo, apresentadas nas condições simuladas, pode ser justificada devido à sua adaptação ao queijo Canastra, do qual foram isoladas, aliada a um substrato naturalmente ácido devido à coexistência com bactérias lácticas, como visto nos trabalhos de Andrade *et al.* (2017) e Andrade *et al.* (2019).

3.6 Análise proteômica

De acordo com a análise estatística, 511 proteínas foram expressas diferencialmente ($p < 0,05$) para as duas leveduras, sendo 141 referentes à levedura *K. lactis* B10 e 370 referentes a *T. delbrueckii* B14. As proteínas nos géis foram avaliadas comparando os três tempos entre si, T0 x T90, T0 x T270, T90 x 270, que correspondem ao tempo antes da exposição às condições gastrointestinais (T0), após a exposição às condições estomacais (T90) e após a passagem completa pelo trato gastrointestinal (T270). A Figura 6 ilustra os perfis típicos de proteínas encontrados para as duas leveduras estudadas.

Figura 6: Imagens de gel 2DE para perfil de expressão das proteínas de *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 expressas sob condições gastrointestinais simuladas.



Legenda: Em **A:** Proteoma de *K. lactis* B10 no T0, **B:** Proteoma de *K. lactis* B10 no T90, **C:** Proteoma de *K. lactis* B10 no TF, **D:** Proteoma de *T. delbrueckii* B14 no T0, **E:** Proteoma de *T. delbrueckii* B14 no T90, **F:** Proteoma de *T. delbrueckii* B14 no TF.

Fonte: Do autor (2025).

Com relação a levedura *K. lactis* B14, quando comparados os tempos T0 e T90, constatou-se que 23 proteínas foram encontradas em ambos os tempos, enquanto 25 proteínas foram encontradas no T0 e 4 foram encontradas somente ao final do TGI simulado (T90). Quando comparados os tempos T0 e TF, foram encontradas 16 proteínas em comum, 74 apenas no T0 e nenhuma proteína foi observada após a passagem completa pelo TGI (TF). Nenhuma proteína em comum foi encontrada ao comparar os tempos T90 e TF (Tabela 1).

Ao analisar o proteoma da levedura *T. delbrueckii* B14, foram encontradas 9 proteínas em comum nos tempos T0 e T90, 73 proteínas apenas no T0 e 24 proteínas apenas no T90. Ao comparar os tempos T0 e TF, haviam 23 proteínas em comum em ambos os tempos, 83 somente no T0 e 48 proteínas somente no TF. Quando comparados

Tabela 1. Proteínas em *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14, expressas sob condições de estresse gastrointestinal, com seus códigos de identificação e suas respectivas funções.

<i>Kluyveromyces lactis</i> T0 = TF				<i>Torulaspora delbrueckii</i> T0 =TF		
Identification	Homologous Protein	Function		Identification	Homologous Protein	Function
25	Phosphopyruvate hydratase	Carbohydrate metabolism		54	Pyruvate decarboxylase	Carbohydrate metabolism
13	Pyruvate kinase	Carbohydrate metabolism		65	Inorganic Pyrophosphatase	Hydrolase
26	Phosphopyruvate hydratase	Carbohydrate metabolism		15	Glucan 1,3 beta glucosidase	Carbohydrate metabolism
3	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism		40	Adenosylhomocysteinase	Hydrolase
14	Aglutinin-like protein n-terminal domain contain protein	Cell wall surface glycoprotein		11	Phosphoglycerate mutase	Carbohydrate metabolism
7	Superoxidase dismutase	Control of oxidative stress		33	Hybrid PKS-NRPS synthetase	Mycotoxin biosynthesis
9	Peptidyl-propyl cis trans isomerase	Peptide metabolism		59	Heat shock protein 70 OS	Stress response
29	s-adenosylmethionine synthase	Amino acid metabolism		66	Phosphopyruvate hydratase	Carbohydrate metabolism
27	Heat Shock protein SSC1, mitochondrial	Transport		34	Heat shock protein 70 OS	Stress response
22	Unidentified protein			72	NADP-dependent oxidoreductase domain containing protein	Oxidoreductase
15	Cytochrome b-c1 complex subunit 2 mitochondrial	Electron transfer (cellular respiration)		9	Phosphoglycerate mutase	Carbohydrate metabolism

23	NADH: flavin oxidoreductase	Oxidoreductase		37	Phosphoglycerate kinase	Carbohydrate metabolism
0	NADH: flavin oxidoreductase	Oxidoreductase		12	Uncharacterized protein	
6	Peptidase A1 domain containing protein	Protein metabolism		2	Non-chaperonin molecular chaperone ATPase	Protein metabolism
18	Uncharacterized protein			44	6-Phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Oxidoreductase
21	Uncharacterized protein			76	S-adenosylmethionine synthase	Transferase
				91	Phosphopyruvate hydratase	Carbohydrate metabolism
				67	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism
				60	Heat shock protein 70 OS	Stress response
				6	Cytochrome P450 monooxygenase ACLC	Oxidoreductase
				52	Pyruvate kinase	Carbohydrate metabolism
				22	NAD-dependent epimerase	Oxidoreductase
				21	Hybrid PKS-NRPS synthetase	Mycotoxin biosynthesis
				26		

Kluyveromyces lactis T0 = T90

Torulaspota delbrueckii T0 = T90

Identification	Homologous Protein	Function		Identification	Homologous Protein	Function
----------------	--------------------	----------	--	----------------	--------------------	----------

53	5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate-homocysteine S-methyltransferase	Amino acid metabolism		74	PPM-type phosphatase domain containing protein	Hydrolase/Protein phosphatase
24	Triosephosphate isomerase	Carbohydrate metabolism		78	Hybrid PKS-NRPS synthetase	Mycotoxin biosynthesis
2	L-xilulose reductase	Carbohydrate metabolism		13	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism
46	SHSP domain-containing protein	Stress response		75	SH3 domain containing protein	Trafficking and modification of clathrin-coated vesicles
84	Triosephosphate isomerase	Carbohydrate metabolism		36	NADP-dependent oxidoreductase domain containing protein	oxidoreductase
20	Glucose 6 phosphate isomerase	Carbohydrate metabolism		44	alcohol dehydrogenase	Oxidoreductase
4	Peptidase A1 domain-containing protein	Peptide metabolism		40	uncharacterized protein	
58	Peptidase S8/S53 domain-containing protein	Peptide metabolism		26	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism
63	Phosphopyruvate hydratase	Carbohydrate metabolism		21	unidentified protein	
59	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism				
76	Heat shock protein 70	Stress response				
68	uncharacterized protein					
95	Hybrid PKS NRPS	Mycotoxin biosynthesis				
75	Triosephosphate isomerase	Carbohydrate metabolism				

62	uncharacterized protein					
11	glucan 1,3 betaglucosidase	Carbohydrate metabolism				
81	DNA topoisomerase	DNA replication				
86	Carboxylic ester hydrolase	Catalyzes hydrolysis reactions				
178	Glucose 6 phosphate isomerase	Carbohydrate metabolism				
17	Glucose 6 phosphate isomerase	Carbohydrate metabolism				
65	Inorganic pyrophosphatase	Hydrolase				
18	Carboxypeptidase	Protein metabolism				
60	Unidentified protein					

Kluyveromyces lactis T90 = TF*Torulaspota delbrueckii* T90 =TF

Identifi cation	Homologous Protein	Function		Identification	Homologous Protein	Function
				13	Heat shock protein	Stress response
				39	Phosphopyruvate hydratase	Carbohydrate metabolism
				21	Glucan 1,3 beta glucosidase	Carbohydrate metabolism
				47	Glucose 6 phosphate isomerase	Carbohydrate metabolism

				23	Phosphopyruvate hydratase	Carbohydrate metabolism
				72	Pyruvate decarboxylase	Carbohydrate metabolism
				9	NAD(p) h-hydrate epimerase	Repair
				67	Unidentified protein	
				71	Pyruvate decarboxylase	Carbohydrate metabolism
				3	Triosephosphate isomerase	Carbohydrate metabolism
				4	Protein HR11	No function described
				44	alcohol dehydrogenase	Oxidoreductase
				45	Pyruvate decarboxylase	Carbohydrate metabolism
				29	Heat shock protein	Stress response
				57	Transketolase	Transferase
				31	Heat shock protein	Stress response

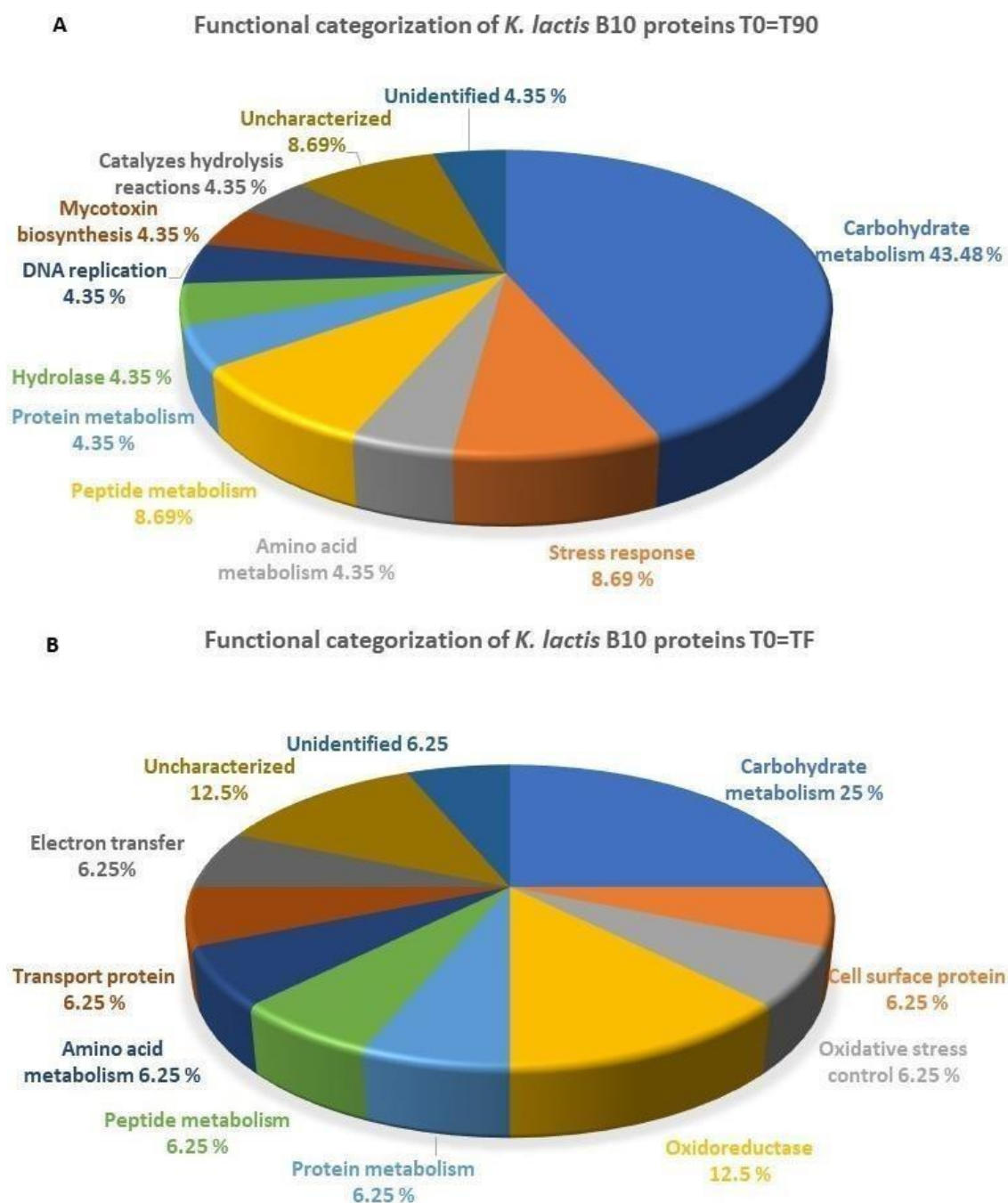
Fonte: Do autor (2025)

os tempos T90 e TF, foram encontradas 16 proteínas em comum, 33 somente no T90 e 56 proteínas somente no TF.

Dentro desse contexto, pode-se verificar que durante a passagem das leveduras pelo TGI, algumas proteínas se mantiveram estáveis sendo encontradas em todos os tempos de avaliação, demonstrando que estas proteínas são relevantes no contexto da capacidade das leveduras de resistir às condições adversas mantendo as células viáveis durante toda a simulação. De modo geral, as leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 apresentaram um proteoma bastante similar, demonstrando que as proteínas relacionadas à resposta ao estresse gastrointestinal são conservadas mesmo em espécies distintas. A expressão de proteínas no início da passagem pelo TGI (T0), ao final de 90 (T90) e 270 (TF) minutos, que correspondem aos tempos necessários para o microrganismo atravessar todo o conteúdo estomacal e intestinal, indica que essas proteínas apresentam importância na geração de respostas ao estresse, uma vez que a expressão contínua de proteínas representa gasto metabólico para a célula microbiana, o que não é vantajoso a não ser que sua função seja necessária. Portanto, as proteínas expressas nessas condições representam e podem elucidar mecanismos envolvidos na resposta ao estresse gastrointestinal. Conforme apresentado na Tabela 1, as leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 respondem ao estresse ácido e biliar através do aumento na expressão de proteínas de choque térmico (HSPs), chaperonas moleculares (chaperona molecular não chaperonina ATPase), peptidases (carboxipeptidase, proteína contendo domínio peptidase A1 e proteína contendo domínio peptidase S8/S53) oxidoredutases (álcool desidrogenase, NADH: flavina oxidoredutase), proteínas do metabolismo da glicose (gliceraldeído-3-fosfato, glicose-6-fosfato, piruvato quinase, piruvato descarboxilase, entre outras), proteínas do metabolismo de aminoácidos (S-adenosilmetionina sintase, S-metiltransferase), hidrolases (pirofosfatase inorgânica, adenosilhomocisteinase), transferência de elétrons (Subunidade 2 do complexo citocromo mitocondrial), proteínas de superfície celular (proteína semelhante à aglutinina contendo o domínio n-terminal), proteínas de transporte (proteína contendo o domínio SH3), de replicação do DNA (DNA topoisomerase) e micotoxinas (PKS-NRPS). De modo geral, *K. lactis* B10 apresentou maior diversidade de proteínas enquanto *T. delbrueckii* B14 apresentou maior frequência das proteínas expressas.

Para categorizar funcionalmente as proteínas, os IDs das proteínas identificadas foram pesquisados no banco de dados UniProt, e as proteínas foram atribuídas a diferentes funções celulares (Figura 7 e 8).

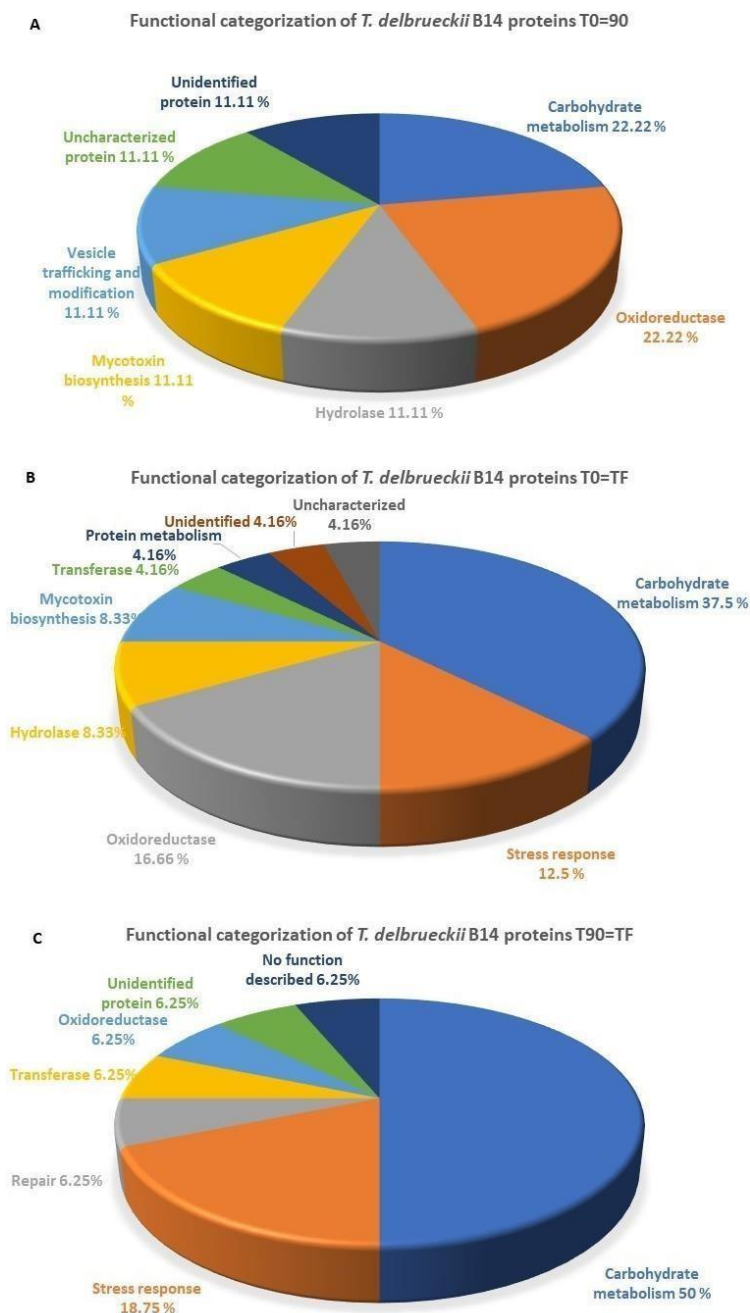
Figura 7: Categorização funcional das proteínas de *K. lactis* B10 identificadas em comum nos tempos T0=T90 e T0=TF como resposta às condições gastrointestinais simuladas.



Legenda: Categorização funcional das proteínas de *K. lactis* B10 identificadas sob estresse causado pela passagem pelo TGI. Em A: proteínas similares encontradas no tempo 0 e no tempo final; Em B: proteínas similares encontradas após 90 minutos e no tempo final, após passagem completa pelo TGI.

Fonte: Do autor (2025).

Figura 8: Categorização funcional das proteínas de *T. delbrueckii* B14 identificadas em comum nos tempos T0=T90, T0=TF e T90=TF como resposta às condições gastrointestinais simuladas.



Legenda: Categorização funcional das proteínas de *T. delbrueckii* B14 identificadas sob estresse causado pela passagem pelo TGI. Em A: proteínas similares encontradas no tempo 0 e no tempo final; Em B: proteínas similares encontradas no tempo 0 e após 90 minutos de exposição às condições gastrointestinais simuladas; Em C: proteínas similares encontradas após 90 minutos e ao final da passagem pelo TGI.

Fonte: Do autor (2025)

A sobrevivência de leveduras a condições de estresse do TGI é um dos principais desafios para a seleção de novas linhagens probióticas. O conhecimento de mecanismos moleculares envolvidos na resistência ao TGI pode levar a pesquisas com o objetivo de aumentar a frequência de expressão de genes favoráveis em leveduras, através da engenharia genética, para serem futuramente comercializadas. Segundo Bustos *et al.* (2015), proteínas relacionadas com a resposta geral ao estresse são altamente conservadas em microrganismos. Essas proteínas, geralmente desempenham funções relacionadas a maturação de novas proteínas bem como o redobramento ou degradação de proteínas desnaturadas e no reparo de DNA. No presente estudo, algumas proteínas de resposta ao estresse, como Heat Shock Protein (HSPs), foram encontradas antes e após a passagem completa pelo TGI simulado de ambas as leveduras, com maior abundância sendo observada na levedura *T. delbrueckii* B14 (Tabela 1). Além dessas, foi observada a presença de uma chaperona na levedura *T. delbrueckii* B14 antes e após a passagem completa pelo TGI. As HSPs têm como principal função a proteção da célula em situações de estresse que possa ocasionar desnaturação proteica, o que está de acordo com o presente trabalho onde as leveduras foram submetidas a condições de baixo pH, um fator que pode ocasionar a desnaturação de proteínas microbianas (Morales-Amparano *et al.*, 2019).

Em condições normais e de estresse, as proteínas com função de chaperonas regulam o dobramento de substratos e protegem a célula dos danos causados pela baixa temperatura (Baig *et al.*, 2022). No entanto, já foi demonstrado que essas proteínas também podem ser reguladas positivamente durante a exposição ao estresse associado a concentrações elevadas de NaCl, ácidos ou bile em algumas espécies de *Lactobacillus* (Chen *et al.*, 2017). É comum que essas proteínas estejam envolvidas na hidrólise do ATP, gerando energia para a estabilização de outras proteínas essenciais à célula (Goloubinoff *et al.*, 2018).

Assim como no presente trabalho, Alcantara *et al.* (2012) também encontraram e correlacionaram as chaperonas ao estresse após exposição de *Lactobacillus* a bile. Esses resultados estão de acordo com o presente estudo em que mesmo no tempo final de análise (após serem submetidas aos ácidos biliares), as leveduras apresentaram proteínas relacionadas ao estresse.

Enzimas relacionadas com o metabolismo de proteínas foram, principalmente, observadas em *K lactis* B10 ao longo de toda a passagem pelo TGI (Tabela 1). As

enzimas: Proteína contendo domínio peptidase (4 e 6), Carboxipeptidase (18) e a Proteína contendo domínio peptidase S8/S53 (58), estão envolvidas principalmente na degradação de proteínas intracelulares. Enquanto a proteína Peptidil-prolil cis trans isomerase (9) está envolvida em processos de dobramento pós tradução (Tabela 1). A presença de proteases tem sido associada a adaptação ao estresse ocasionado pelo ácido ou bile. Em seu trabalho, Na *et al.* (2014) observaram a regulação positiva na transcrição de genes com função de proteólise. Segundo esses autores, esses genes foram altamente transcritos sob condições de estresse biliar ocasionando a degradação de proteínas danificadas bem como sua reutilização.

Foi observada uma proteína relacionada com a síntese de aminoácidos ao longo de toda a exposição ao TGI pela levedura *K. lactis* B10, a adenosilmetionina sintetase, que já foi descrita anteriormente por Lee *et al.* (2008). De acordo com esses autores essa proteína está envolvida entre outras funções, com a síntese de poliamina e processos de metilação. As poliaminas atuam como reguladores de crescimento, estabilizam estruturas ribossômicas, controlam a tradução e promovem a estabilidade da membrana. Dessa forma um microrganismo exposto a condições como a presença de bile pode expressar determinadas proteínas a fim de conferir maior estabilidade aos componentes celulares. Segundo Budin-Verneuil *et al.* (2005), a presença de proteínas relacionadas com a síntese de aminoácidos durante a passagem pelo TGI pode refletir uma limitação da célula em absorver aminoácidos devido à inativação dos sistemas de transporte devido ao pH ácido. Além disso, a síntese de aminoácidos pode estar relacionada com a regulação do pH intracelular e pode atuar como um crioprotetor, o que poderia explicar a presença dessa enzima antes da exposição ao TGI concomitante ao processo de liofilização (Liu *et al.*, 2021).

Oxidoredutases foram encontradas, principalmente, no início e ao final da passagem completa pelo TGI de ambas as leveduras. No entanto, também foi observada aos 90 minutos com menor abundância. Segundo Wang *et al.* (2020), a exposição à bile ou pH ácidos podem causar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) o que interfere na maquinaria celular podendo causar danos irreversíveis. Para isso, algumas proteínas com função de neutralização desses radicais livres podem ser recrutadas. De acordo com esses autores, resíduos de metionina em proteínas são facilmente oxidados por diversas espécies reativas formando metionina sulfóxido, que pode ser reduzido de volta a metionina por algumas oxidoredutases. No caso das oxidoredutases dependentes

de NAD encontradas no presente trabalho, sua função está mais intimamente relacionada ao processo de geração de energia necessário para desempenhar funções de homeostase celular sob condições de estresse (Ali *et al.*, 2020).

A transferência de elétrons, outro processo relacionado com a produção de energia, foi indiretamente observada através da presença da proteína: complexo citocromo b-c1 subunidade 2 mitocondrial durante toda a passagem da levedura *K. lactis* B10 pelo TGI. A transferência de elétrons está associada à manutenção do gradiente de prótons que evita que o pH intracelular seja afetado sob as condições de acidez ou bile presente no meio, o que explica o aparecimento dessas proteínas ao longo de toda a simulação (Koskeniemi *et al.*, 2011).

As proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos foram observadas ao longo de toda a passagem pelo TGI em ambas as leveduras. As principais funções das proteínas identificadas estão relacionadas ao catabolismo da glicose. Apenas uma enzima, a fosfopiruvato hidratase, catalisa uma reação reversível estando associada, portanto, ao catabolismo e ao anabolismo. Foi possível observar que a *T. delbrueckii* B14 apresentou maior diversidade de enzimas glicolíticas, com três enzimas sendo identificadas apenas nessa levedura (piruvato descarboxilase, fosfoglicerato mutase e fosfoglicerato quinase). Por outro lado, apenas a *K. lactis* B10 foi capaz de produzir a enzima L-xilulose redutase, o que pode refletir a tentativa de diversificação da fonte de carbono para ampliar a produção de energia (Budin-Verneuil *et al.*, 2005). An *et al.* (2014) e Wang *et al.* (2020), demonstraram, através de suas pesquisas, que durante o estresse ocasionado pela exposição à bile, houve um aumento no estímulo ao catabolismo de carboidratos. Além disso, esses autores demonstraram a regulação positiva e a transcrição de genes relacionados à produção de enzimas que catalisam a interconversão de xilose e xilulose, através da qual esses substratos entram na via glicolítica.

A regulação positiva para produção das enzimas associadas à via glicolítica é essencial para a produção de intermediários ricos em energia como o ATP e o NADH, fornecendo o aparato necessário para a sobrevivência do microrganismo sob o estresse do TGI, fator crítico para a manutenção das funções celulares (Chen *et al.*, 2017; Lau *et al.*, 2025).

Em *K. lactis* B10 foi observada a presença de uma glicoproteína de superfície celular durante toda a passagem pelo TGI. Essa proteína é conhecida por promover a adesão da célula fúngica ao hospedeiro, o que pode ser vantajoso dependendo do microrganismo em que essa proteína é identificada (Oh *et al.*, 2019; Donohue *et al.*, 2011). No caso de *K. lactis* B10, diversas pesquisas já demonstraram seu potencial de adesão e colonização ao epitélio do hospedeiro (Andrade *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2021). Proteínas análogas foram identificadas no estudo conduzido por Xu *et al.* (2021). Esses autores concluíram que em condições do estresse, ocasionado pela passagem através do TGI, *Lactobacillus reuteri* SH23 utiliza o sistema ABC para transportar as proteínas slpA, o que promoveu o aumento da labilidade e capacidade de adesão. Portanto, a identificação da aglutinina de superfície celular, no presente trabalho, fornece um insight sobre um dos mecanismos utilizados por essa levedura para aderir ao epitélio intestinal e exercer efeitos probióticos.

Enzimas relacionadas com a replicação ou transcrição são frequentemente identificadas em pesquisas de exposição de diversos microrganismos ao TGI. A enzima topoisomerase foi observada em *K. lactis* B10 no início e aos 90 minutos após a exposição ao TGI. No entanto essa proteína não foi observada na levedura *T. delbrueckii* B14. Essa enzima está fortemente associada a replicação de DNA, transcrição, recombinação e reparo, uma vez que apresenta função de relaxamento da fita de DNA dando lugar a ação de outras enzimas envolvidas nesse processo (Jaswall *et al.*, 2020). Os nossos resultados foram consistentes com as observações feitas por Jaswall *et al.* (2020), uma vez que sob as condições de estresse ácido em que as células foram submetidas, enzimas que estabilizam e facilitam o reparo do DNA são essenciais.

A proteína NAD(P) H-hydrate epimerase, observada em *T. delbrueckii* B10, é uma proteína responsável pelo reparo de hidratos de NAD (P) H (Niehaus *et al.*, 2018). Lee *et al.* (2008) observaram que a bile é capaz de causar danos oxidativos ao DNA e outras moléculas. A presença dessa proteína aos 90 minutos e ao final da passagem pelo TGI coincide com o tempo em que o microrganismo foi exposto à bile, sugerindo que moléculas de NAD(P) H também podem ter sido afetadas pela bile e reflete uma tentativa de reparo dessa molécula (Tabela 1).

Entre as proteínas de transporte, a proteína SSc1 responsável pelo transporte, dependente de ATP, de cadeias polipeptídicas pelas membranas mitocondriais foi observada antes e ao final da passagem pelo TGI em *K. lactis* B10. O transporte de

peptídeos celular está diretamente relacionado com a manutenção da sobrevivência, uma vez que muitas cadeias de peptídeos estão relacionadas estrutural ou funcionalmente com processos metabólicos celulares (Liu *et al.*, 2021). Beach *et al.* (2015) demonstraram alterações na expressão de proteínas de membrana mitocondriais na presença de ácidos biliares. Schmidt *et al.* (2001), relataram ainda a função de chaperona a essa proteína, o que está de acordo com a resposta esperada sob as condições em que as leveduras foram estavam expostas, conforme descrito anteriormente.

As superóxido dismutases são outros grupos de proteínas que estão relacionadas com a proteção contra o estresse celular. Essas proteínas foram observadas durante todo o trajeto às condições simuladas do TGI em *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14. Moralez-Amparano *et al.* (2019), encontraram superóxido dismutases ao extrair o proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* após exposição pelo TGI. O estresse oxidativo pode resultar da escassez de nutrientes, hipoxia, entre outros. As superóxido redutases por sua vez, mantém o equilíbrio da célula através da quebra de espécies reativas de oxigênio em água e peróxido de hidrogênio. Portanto, a identificação dessas proteínas nas duas leveduras durante toda a simulação indica que as células sofreram estresse oxidativo intenso associado a exposição a acidez estomacal e aos sais biliares (Moralez-Amparano *et al.*, 2019).

Alguns trabalhos correlacionam a presença de hidrolases a compostos tóxicos oriundos da exposição à bile, como mecanismo de desconjugação da bile e, portanto, desintoxicação da célula (Koskenniemi *et al.*, 2011). No entanto, as hidrolases encontradas nas leveduras *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 parecem estar mais associadas a outras funções, uma vez que nenhum trabalho encontrado atribuiu essa função às proteínas descritas. A pirofosfatase inorgânica está relacionada ao metabolismo do fosfato e ao metabolismo lipídico enquanto a Adenosil-homocisteinase está relacionada a biossíntese de nucleosídeos e de aminoácidos. Ambos os processos estão positivamente relacionados a degradação da bile e adaptação ao baixo pH extracelular (Dourado *et al.*, 2023).

Não foram encontrados trabalhos que correlacionassem a presença de proteínas direcionadas à biossíntese de micotoxinas com a tolerância ao estresse ambiental por leveduras ou bactérias. Portanto, novos estudos são necessários para elucidar a função dessas proteínas, observadas em *T. delbrueckii* B14.

4.0 CONCLUSÃO

Os testes de segurança mostraram que as leveduras são seguras para serem utilizadas na indústria de alimentos. Além disso, sua tolerância à baixa atividade de água e congelamento, necessários ao processo de liofilização, é uma característica positiva para serem futuramente comercializadas. A sobrevivência, com elevada viabilidade, ao final da exposição ao TGI, sugere mecanismos que puderam ser identificados pela análise proteômica, como a presença de proteínas de tolerância ao congelamento, metabolismo de lipídeos, aminoácidos, carboidratos e peptídeos. Além disso, proteínas relacionadas com a manutenção do pH interno e proteínas de adesão, puderam fornecer insights sobre os mecanismos utilizados por *K. lactis* B10 e *T. delbrueckii* B14 para o desempenho de funções probióticas, já documentadas, no hospedeiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e pelo fomento à pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALCANTARA, C.; ZUNIGA, M. Proteomic and transcriptomic analysis of the response to bile stress of *Lactobacillus casei* BL23. **Microbiology**, v. 158, n. 5, p. 1206-1218, 2012

ALE, C. E.; *et al.* Freeze-drying of wine yeasts and *Oenococcus oeni* and selection of the inoculation conditions after storage. 2015

ALI, S. A.; *et al.* Proteomics fingerprints of systemic mechanisms of adaptation to bile in *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Proteomics**, v. 213, p. 103600, 2020

AN, H.; *et al.* Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the bile stress response in a centenarian-originated probiotic *Bifidobacterium longum*

BBMN68. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 10, p. 2558-2572, 2014

ANDRADE, G. C. *et al.* *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii*: Probiotic characterization, anti-*Salmonella* effect, and impact on cheese quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 151, p. 112240, 2021

ANDRADE, R. P. *et al.* Survival of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii* to simulated gastrointestinal conditions and their use as single and mixed inoculum for cheese production. **Food Research International**, v. 125, p. 108620, 2019

ANDRADE, R. P. *et al.* Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, v. 91, p. 72–79, 2017

BAIG, M. A.; *et al.* Heat, cold, acid, and bile salt induced differential proteomic responses of a novel potential probiotic *Lactococcus garvieae* C47 isolated from camel milk. **Food Chemistry**, v. 397, p. 133774, 2022

BEACH, A.; *et al.* Lithocholic bile acid accumulated in yeast mitochondria orchestrates a development of an anti-aging cellular pattern by causing age-related changes in cellular proteome. **Cell Cycle**, v. 14, n. 11, p. 1643-1656, 2015

BITEW, D. *et al.* Isolation of yeast from some Ethiopian traditional fermented beverages and in vitro evaluation for probiotic traits. **Heliyon**, v. 10, n. 23, p. e40520, 2024

BOLLA, P. A. *et al.* Effect of freeze-drying on viability and *in vitro* probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 1, p. 15–22, 2011

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976

BUDIN-VERNEUIL, A.; *et al.* Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactococcus lactis* MG1363. **Proteomics**, v. 5, n. 18, p. 4794-4807, 2005

BUSTOS, A. Y.; *et al.* Proteomic analysis of the probiotic *Lactobacillus reuteri* CRL1098 reveals novel tolerance biomarkers to bile acid-induced stress. **Food Research International**, v. 77, p. 599-607, 2015

CHEN, B. *et al.* Exploring the protective effects of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* under optimized cryoprotectants formulation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 173, p. 114295, 2023

CHEN, M.-J.; TANG, H.-Y.; CHIAN, M.-L. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefiranoferiens* M1. **Food Microbiology**, v. 66, p. 20-27, 2017

CHOU, L. S.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 1, p. 23–31, 1999

DANG, D. *et al.* In silico, in vitro and in vivo safety assessment of three *Limosilactobacillus mucosae* strains for probiotic candidates. **Food Bioscience**, v. 57, p. 103462, 2024

DIGUȚĂ, C. F. *et al.* In vitro assessment of yeasts strains with probiotic attributes for aquaculture use. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 124, 2022

DONOHUE, D. S.; *et al.* The N-terminal part of Als1 protein from *Candida albicans* specifically binds fucose-containing glycans. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1667-1679, 2011

DOURADO, M. N.; *et al.* Transcriptome and secretome analyses of endophyte methylobacterium mesophilicum and pathogen xylella fastidiosa interacting show nutrient competition. **Microorganisms**, v. 11, n. 11, p. 2755, 2023

FADDA, M. E. *et al.* In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 100–106, 2017

FADDIN, J.F.M. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, V. 3, p- 129-131, **Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**, 2000

FERNÁNDEZ-PACHECO, P. *et al.* Safety evaluation of yeasts with probiotic potential. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 659328, 2021

FREDUA-AGYEMAN, M. Surviving process and transit: Controlled freeze drying, storage and enteric coated capsules for targeted delivery of probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Heliyon**, v. 10, n. 7, p. e28407, 2024

GE, S. *et al.* Optimization of cryoprotectants for improving the freeze-dried survival rate of potential probiotic *Lactococcus lactis* ZFM559 and evaluation of its storage stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 198, p. 116052, 2024

GENEROSO, S. V.; *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Archives of Microbiology**, v. 192, p. 477-484, 2010

GOEL, A.; HALAMI, P. M. Safety assessment of probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* MCC5231 and its persistence in gastrointestinal tract. **Microbial Pathogenesis**, v. 194, p. 106824, 2024

GOLOUBINOFF, P.; *et al.* Chaperones convert the energy from ATP into the nonequilibrium stabilization of native proteins. **Nature Chemical Biology**, v. 14, n. 4, p. 388-395, 2018

GUOWEI, S.; *et al.* Comprehensive optimization of composite cryoprotectant for *Saccharomyces boulardii* during freeze-drying and evaluation of its storage stability. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 49, n. 9, p. 846-857, 2019

GUPTA, H.; MALIK, R. K. Incidence of virulence in bacteriocin-producing enterococcal isolates. **Le Lait**, v. 87, n. 6, p. 587-601, 2007

HASEGAWA, T. *et al.* Characterization of a virulence-associated and cell-wall-located DNase of *Streptococcus pyogenes*. **Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 184-190, 2010

HELMY, E. A. *et al.* Evaluation of potentially probiotic attributes of certain dairy yeast isolated from buffalo sweetened Karish cheese. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01649, 2019

JAN, T. *et al.* Diversity, distribution and role of probiotics for human health: Current research and future challenges. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 53, p. 102889, 2023

JASWAL, S.; *et al.* Recent advancements in the medicinal chemistry of bacterial type II topoisomerase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104266, 2020

KOSKENNIEMI, K.; *et al.* Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 2, p. S1-S18, 2011

LAU, L. Y. J.; QUEK, S. Y. Proteomic insights into stress responses and adhesion markers of co-encapsulated *Lactobacillus reuteri* DPC16 with *Cyclocarya paliurus* leaf extracts during in vitro gastrointestinal tract simulation (GITS). **Food Bioscience**, p. 106148, 2025

LEE, K.; LEE, H-G.; CHOI, Y-J. Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Biotechnology**, v. 137, n. 1-4, p. 14-19, 2008

LI, S. *et al.* Probiotic potential of γ -aminobutyric acid (GABA)–producing yeast and its influence on the quality of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6559–6576, 2021

LIU, M.; *et al.* iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the effect of heat shock on freeze-drying of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 11, p. 5569-5580, 2021

LIVRAMENTO, K. G.; *et al.* Proteomic analysis of coffee grains exposed to different drying process. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1874-1882, 2017

MORALES-AMPARANO, M. B.; *et al.* Proteomic response of *Saccharomyces boulardii* to simulated gastrointestinal conditions and encapsulation. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, p. 831-840, 2019

NIEHAUS, T. D.; *et al.* Evidence that the metabolite repair enzyme NAD (P) HX epimerase has a moonlighting function. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 3, p. BSR20180223, 2018

OH, S-H; *et al.* Agglutinin-like sequence (ALS) genes in the *Candida parapsilosis* species complex: blurring the boundaries between gene families that encode cell-wall proteins. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 781, 2019

PIETROWSKI, G. A. M.; *et al.* Influence of fermentation with *Hanseniaspora sp.* yeast

on the volatile profile of fermented apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 39, p. 9815-9821, 2012

SCHMIDT, S; *et al.* The two mitochondrial heat shock proteins 70, Ssc1 and Ssq1, compete for the cochaperone Mge1. **Journal of Molecular Biology**, v. 313, n. 1, p. 13-26, 2001

SILVA, A. A. D.; *et al.* Physicochemical profile of Canastra cheese inoculated with starter cultures of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii*. **Foods**, v. 14, n. 1, p. 121, 2025

SILVA, J. L. *et al.* Evaluation of the effect of freeze drying and cryoprotectant addition on a starter culture obtained from star fruit and its application in sourdough bread. **Food Bioscience**, v. 65, p. 106132, 2025

SYAL, P.; VOHRA, A. Probiotic potential of yeasts isolated from traditional indian fermented foods. **International Journal of Microbiology** v. 5, n. 2, p. 390–398, 2013

SZOPINSKA, A.; *et al.* Stuck at work? Quantitative proteomics of environmental wine yeast strains reveals the natural mechanism of overcoming stuck fermentation. **Proteomics**, v. 16, n. 4, p. 593-608, 2016

WANG, G.; *et al.* Combined transcriptomic and proteomic analysis of the response to bile stress in a centenarian-originated probiotic *Lactobacillus salivarius* Ren. **Food Research International**, v. 137, p. 109331, 2020

XU, H.; *et al.* Adhesion characteristics and dual transcriptomic and proteomic analysis of *Lactobacillus reuteri* SH23 upon gastrointestinal fluid stress. **Journal of Proteome Research**, v. 20, n. 5, p. 2447-2457, 2021

ZHAO, Q. *et al.* Ds-echinoside A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF- κ B-dependent MMP-9 and VEGF expressions. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 12, n. 7, p. 534–544, 2011

ZHONG, X.; *et al.* Immunomodulatory effect and biological significance of β -glucans. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, p. 1615, 2023