

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LUANA ALMEIDA NUNES SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO  
LÁTICAS DE LEITE CRU DE BÚFALAS**

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

LUANA ALMEIDA NUNES SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO  
LÁTICAS DE LEITE CRU DE BÚFALAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S729i Souza, Luana Almeida Nunes, 1992-  
2019 Identificação do potencial tecnológico de bactérias ácido  
láticas de leite cru de búfalas / Luana Almeida Nunes Souza. –  
Viçosa, MG, 2019.  
x, 65 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bactérias do ácido láctico. 2. Leite de búfala.  
3. Tecnologia de alimentos. 4. Bactérias patogênicas.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

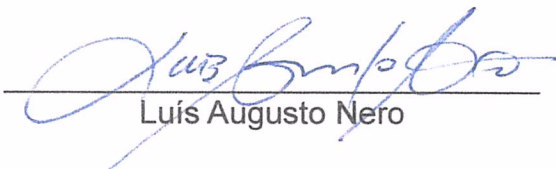
CDD 22. ed. 579.35

LUANA ALMEIDA NUNES SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO  
LÁTICAS DE LEITE CRU DE BÚFALAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2019.



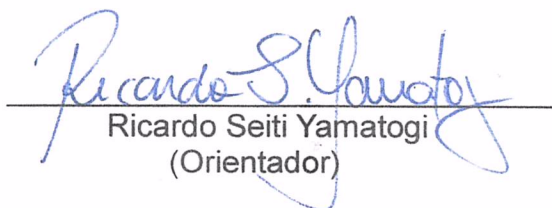
---

Luís Augusto Nero



---

Antônio Fernandes de Carvalho



---

Ricardo Seiti Yamatogi  
(Orientador)

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas  
únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de  
sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam  
pelos seus sonhos ou desistem deles."

Augusto Cury

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde e coragem para chegar até aqui. Mesmo com as dificuldades do caminho, Ele nunca me deixou desistir.

Aos meus pais, Lúcio e Ana Maria pelo amor incondicional e apoio. Em especial ao meu pai, meu exemplo de trabalho e superação, que sempre me deu muita força para realizar meus sonhos e nunca mediu esforços para me ajudar no que fosse preciso.

Ao meu irmão Gabriel, pelo amor e por ter feito eu me tornar uma pessoa mais resiliente.

À minha avó Albertina, por todo amor demonstrado em seus pequenos e valiosos gestos e pelo exemplo de ser humano.

À Laura e Aninha, minhas amigas de infância, por estarem presentes de coração nessa minha trajetória e pelas horas de conversa quando eu mais precisava.

À minha prima Juliana, por sempre me ouvir com muito amor e por ter me ajudado tanto, na fase mais difícil da minha vida.

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

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Luís Augusto Nero (Nero), pela oportunidade, apoio, ensinamentos e auxílio.

Ao Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho, por ter nos ajudado nesta pesquisa.

À todos os bubalinocultores, em especial àqueles que contribuíram para a concretização desse trabalho. Vocês são meu estímulo para continuar em frente e não desistir de mostrar às pessoas que o búfalo é um animal espetacular.

À todos os meus colegas e estagiários do laboratório de Inspeção (InsPOA), que compartilharam comigo as horas de trabalho e o conhecimento, sempre ajudando no que fosse preciso, fazendo com que os dias de pesquisa se tornassem mais leves...

Aos técnicos Dagoberto, Luís Carlos e Alex pelo auxílio e boa vontade durante a preparação de materiais.

À Luana Perin pela ajuda e pelo conhecimento compartilhado, principalmente na fase inicial da pesquisa.

À Núbia e Magna, pela amizade e por sempre me ouvirem com carinho, me dando forças para continuar.

À secretária da Pós-Graduação, Rosi, por toda ajuda, carinho e acolhimento.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
<b>CAPÍTULO 1. Revisão bibliográfica .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Aspectos gerais da bubalinocultura e produção leiteira .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Características do leite de búfala .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Fabricação da <i>mozzarella</i> .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Bactérias ácido lácticas .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Potencialidade tecnológica das BAL .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Fatores patogênicos .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>Objetivo geral.....</b>	<b>29</b>
<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 2. Identificação do potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas de leite cru de búfalas .....</b>	<b>30</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>32</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Isolamento e identificação das bactérias ácido lácticas .....</b>	<b>34</b>
<b>2.3 Identificação dos isolados .....</b>	<b>35</b>
2.3.1 REP PCR.....	35
2.3.2 Sequenciamento dos isolados .....	36
<b>2.4 Avaliação qualitativa do potencial tecnológico .....</b>	<b>36</b>
2.4.1 Produção de diacetil .....	36
2.4.2 Atividade lipolítica.....	37
2.4.3 Atividade proteolítica extracelular.....	37
2.4.4 Formação de exopolissacarídeos (EPS) .....	37
2.4.5 Perfil de Lactofermentação.....	38
<b>2.5 Avaliação qualitativa dos fatores de patogenicidade.....</b>	<b>38</b>

2.5.1 Atividade Desoxirribonuclease .....	38
2.5.2 Gelatinase .....	38
2.5.3 Atividade hemolítica.....	39
<b>2.6 Análise quantitativa do potencial tecnológico .....</b>	<b>39</b>
2.6.1 Atividade acidificante .....	39
2.6.2 Atividade autolítica .....	39
2.6.3 Capacidade de crescimento em diferentes concentrações de NaCl .....	40
<b>2.7 Análise estatística .....</b>	<b>40</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Identificação .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Análise qualitativa do potencial tecnológico.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3 Avaliação dos fatores de patogenicidade .....</b>	<b>44</b>
<b>3.4 Avaliação do potencial tecnológico quantitativo .....</b>	<b>44</b>
3.4.1 Atividade acidificante .....	44
3.4.2 Atividade autolítica .....	45
3.4.3 Capacidade de crescimento em diferentes concentrações de NaCl .....	46
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
4.1 Frequência.....	47
4.2 Potencial tecnológico .....	49
4.3 Fatores de patogenicidade.....	51
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Potencial de acidificação de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de búfala. ....	45
<b>Figura 2.</b> Avaliação da autólise de espécies de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de búfala.....	46
<b>Figura 3.</b> Osmotolerância de bactérias ácido lácticas isoladas de leite bubalino. ....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Gêneros e espécies das bactérias ácido lácticas isoladas em amostras de leite cru de búfalas, da região Centro-Oeste de Minas Gerais, Brasil.....	41
<b>Tabela 2.</b> Espécies de BAL selecionadas de leite cru de búfala .....	41
<b>Tabela 3.</b> Resultado da triagem das bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru de búfala, a partir da análise qualitativa do potencial tecnológico e patogênico. .....	43

## RESUMO

SOUZA, Luana Almeida Nunes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Identificação do potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas de leite cru de búfalas.** Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

A bubalinocultura é uma atividade em expansão no Brasil, em que a maioria dos bubalinos são criados para produção de leite e carne, com o intuito de gerar renda para os produtores rurais. O leite de búfala é valorizado pelas indústrias fabricantes de produtos lácteos, devido sua composição centesimal, que garante maior rendimento industrial, além do aumento da demanda do mercado consumidor, em razão do valor nutricional desses produtos. Bactérias ácido lácticas são utilizadas nas indústrias para atribuição de características tecnológicas aos alimentos e bioproteção, o que impulsiona a procura por novas cepas para uso como culturas *starters* ou adjuntas. O objetivo deste trabalho foi a seleção de bactérias ácido lácticas de leite cru de búfalas, de interesse para utilização pelas indústrias de laticínios, com potencial tecnológico e ausência de fatores patogênicos. Amostras de leite cru de búfalas, provenientes de 10 propriedades do Centro-Oeste de Minas Gerais, foram coletadas em recipientes estéreis para análises. Após o cultivo em meios seletivos e realização dos testes de Coloração de Gram e Catalase, foram isoladas ao todo 148 bactérias ácido lácticas, submetidas posteriormente a Rep-PCR. Destas, 47 foram catalogadas para verificação do potencial tecnológico e ações patogênicas. Os resultados mostraram a presença de 12 bactérias ácido lácticas com potencial tecnológico e ausência de fatores de virulência, avaliados fenotipicamente, apresentando características que favoreçam a sua aplicação no processamento de derivados lácteos. Os doze isolados selecionados são espécies de *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Lactococcus garvieae*, *L. lactis*, *Leuconostoc lactis* e *Enterococcus hirae*.

## ABSTRACT

SOUZA, Luana Almeida Nunes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Identification of the technological potential of lactic acid bacteria from raw milk of buffaloes.** Adviser: Ricardo Seiti Yamatogi.

Bubalinculture is an expanding activity in Brazil, where most buffaloes are raised for milk and meat production, with the aim of generating income for rural producers. Buffalo milk is valued by the dairy industry, due to its centesimal composition, which guarantees higher industrial yield, as well as an increase in consumer market demand, due to the nutritional value of the products. Lactic bacteria are used in industries to assign technological characteristics in food and bioprotection, which drives the search for new strains for use as starter crops or adjuncts. The objective of this work was the selection of lactic acid bacteria from raw milk of buffaloes, of interest for use by the dairy industry, with technological potential and absence of pathogenic factors. Samples of raw buffalo milk from 10 properties of the Center-West of Minas Gerais were collected in sterile containers for analysis. After culturing in selective media and performing the Gram Stain and Catalase staining tests, 148 lactic acid bacteria, which were subsequently submitted to Rep-PCR. Of these, 47 were cataloged for verification of technological potential and pathogenic actions. The results showed the presence of 12 lactic acid bacteria with technological potential and absence of virulence factors, phenotypically evaluated, presenting characteristics that favor its application in the processing of dairy products. The twelve selected isolates are species of *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Lactococcus garvieae*, *L. lactis*, *Leuconostoc lactis* and *Enterococcus hirae*.

## INTRODUÇÃO GERAL

A criação de bubalinos e a produção do leite desta espécie no Brasil tem aumentado nas últimas décadas, sendo uma alternativa a produção de leite de vaca, devido o maior valor agregado aos produtos fabricados com leite de búfala. O elevado teor de gordura, proteína, sólidos totais e minerais são características do leite bubalino, que torna-o mais valorizado pelas indústrias fabricantes de queijos e derivados lácteos, pois o rendimento industrial chega a ser superior quando comparado ao leite de vaca, além de ser mais saudável, o que tem levado a um aumento da procura pelos consumidores.

Atualmente, diversos produtos são fabricados com leite de búfala e comercializados por todo país, como iogurte, requeijão, ricota, manta, doce de leite, burrata e *mozzarella*, sendo este último o principal produto, além de estarem disponíveis também no mercado, produtos sem lactose.

A fabricação da *mozzarella* geralmente ocorre a partir da adição de bactérias ácido lácticas ao leite, para obtenção de um produto com qualidades tecnológicas padronizadas. Através do isolamento de bactérias ácido lácticas de origem autóctone, cepas úteis e geneticamente seguras tem sido encontradas, contribuindo para industrialização de produtos. Além disso, a busca por estas cepas, principalmente por produtores de queijos, tem contribuído para o aumento da diversidade de fermentos usados em laticínios.

O objetivo desse estudo foi a identificação e caracterização de bactérias ácido lácticas presentes em amostras de leite cru de búfalas, a partir da microbiota autóctone desse leite, assim como a verificação do potencial tecnológico e ações patogênicas, com o intuito de selecionar cepas que possam ser utilizadas na produção de derivados lácteos.

## **CAPÍTULO 1. Revisão bibliográfica**

Luana Almeida Nunes Souza

## 1.1 Aspectos gerais da bubalinocultura e produção leiteira

A espécie *Bubalus bubalis* tem sua origem no Continente Asiático (CAMPANILE e BALESTRINE, 2002) e foi introduzida no Brasil a partir do final do século XIX. A capacidade de adaptação, rusticidade, eminente fertilidade e longevidade reprodutiva, contribuíram para multiplicação da espécie neste país (TONHATI et al., 2007).

Os bubalinos são animais utilizados para produção de alimentos, como o leite e a carne, servindo também como tração animal. Além disto, são animais resistentes à parasitoses, eficientes na utilização de dietas pobres em qualidade e ainda geram terneiros de crescimento rápido (RAMOS et al., 2004; EL-SALAM & EL-SHININY, 2011).

O rebanho bubalino no mundo compreende cerca de 168 milhões de animais, que estão distribuídos pela Ásia, África, América do Sul, Austrália e Europa, sendo que o maior número de exemplares se encontra no continente Asiático, chegando a 161 milhões. A Índia é o país que retém o maior rebanho mundial, possuindo por volta de 95 milhões de animais, seguido pela China, com aproximadamente 23 milhões e o Paquistão, com 22 milhões (BORGHESE, 2005).

No Brasil, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2015), existem aproximadamente 1,5 milhões de bubalinos, que estão distribuídos por todos os estados brasileiros, além de ser considerado o país com o maior rebanho da espécie bubalina do ocidente. As raças presentes no território nacional são Murrah, Jafarabadi, Mediterrâneo, Carabao e seus mestiços, possuindo animais com produção leiteira comparável aos melhores espécimes (BERNARDES, 2007). Entre os estados brasileiros, o maior rebanho se encontra no estado do Pará, equivalente à 522.250 animais. No estado de Minas Gerais, o número desta espécie corresponde a 63.337 cabeças.

A expansão desta espécie no Brasil tem acontecido de forma rápida, em virtude do rendimento industrial superior do leite de búfala para a produção de derivados e a busca pela carne, que em razão do seu valor nutricional, é caracterizada como saudável (VALE, 1999; SILVA e JÚNIOR, 2014).

O leite de búfala é o segundo tipo de leite mais produzido no planeta, correspondendo atualmente a 14,5 % da produção total. A Índia e o Paquistão são os maiores produtores deste leite. No ano de 2017, a produção de leite

bubalino foi de 120.353.705 toneladas em todo o mundo (FAO, 2017). A Itália é o país com a maior produção de leite bubalino da Europa, utilizado em geral para fabricação de *mozzarella* e o mais avançado no mundo para produção deste tipo de leite e seus derivados (SILVA et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2005).

No Brasil, na década de 1980, após alguns pecuaristas analisarem e mensurarem as particularidades zootécnicas dos bubalinos, teve início o progresso da exploração econômica destes animais (ANDRIGHETTO, 2005). A partir da década de 1990, a bubalinocultura brasileira mostrou interesse na exploração de leite desta espécie, formando-se diversas bacias produtoras de leite de búfala e concentrando principalmente no Sudeste do país, devido à proximidade do mercado consumidor (SILVA e JÚNIOR, 2014).

## **1.2 Características do leite de búfala**

O leite de búfala possui valor nutritivo e alto rendimento industrial, devido à algumas características como, por exemplo, elevado teor de sólidos totais e minerais, proteínas, gordura e lactose, além da presença de vitamina A. Essas características são importantes para a preparação de produtos, contribuindo para um aumento da renda obtida pelo criador a partir da produção de *mozzarellas*, queijos e derivados lácteos (VALLE, 1994; VERRUMA e SALGADO, 1994; SILVA et al., 2003; ANDRIGUETTO, 2011). Também possui menor índice de colesterol, quando comparado ao leite de vaca (AMARAL et al., 2005), sendo usado principalmente na fabricação de queijo *mozzarella* e em menor escala, na produção de outros tipos de queijo, como o Minas frescal, tipo azul, ricota, quark e requeijão (BUZI et al., 2009).

Alguns estudos relatam que o rendimento do leite bubalino para fabricação de derivados, como queijos, iogurtes e doces de leite é superior em relação ao leite de vaca (TEIXEIRA et al., 2005) e suas características químicas estão entre os fatores de maior relevância que mantém o crescimento da espécie bubalina no mundo (BARBOSA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004).

Físico-quimicamente, o leite de búfala geralmente apresenta densidade entre 1,025 a 1,047 g/mL; pH dentro de 6,41 e 6,47; ácido láctico de 14 a 20 %, devido ao alto teor de proteínas, principalmente a caseína; crioscopia entre -0,531 e -0,548 °C; sólidos totais por volta de 15,64 - 17,95 %; gordura entre 5,4 e 8,0 %; proteína de 3,6 a 5,26 % e minerais entre 0,79 e 0,83 %, sendo até 25 % de

cálcio (KOSIKOWSKI, 1979; FURTADO, 1980; CUNHA NETO, 2003; TEIXEIRA et al., 2005).

A gordura é constituída por glóbulos de tamanho e densidade maiores que os do leite de vaca, apresentando temperatura de fusão mais elevada, sendo de 32 à 43,5 °C (GANGULI, 1979). Outro fator importante deste produto é a presença de um maior teor de cálcio, significativo na fabricação de produtos lácteos principalmente, sob o ponto de vista tecnológico e nutricional (VERRUMA e SALGADO, 1994).

Os componentes do leite de búfala (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) podem sofrer variações devido fatores ambientais, como estação do ano e nutrição, além do efeito do animal, por exemplo, raça, idade e período da lactação. Por se tratar de um leite com sabor adocicado e nutricionalmente benéfico à saúde humana, apresentando menor teor de colesterol, possui valor agregado ao mercado varejista, havendo uma grande demanda de seus derivados, sendo uma alternativa aos consumidores intolerantes aos constituintes do leite de vaca, pois, apresenta digestibilidade mais rápida de proteínas e lipídeos (SILVA et al., 2003; AMARAL, 2005; ISLAM et al., 2016).

Produtos de origem animal provindos de ruminantes, especialmente os lácteos, são as fontes mais ricas de Ácido linoleico conjugado (CLA), um componente com potencial anticarcinogênico, sendo os isômeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12 os que possuem atividade biológica (PARIZA et al., 2000). É importante ressaltar que em um estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca, quantidades superiores de ácido vacênico (C18: 1 t11) e ácido rumênico (C18: 2c9, t11) foram encontradas no leite de búfala, sugerindo que a maior ingestão de CLA pode ser conseguida a partir do consumo de leite bubalino (PIGNATA, 2014).

### **1.3 Fabricação da *mozzarella***

O queijo *mozzarella* surgiu na região de Campana, no Sul da Itália. Trata-se de um queijo preparado tradicionalmente com leite de búfala integral, apresentando alto teor de gordura, o que lhe atribui um sabor leve. Atualmente, a região de Campana possui o selo de origem da autêntica *mozzarella* (TEIXEIRA, 2005). Este produto é o mais consumido no mundo e o de maior produção no Brasil. Caracteriza-se por ser de massa filada, macio, não-

maturado, com pouco sal, de coloração branca ou levemente amarelada e de superfície brilhante, sendo encontrado em vários formatos e tamanhos (CANSIAN, 2005). Pode ser adquirido pelo consumidor em formato de bolinha, trancinha, palito e/ou nozinho, além da forma em barras, que podem pesar de 500 g até 4 Kg (FURTADO, 1997).

A elaboração pode ocorrer a partir do uso de leite pasteurizado, com a adição de culturas *starters* de bactérias ácido lácticas (BAL) ou pelo método tradicional, italiano, através da incorporação de coalho e soro-fermento no leite cru aquecido, sob condições higiênico-sanitárias (COPPOLA et al., 2001). O soro fermentado consiste em uma cultura de microrganismos natural, que é obtida do soro proveniente da coagulação do leite, sendo armazenado e usado posteriormente em outros processamentos como cultura *starter* (ERCOLINI et al., 2004).

Usualmente, são selecionadas culturas lácticas termófilas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) como *starters* para a fabricação de *mozzarella*, as quais possuem características significativas para este queijo (MOREA et al., 1998). Contudo, vários derivados do leite ainda são produzidos pela fermentação espontânea, não havendo seleção de culturas *starters*, o que ocasiona uma série de produtos com aroma, consistência e qualidade microbiológica distintas (STILES e HOLZAPFEL, 1997; GERNIGON et al., 2009).

A obtenção da massa da *mozzarella* tem início com a coagulação do leite, através da produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas presentes no leite cru, por meio da acidificação direta ou pela coagulação enzimática, a partir do uso de coalho. Na etapa de coagulação, ocorre a hidrólise da kappa-caseína, liberação de aminoácidos, desmineralização da coalhada, diminuição do pH e subsequente dessoragem (FURTADO, 1991).

O método usual de produção do queijo *mozzarella* ocorre com a adição do fermento láctico ao leite de búfala integral que, por meio de ações fermentativas desestabiliza o leite, formando o coalho. Esta massa coagulada é quebrada em pedaços de 3 centímetros e depois de um período de descanso, ocorre a drenagem do soro. A filagem da massa é realizada após o processo de fermentação, em pH entre 5,2 e 5,4 com a fusão em água, a uma temperatura de 80-85 °C, até obtenção de uma massa homogênea e macia (TEIXEIRA et al., 2005). Em seguida, é feita a moldagem e por último, a salga (opcional), em solução de NaCl a uma concentração de 20 a 24 % (GUSSO, 2011).

De acordo com Furtado (2005), há uma faixa de pH ideal para a filagem da massa de *mozzarella*, que varia de 4,8 a 5,5. Quanto mais alto o pH da massa (maior que 5,5) mais mineralizado é seu aspecto, e ao ser aquecida, não estica com facilidade. Já em pH ideal (4,8 a 5,5), a mineralização é reduzida, gerando uma massa com ótima elasticidade e características ideais para a técnica de filagem.

A utilização de métodos alternativos para fabricação de *mozzarella*, como acidificação direta (ácido láctico, ácido cítrico, glucona- $\delta$ -lactona), não descarta a técnica tradicional de fermentação por BAL, desse modo, a qualidade e características do produto final serão determinadas pela cultura bacteriana utilizada (CHERIGUENE et al., 2007).

A qualidade microbiológica da matéria-prima é essencial para a elaboração de um derivado de alta qualidade. Na Itália, por exemplo, a *mozzarella* é feita com leite de búfala não pasteurizado, para não modificar o processo tecnológico, e principalmente assegurar as particularidades sensoriais intrínsecas do produto (BUZI et al., 2009). Diversos queijos fabricados com leite cru possuem aromas e características sensoriais peculiares quanto aos que são preparados com leite pasteurizado, isto se deve às propriedades fisiológicas e bioquímicas das BAL presentes no leite, que são responsáveis pela particularidade do produto (ALBENZIO et al., 2001; POZNANSKI et al., 2004; FRANCIOSI et al., 2008; FERNANDEZ et al., 2010).

No Brasil, o queijo *mozzarella* é o produto principal oriundo da bubalinocultura, apresentando mercado distinto, com ampla potencialidade de crescimento. A melhoria do processamento visa o aperfeiçoamento na qualidade e diminuição de custos (SERRANO, 2008). Estudos que avaliam a qualidade microbiológica do leite bubalino empregado na produção de queijo *mozzarella* ainda são escassos (PRICHULA et al., 2013). De acordo com Silva e Júnior (2014), devido à carência de informações sobre produção e comércio de produtos de origem bubalina, o *marketing* de propagação e emprego de legislações específicas de qualidade, seriam uma provável solução para o incentivo da produção, venda e consumo dos mesmos.

## 1.4 Bactérias ácido lácticas

As BAL constituem um grupo amplo de cocos e bacilos gram-positivos, tolerantes a ácidos e fermentativas (BROADBENT; BUDINICH; STEELE, 2016). São catalase-negativas, microaerofilas, não produtoras de esporos e exigem um meio rico em nutrientes para crescerem (SALMINEN, 1998). Possuem um complexo de condução simultâneo de ácido láctico e prótons para o exterior da célula, que auxiliam a homeostase do pH interno e geram energia (TORO, 2005; BERNARDEAU et al., 2008). Além disso, são bactérias não móveis, não redutoras de nitrato a nitrito e com carência de citocromo (TORO, 2005; MOZZI et al., 2010).

Os gêneros que compõem o grupo das BAL são *Aerococcus*, *Atopobium*, *Brochotrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (LAHTINEN et al., 2011; MOTTA, 2015; KLEEREBEZEM et al., 2017). Essas bactérias podem ser especificadas em dois grupos: as homofermentativas e as heterofermentativas. Nas homofermentativas, o ácido láctico é o principal produto da fermentação da glicose, enquanto que as heterofermentativas podem produzir além do ácido láctico, dióxido de carbono, etanol, aldeído, ácido acético e diacetil (MARTINS et al., 2006; GONÇALVES, 2009).

As BAL constituem um conjunto diverso de bactérias, em que várias são caracterizadas como *geralmente reconhecido como seguro* (GRAS). São bactérias amplamente distribuídas no meio ambiente, presentes em variados produtos à base de leite, como queijos e iogurtes, numerosos alimentos fermentados e no aparelho digestivo e geniturinário de humanos e animais. Podem estar presentes naturalmente nos produtos alimentícios, gerando uma fermentação espontânea ou serem adicionadas como cultura *starter*. Algumas BAL são usadas como probióticos com o intuito de beneficiar a saúde humana, sendo portanto, muito importantes economicamente para a indústria, especialmente a de alimentos (ADNAN e TAN, 2007; PIARD et al., 2011).

Quanto à temperatura de crescimento, podem ser classificadas em mesofílicas, crescendo a uma temperatura ótima por volta de 30 °C ou termofílicas, crescendo a uma temperatura ótima de 42 °C (SYBESMA et al., 2006). As culturas *starters* são microrganismos ativos, com multiplicação em leite

ou soro, essenciais na fabricação de queijos (SALMINEN, 1998). Sendo deste modo, o primeiro ingrediente adicionado ao leite, propiciando características próprias aos variados tipos de queijo. Entre suas funções, elas são responsáveis por fermentar a lactose, com produção de ácido lático como, por exemplo, as bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus* (AQUARONE et al., 2001). O ácido lático têm muitas funções, como o controle ou impedimento da multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas; atua na atividade do coagulante e sua retenção na coalhada; solubiliza o fosfato de cálcio coloidal, afetando a estrutura do queijo; propicia a sinérese e afeta a atividade enzimática durante o processo de maturação (FOX et al., 2004).

Os resultados do fermento lácteo sobre as características da *mozzarella* de leite de búfala ao longo do processo de fabricação e armazenamento são observados através de tentativas na indústria, havendo erros e acertos, fato este que afeta o sistema de produção deste tipo de queijo, levando à alterações na qualidade do produto final. A aplicação do soro-fermento elimina a aquisição do fermento lácteo, o que diminui os custos de produção, contudo, não há uniformidade na produção, devido as alterações que acontecem na microbiota natural do soro-fermento, além deste ser um possível meio de contaminação. (SERRANO, 2008).

A seleção de cepas úteis e geneticamente seguras tem ocorrido devido ao isolamento de microrganismos através de fontes autóctones, o que tem gerado relevantes contribuições à industrialização de produtos (ADNAN e TAN, 2007). De acordo com Locci (2008), um crescimento na procura de novas cepas de bactérias ácido lácticas para serem utilizadas como cultivos iniciadores nativos, pelos produtores de queijo, tem gerado um impulso para o aumento da diversidade de fermentos usados na indústria de laticínios. O desenvolvimento de culturas autóctones específicas à fabricação de algum queijo pode possibilitar proteção às características sensoriais e garantir um produto homogêneo e seguro microbiologicamente.

Segundo Candia e colaboradores (2007), podem ser percebidas diferenças na constituição e proteólise do queijo *mozzarella* dependendo das BAL *starters*, ponderando a escolha de linhagens de bactérias autóctones, para serem usadas por diferentes laticínios da mesma região.

Apesar da indústria de derivados lácteos estar inclinada a usar fermentos comerciais, muitas utilizam fermentos endógenos, pela qualidade sensorial que

concedem devido ao metabolismo da microbiota autóctone. Os microrganismos mais propícios para culturas *starters* são os obtidos pela microbiota autóctone, estando adaptados ao ambiente, podendo prevalecer no produto, devido sua habilidade de ação intrínseca (BABIC et al., 2011).

De acordo com Silva (2015), a produção do queijo *mozzarella* a partir de cultura láctica endógena é factível, viabilizando um produto com características físico-químicas e microbiológicas adequadas para o consumo. Em seu estudo constatou-se que a elaboração de *mozzarella* com cultura láctica endógena apresenta resultados satisfatórios nas análises sensoriais, maior aceitação, preferência e objetivo de compra quando comparado ao produto feito com cultura láctica comercial.

A identificação e seleção de novas cepas que detenham propriedades potenciais para uso industrial é de relevante importância para o aumento da diversidade de culturas de BAL disponíveis para produção de queijos e produtos lácteos (SANTOS, 2015).

### **1.5 Potencialidade tecnológica das BAL**

As BAL atribuem qualidades tecnológicas e bioproteção em diversos alimentos, auxiliando no tipo de textura, aumento de sabor, vida útil e preservação (OLIVEIRA; ZANNINI; ARENDT, 2014). A escolha de uma cultura *starter* tem como realizar fermentação e produzir as características desejadas ao produto, além da estabilidade durante a produção. As qualidades essenciais são a capacidade de acidificação, a formação de enzimas proteolíticas, encarregadas de gerar o aroma e textura nos queijos e a bioproteção que concedem ao alimento (VON WRIGHT, 2012; COELHO, 2013; OLIVEIRA; ZANNINI; ARENDT, 2014).

Em relação as culturas não *starters* (Non Starter Lactic Acid Bacteria - NSLAB), estas constituem-se em linhagens selecionadas de bactérias lácticas ou de outros microrganismos, com o intuito principal de aperfeiçoar a qualidade sensorial do produto. São culturas usadas para estimular o processo de maturação, gerar o aroma desejado e eliminar ou disfarçar alguns prováveis defeitos de fabricação. A existência de NSLAB causa um aumento da proteólise secundária e da ação da aminopeptidase, enzima encarregada pela diminuição

do paladar amargo e pelo aumento da concentração de peptídeos de paladar desejável (BARROS et al., 2006).

As NSLAB podem utilizar como substrato energético os aminoácidos liberados da autólise das (Starter Lactic Acid Bacteria - SLAB), tanto quanto, os resíduos de carboidratos liberados de glicoproteínas e glicolípídeos do leite (WILLIAMS; WITHERS; BANKS, 2000). Usualmente são originárias do leite cru, do meio de produção e, em número inferior, do soro-fermento natural (SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006). A combinação das bactérias NSLAB com as SLAB pode favorecer positivamente a qualidade do produto final (DIAS, 2011).

Ao longo da maturação, a quantidade de bactérias presentes na cultura *starter* é restringida, enquanto as culturas NSLAB, acrescentadas ou oriundas do leite, aumentam até alcançarem números acima dos iniciadores. As principais bactérias deste grupo pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Enterococcus*, sendo as espécies mais populares *L. casei/paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* (BERESFORD, 2004; BARROS et al., 2006; COELHO, 2013).

A atividade autolítica está associada à disponibilização de enzimas intracelulares que interferem nas propriedades de paladar, aroma e consistência dos queijos, sendo uma propriedade que deve ser estudada nas BAL, que atuarão no processamento de maturação desses produtos (NIETO-ARRIBAS et al., 2009; LAZZI et al., 2016).

Outra característica importante das BAL é a resistência a diversas concentrações de NaCl, como a absorção ou síntese de uma quantidade limitada de solutos (BREMER; KRAEMER, 2000). Reale e colaboradores (2015), com base em um estudo realizado com *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, decreveram que a osmotolerância é um parâmetro relevante para triagem de estirpes para aplicabilidade tecnológica.

Na produção de queijos é importante o aperfeiçoamento do sabor e inclusão de novas espécies com potencial aromático. O diacetil consiste no principal metabólito de sabor gerado por BAL (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2004) e sua produção ocorre devido à habilidade intrínseca de algumas BAL em metabolizar o citrato (PASSERINI et al., 2013). De acordo com Pogacic et al. (2015), as pesquisas de aromas são fundamentais para avaliar várias linhagens de microrganismos que promovem sabor.

O diacetil é capaz de inibir microrganismos patogênicos ao propagar-se pelas membranas bacterianas e afetar as funções metabólicas primordiais (HOR; LIONG, 2014). Quantidades elevadas de diacetil estão relacionadas à desconformidades de sabor, paladar amargo e aroma ruim (CLARK; POTTER, 2007), embora seja usado na preparação de muitos alimentos, como queijo processado, cottage, creme de leite, margarina e essências de óleo vegetal, além de elevar os níveis de aroma amanteigado, que acontece naturalmente na fermentação (RINCON-DELGADILLO et al., 2012).

Em relação à atividade lipolítica, nos produtos lácteos, as lipases microbianas são as enzimas responsáveis pela hidrólise da gordura do leite, causando a liberação dos ácidos graxos no soro (XIE et al., 2012). As lipases hidrolisam os triacilgliceróis (TAG) em diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres. Os monoacilgliceróis formados também agem como emulsificantes, propiciando uma textura mais macia ao paladar e alterando a cinética de exalação de aromas. (FOX et al., 2000; MIETTINEN et al, 2002).

Em queijos, as bactérias ácido lácticas são capazes de afetar a intensidade das características sensoriais dos alimentos fermentados, devido à atividades metabólicas como a proteólise secundária, o metabolismo dos carboidratos restantes e a habilidade de gerar aminoácidos livres e metabolizá-los, conduzindo à formação de compostos flavorizantes (BURNS et al., 2012; GUARCELLO et al., 2016). Esta proteólise pode influenciar na qualidade sensorial do produto como paladar, aroma e consistência do alimento (NIETO; ARRIBAS et al., 2009). Estirpes com atividade proteolítica baixa são aplicadas como culturas adjuntas em variados tipos de queijos. Elas auxiliam o aumento da quantidade de pequenos peptídeos e aminoácidos livres, principais precursores dos compostos inerentes ao aroma e paladar dos alimentos (EMBRAPA, 2017).

Quanto aos gases produzidos por este tipo de bactéria, estes podem aumentar a quantidade e tamanho das olhaduras em queijos semiduros, sendo útil em alguns produtos, como os queijos Gouda, Edam e Danbo (FRÖHLICH-WYDER et al., 2013; LEITE et al., 2013; PEDERSEN et al., 2013).

As BAL são bastante aplicadas para assegurar a preservação e as características sensoriais de diversos produtos, auxiliando na textura, paladar e estabilidade de alimentos fermentados, pela síntese de exopolissacarídeos (EPS) (SOUZA et al., 2007). Além disto, as bactérias produtoras de EPS mais

relevantes, são *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (WALLING et al., 2005; KORAKLI; GANZLE; VOGEL, 2006; WERNING et al., 2006).

Os EPS podem permanecer ligados à parede celular capsular das bactérias ou serem excretados em forma de muco, sendo usados como aditivos alimentares. São acrescentados em muitos produtos, principalmente em leites fermentados, contribuindo para viscosidade, estabilidade, emulsificação ou geleificação (DE VUYST, 1999; DEGEEST, 2001; RUAS -MADIEDO et al., 2002). Um exemplo, são os *Lactobacillus spp.*, que possuem alta capacidade de fabricar diversos tipos de EPS, manifestando uma ampla distinção de estruturas. Os EPS são identificados pela sua composição, em homopolissacárideos e heteropolissacarídeos, sintetizados naturalmente em produtos fermentados. Algumas culturas *starters* de iogurtes, geralmente produzem heteropolissacarídeos (RICCIARDI et al., 2002; De VUYST et al., 2003; BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

Alguns estudos tem mencionado que os EPS também podem ter características favoráveis à saúde, como atividade imunomodulatória e antitumoral, diminuição do colesterol e prevenção ao surgimento de úlceras (GROSU-TUDOR et al., 2013; JOSHI; KOIJAM, 2014).

Quanto ao teste de lactofermentação, este é realizado para verificação do tipo de fermentação determinada por cada isolado de BAL. A fermentação láctica é um processo anaeróbico, de baixa produção energética, onde a lactose é convertida em ácido láctico por atividade dos microrganismos (IFBA, 2013).

## **1.6 Fatores patogênicos**

Vários são os testes importantes para verificação da virulência produzida pelas BAL. A Gelatinase por exemplo, trata-se de uma enzima proteolítica, capaz de hidrolisar gelatina, caseína, hemoglobina, colágeno e outros peptídeos bioativos (WANG et al., 2011). Já a DNase, é um fator de virulência constatado com baixa frequência em amostras provenientes de alimentos, quando comparadas com amostras clínicas. Consiste numa enzima que auxilia na infecção do hospedeiro, devido sua capacidade de degenerar o ácido nucleico (DNA) (BARBOSA et al., 2010).

A inexistência da atividade hemolítica deve ser um método de seleção em culturas *starters* para aplicação nos produtos lácteos (GIRAFFA, 1995). A atividade hemolítica é analisada em ágar sangue suplementado com 5 % de sangue de cavalo defibrinado. Esse teste de virulência é imposto devido a importância de atestar segurança, mesmo entre um grupo de microrganismos com o status de GRAS (FAO/WHO, 2002).

## 2. REFERÊNCIAS

ADNAN, A. F. M.; TAN, I. K. P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. **Bioresource Technology**, 98, 1380-1385, 2007.

ALBENZIO, M.; CORBO, M. R.; REHMAN, S. U.; FOX, P. F.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; SEVI, A.; GOBBETTI, M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 1-2, p. 35-48, 2001.

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 2005, v.29, n.2, p.106-110, abril/jun. 2005.

AMARAL, F. R.; ESCRIVÃO, S.C. Aspectos Relacionados à búfala leiteira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 111-117, 2005.

ANDRIGHETTO, C. et al.; Efeito da Monensina Sódica sobre a Produção e Composição do Leite, a Produção de Mozzarella e o Escore de Condição Corporal de Búfalas Murrah. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 34, n. 2, p. 641-649, 2005.

ANDRIGHETTO, C. Cadeia produtiva do leite da búfala- Visão da Universidade. In: SIMPÓSIO DA CADEIA PRODUTIVA DA BUBALINOCULTURA, 2, 2011, Dracena-SP. 2011.

AQUARONE, E. **Biotechnologia agroindustrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher, v.4, 2001.

BABIC, I.; MARKOV, K.; KOVACEVIC, D.; TRONTEL, A.; SLAVICA, A.; DUGUM, J.; CVEK, D.; SVETEC, I. K.; POSAVEC, S.; FRECE, J. Identification and characterization of potential autochthonous starter cultures from a Croatian "brand" product "Slavonskikulen". **Meat Science**, v. 88, n.3, p 517–524, 2011.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v.29, p.54-66, 2011.

BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; TOKARNIA, C. H.; RIET-CORREA, F. Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, p.167-172, 2003.

BARBOSA, J.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**, v.21, p.651-656, 2010.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, p.235-252, 2004.

BARROS, C. M. V., CUNHA, C. R., GALLINA, D. A., VIOTTO, L., VIOTTO, W. H. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo prato light. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, 2006.

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

BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.278-295, 2008.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 2007, v.31, n.3, p.293-298, jul./set. 2007.

BORGHESE, A.; MAZZI, M. Buffalo population and strategies in the world. In: BUFFALO PRODUCTION AND RESEARCH. Roma: FAO. 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/010/ah847e/ah847e00.htm>. Acesso em 06 set. 2017.

BREMER, E.; KRAMER, R. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: STORZ, G. HENGGE AREONIS, R. **Bacterial stress response**. Washington D.C: ASM Press, p. 79-97, 2000.

BROADBENT J. R.; BUDINICH, M. F.; STEELE J. L. Cheese: NSLAB. USA, 5 p. 2016. **Elsevier**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00676-4>>. Acesso em: 22 de março de 2019.

BURNS, P.; CUFFIA, F.; MILESI, M.; VINDEROLA, G.; MEINARDI, C.; SABBAG, N.; HYNES, E. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. **Food Microbiol.**, v. 30, n. 1, p. 45-50, 2012.

BUZI, K. A.; PINTO, J. P. A. N.; RAMOS, P. R. R.; BIONDI, G. F. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 7-11. 2009.

CAMPANILE; G, BALESTRIERI M. L. Interactions of environmental factors for better production in buffaloes. In: SIMPÓSIO DE BÚFALO DAS AMÉRICAS, 1, 2002, Belém, PA. *Anais ...* Belém: SBA, 2002.

CANDIA, S. de; ANGELIS, M. de; DUNLEA, E.; MINERVINI, F.; MCSWEENEY, P.L.H.; FACCIA, M.; GOBBETTI, M. Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses. **International Journal of Food Microbiology**. v.119. n.3, p. 182–191, 2007.

CANSIAN, E. A. **Avaliação da padronização do queijo mussarela com uso de ferramentas de qualidade: estudo de caso**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

CHERIGUENE, A.; CHOUGRANI, F.; BEKADA, A. M. A.; EL SODA, M.; BENSOLTANE, A. Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 15, p. 1854-1861, 2007.

CLARK, S.; POTTER, E.D. Cottage Cheese. In: Hui, YH. **Handbook of food products manufacturing: health, meat, milk, poultry, seafood and vegetables**, v.2, p.618-633, 2007.

COELHO, M.C. **Isolamento e caracterização de bactérias do ácido láctico produtoras de bacteriocina e nas e sua aplicação no fabrico de queijo fresco**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) -Departamento de Ciências Agrárias.129f. Universidade de Açores. Angra do Heroísmo. 2013.

COPPOLA, S.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; MOSCHETTI, G. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n.3, p. 414-420, 2001.

CUNHA NETO, O. C. **Avaliação do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura**. 2003. 71f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

DEGEEST, B.; VANINGELGEM, F.; DE VUYST, L. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 9, p. 747-757, 2001.

DE VUYST, L., DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microb. Rev.**, v. 23, n. 2, p. 153-177, 1999.

DE VUYST, L.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; REVETS, H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 299 - 318, 2003.

DIAS, G. Microfiltração como alternativa na produção de queijos com olhaduras e utilização da fase aquosa para avaliação de suas características físico-químicas. Viçosa, Minas Gerais: UFV, 2011. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, 2011.

EL-SALAM, M.; EL-SHININY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy Science & Technology**, v 91, p.663–699, jun. 2011.

EMBRAPA Agroindústria Tropical, **Caracterização Tecnológica de Bactérias Lácticas Visando à sua Aplicação na Produção de Fermentos Lácticos**, p. 7-15, Ceará, 2017.

ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G.; BLAIOTTA, G.; MOSCHETTI, G.; COPPOLA, S. PCR– DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo Mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n.2, p. 263-270, 2004.

FAO / WHO. Orientações para a avaliação de probióticos na alimentação. London, 11 p, 2002.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Faostat agriculture data (Agricultural production – live animals – livestock). FAO, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. Acesso em: 22 de março de 2019.

FERNÁNDEZ, E.; ALEGRÍA, A.; DELGADO, S.; MAYO, B. Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, n. 3,142-148, 2010.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg, AN Aspen Publication, 587 p. 2000.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Chapman & Hall, v. 1, 617 p. 2004.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CARLIN, S.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. A factoryscale application of secondary adjunct cultures selected from lactic acid bacteria during Puzzone di Moena cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 3, p. 2981-2991, 2008.

FRÖHLICH-WYDER, M. T.; GUGGISBERG, D.; BADERTSCHER, R.; WECHSLER, D.; WITTWER, A.; IRMLER, S. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus parabuchneri* on the eye formation of semi-hard cheese. **International Dairy Journal**, v.33, p.120-128, 2013.

FURTADO, M. M. Composição centesimal do leite de búfala na zona da mata mineira. **Revista Instituto Candido Tostes**, v.35, n.211, p.43-47, 1980.

FURTADO, M. M. A Arte e a Ciência do Queijo. 2 Ed., Editora Globo S.A, São Paulo-SP, 1991. (Publicações Globo Rural).

FURTADO, M. M. **Manual Prático da Mussarella** (Pizza Cheese). Campinas: Master Graf, 1997.

FURTADO, M.M. **Quesos típicos de latino américa**. São Paulo: Fonte Comunicações, 2005.

GANGULI, N. C. Tecnología de la leche de búfala. **Ver. Mund. Zootec.**, v.30, p.2-10, 1979.

GERNIGON, G.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. Processing of Mozzarella cheese wheys and stretchwaters: A preliminary review. **Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 92, n 11, p. 5371-5377, 2009.

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-Listeria factors in dairy technology. **Food Microbiol.**, v. 12, n. 1, p. 291-299, 1995.

GONÇALVES, S.M.L. **Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril.** 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

GROSU-TUDOR, S. S. et al. Isolation of novel homopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from Romanian raw milk and fermented dairy products. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 4, p. 609-615, 2013.

GUARCELLO, R.; CARPINO, S.; GAGLIO, R.; PINO, A.; RAPISARDA, T.; CAGGIA, C.; MARINO, G.; RANDAZZO, C.L.; SETTANNI, L.; TODARO, M. A large factory-scale application of selected autochthonous lactic acid bacteria for PDO Pecorino Siciliano cheese production. **Food Microbiology**, v. 59, p. 66-75, 2016.

GUSSO, A. P. Aspectos de controle e manutenção de salmouras utilizadas para salga de queijos. **Revista indústria de laticínios.** Ano X, n. 88, p.35-47, 2011.

HOR, Y. Y.; LIONG, M. T. Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. **Dermatologica Sinica**, v.32, p.141-147, 2014.

IFBA. **Fermentação Láctica e Laticínios.** Instituto Federal da Bahia. 2013. Disponível em: <https://bioifnmg.files.wordpress.com/2015/04/texto-fermentac3a7c3a3o-lc3a1tica.pdf> >.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mg&tema=pecuaria2015>> acesso em 02.08.2017. Fonte: Produção da Pecuária Municipal – 2015.

ISLAM, M.; ECKEBERG, D.; RUKKE, E.; VEGARUD, G.E. Ex vivo digestion of proteins and fat in buffalo milk. **International Dairy Journal**, nº 52, p. 82-91, jan. 2016.

JOSHI, S. R.; KOIJAM, K. Exopolysaccharide production by a lactic acid bacteria, *Leuconostoc lactis* isolated from ethnically fermented beverage. **National Academy Science Letters**, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.

KLEEREBEZEM, M.; KUIPERS, O. P.; SMID, E. Lactic acid bacteria - a continuing journey in science and application. **FEMS Microbiology Reviews** 41 (Supp\_1): S1-S2. 2017.

KORAKLI, M., GANZLE, M.G., VOGEL, R.F. Metabolism by *bifidobacteria* and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. **J. Appl. Microbiol.** 92, 958-965, 2006.

KOSIKOWSKI F. V. Cheese and fermented milk foods. 3. ed. Ann Arbor, MI: Westport Brothers, v.2, 1979.

LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. and VON WRIGHT, A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press. 2011.

LAZZI, C.; POVOLO, M.; LOCCI, F.; BERNINI, V.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Can the development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction? The case of Grana Padano. **International Journal of Food Microbiology**, v. 233, p. 20-28, 2016.

LEITE, M.O.; LEITE, D.C.; DEL AGUILA, E.M.; ALVARES, T.S.; PEIXOTO, R.S.; MIGUEL, M.L.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.4149-4159, 2013.

LOCCI, F.; GHIGLIETTI, R.; FRANCOLINO, S.; IEZZI, R.; OLIVIERO, V.; GAROFALO, A.; MUCCHETTI, G. Detection of cow milk in cooked buffalo Mozzarella used as Pizza topping. **Food Chem.**, v.107, P.1337–1341, 2008.

MARTINS, A.D.O. et al. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.5, n.1, p.53-59, 2006.

MIETTINEN S.M., TUORILA H, PIIRONEN V, VEHKALAHTI K, HYVÖNEN L. Effect of emulsion characteristics on the release of aroma as detected by sensory evaluation, static headspace gas chromatography, and electronic nose. **Journal Agric Food Chem**. 17;50 (15), 2002.

MOREA, M.; BARUZZ, F.; CAPPÀ, F.; COCCONCELLI, P. S. Molecular characterization of the *Lactobacillus* community in traditional processing of Mozzarella cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 53-60, 1998.

MOTTA, A. S; GOMES, M. S. M. Propriedades tecnológicas e funcionais de bactérias lácticas: a importância destes microrganismos para alimentos. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 3, p. 172-184, mai/jun, 2015.

MOZZI, F. et al. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. 1. ed. Wiley-Blackwell, 417p. 2010.

NIETO-ARRIBAS, P.; POVEDA, J. M.; SESEÑA, S.; PALOP, L. L.; CABEZAS, L. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese Caracterização Tecnológica de Bactérias Lácticas Visando à sua Aplicação na Produção de Fermentos Lácticos for potential use as adjunct starter cultures. **Food Control**, v. 20, p. 1092-1098, 2009.

OLIVEIRA, C. M. C.; BARBOSA, J. D.; MACEDO, R. S. C.; BRITO, M. F.; PEIXOTO, P. V.; TOKARNIA, C. H. Estudo comparativo da toxidez de *Palicourea juruana* (Rubiaceae) para búfalos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, p.27-30, 2004.

OLIVEIRA, P.M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E.K. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. **Food Microbiology**, v.37, p.78-95, 2014.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. In: SOCIETY EXPERIMENTAL OF BIOLOGY MEDICINE, **Proceedings**... v. 223, p. 8-13, 2000.

PASSERINI, D.; LAROUTE, V.; CODDEVILLE, M.; LE BOURGEOIS, P.; LOUBIÈRE, P.; RITZENTHALER, P.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; DAVERAN-MINGOT, M. L. New insights into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins. **Food Microbiology**, v.160, p.329-336, 2013.

PEDERSEN, T.B.; RISTAGN, D.; MCSWEENEY, P.L.H.; VOGENSE, F.K.Y.; ARD, Y. Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. **International Dairy Journal**, v.33, p.112-119, 2013.

PIARD, J.C. et al. Bactérias lácticas: as bactérias lácteas no centro de novos desafios tecnológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Encarte Especial, 2011.

PIGNATA, M. C., et al. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 226 – 233, out.- dez., 2014.

PRICHULA, J. et al. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade das espécies de enterococos isolados de leite cru de búfalas no Sul do Brasil. **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 104-109, abr./jun. 2013.

POGACIC, T.; MAILLARD, M.B.; LECLERC, A.; HERVE, C.; CHUAT, V.; YEE, A; VALENCE, F.; THIERRY, A. A methodological approach to screen diverse cheese related bacteria for their ability to produce aroma compounds. **Food Microbiology**, v.46, p.145-153, 2015.

POZNANSKI, E.; CAVAZZA, A.; CAPPA, F.; CONCCONCELLI, P.S. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 92, n.2, p. 141-151, 2004.

REALE, A.; DI RENZO, T.; ROSSI, F.; ZOTTA, T.; LACUMIN, L.; PREZIUSO, M.; PARENTE, E.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT-Food Sci. Technol.**, v. 60, n. 1, p. 721-728, 2015.

RICCIARDI, A.; PARENTE, E.; CRUDELE, M.; ZANETTI, F.; SCOLARI, G.; MANNAZZU, I..Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. **Journal of Applied Microbiology** 92:297–308, 2002.

RINCON-DELGADILLO, M.I.; LOPEZ-HERNANDEZ, A.; WIJAYA, I.; RANKIN, S.A. Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.1128-1139, 2012.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J. and ZOON, P.; An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, vol. 12, no. 2-3, p. 163-171, 2002.

SALMINEN, S. **Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects**. Edited. Atte von wright - 2th, 607p. 1998.

SANTOS, C. L. A. **Caracterização de segurança e tecnológica de bactérias acidoláticas termofílicas autóctones e aplicação em queijo Parmesão**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, São José do Rio Preto, São Paulo, 2015.

SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 4, p. 394-406, 2006.

SERRANO, L. E. F. **Utilização de diferentes culturas lácticas na fabricação de mussarela de leite de búfala.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2008.

SILVA, S. L.; JUNIOR, G. N. Produção de derivados bubalinos e mercado consumidor. **Tekhne e Logos**, Botucatu, SP, v.5, n.1, Abril - Julho, 2014.

SILVA, M. S. T.; LOURENÇO Jr., J. B. de L.; GOLÇALVES, I. A.; MIRANDA, H dos A.; ERCHEN, R.; FONSECA, R. F. S. R.; MELO, J. A. de; COSTA, J. M. **Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF.** Belém, PA: CPATU, 2003. Disponível em <http://www.cpatu.embrapa>.

SILVA, F. I. **Utilização de fermento láctico endógeno em queijo mussarela,** Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Paraná, 2015.

SOUZA, T. D. S. Production of Exo-polysaccharides by Probiotic Bacteria: Optimisation of the Culture Medium, **Brazilian Journal of food technology**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 27-34, jan./mar. 2007.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.

SYBESMA, W. et al. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.4, p.424-448, 2006.

TEIXEIRA, L. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 2005, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun. 2005.

TONHATI, H.; SESANA R. C; ALBUQUERQUE, L. G. **Avaliação genética de búfalos leiteiros.** Jaboticabal: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), 2007.

TORO, C.R. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune.** 2005. 153 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

VALE, W. G. Water buffalo world uptake - Prospects of buffalo production in Latin America. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 6, 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo, p.75-87, 1994.

VALE, W.G. Perspectivas da bubalinocultura no Brasil e na América Latina. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 1, 1999, Jaboticabal, SP. *Anais ...* Jaboticabal: UNESP/FCAV, p.1-26, 1999.

VERRUMA, M. R.; SALGADO, J. M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Sci. Agric.** Piracicaba, Braz. 1994, v.51, n.1, p.131-137, jan./abr. 1994.

VON WRIGHT, A., Genus *Lactococcus*. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A. (Eds.), Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition, Revised and Expanded. CRC Press, USA, p. 63-76. 2012.

WALLING, E., GINDREAU, E., LONVAUD-FUNEL, A. A putative glucan synthetase gene dps detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* isolated from wine and cider. **Int. J. Food. Microbiol.** 98, 53-62, 2005.

WANG, L.; DONG, M.; ZHENG, J.; SONG, Q.; YIN, W.; LI, J.; NIU, W. Relationship of biofilm formation and gelE Gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from Root canals in Patients Requiring Endodontic Retreatment. **Journal of Endodontics**, v.37, n. 5, p.631-636, 2011.

WERNING, M.L., IBARBURU, I., DUEÑAS, M.T., IRASTORZA, A., NAVAS, J., & LÓPEZ, P. *Pediococcus parvulus* gtf gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for Specific PCR detection of  $\beta$ -D-glucanproducing bacteria in foods and beverages. **Journal of Food Protection**, v.69, n.1, p.161-169. January 2006.

WILLIAMS, A. G.; WITHERS, S. E.; BANKS, J. M. Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. **Int. Dairy J.** 10, 17-23, 2000.

XIE, W.; KHOSASIH, V.; SUWANTO, A.; KIM, H. K. Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n.1, p.84-91, 2012.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Identificar e caracterizar bactérias ácido lácticas presentes em amostras de leite cru de búfalas, da região Centro-oeste de Minas Gerais, a partir da microbiota autóctone desse leite, verificando um potencial tecnológico e ações patogênicas.

### **Objetivos específicos**

1. Isolar e identificar as bactérias ácido lácticas;
2. Avaliar os fatores de patogenicidade dos isolados;
3. Avaliar o potencial tecnológico dos isolados.

**CAPÍTULO 2. Identificação do potencial tecnológico de bactérias ácido  
láticas de leite cru de búfalas**

## **Microbiology of raw milk of buffaloes**

### **Identification of the technological potential of lactic acid bacteria from raw milk of buffaloes**

SOUZA, L. A. N<sup>1</sup>; NERO, L. A<sup>1</sup>; CARVALHO, A. F<sup>2</sup>; YAMATOJI, R. S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medicine, UFV- Federal University of Viçosa

<sup>2</sup>Department of Food Technology, UFV- Federal University of Viçosa

## **Microbiology of raw milk of buffaloes**

**Keywords:** acid lactic bacteria; buffalo milk; technological potential; pathogenic factors.

\*Corresponding author: Department of Veterinary Medicine, UFV- Federal University of Viçosa, University Campus 36570.900- Viçosa- MG-Brazil. Telephone: 031 3899-1472 e-mail:ryamatogi@ufv.br

## RESUMO

A bubalinocultura é uma atividade em expansão no Brasil, em que a maioria dos bubalinos são criados para produção de leite e carne, com o intuito de gerar renda para os produtores rurais. O leite de búfala é valorizado pelas indústrias fabricantes de produtos lácteos, devido sua composição centesimal, que garante maior rendimento industrial, além do aumento da demanda do mercado consumidor, em razão do valor nutricional desses produtos. Bactérias ácido lácticas são utilizadas nas indústrias para atribuição de características tecnológicas aos alimentos e bioproteção, o que impulsiona a procura por novas cepas para uso como culturas *starters* ou adjuntas. O objetivo deste trabalho foi a seleção de bactérias ácido lácticas de leite cru de búfalas, de interesse para utilização pelas indústrias de laticínios, com potencial tecnológico e ausência de fatores patogênicos. Amostras de leite cru de búfalas, provenientes de 10 propriedades do Centro-Oeste de Minas Gerais, foram coletadas em recipientes estéreis para análises. Após o cultivo em meios seletivos e realização dos testes de Coloração de Gram e Catalase, foram isoladas ao todo 148 bactérias ácido lácticas, submetidas posteriormente a Rep-PCR. Destas, 47 foram catalogadas para verificação do potencial tecnológico e ações patogênicas. Os resultados mostraram a presença de 12 bactérias ácido lácticas com potencial tecnológico e ausência de fatores de virulência, avaliados fenotipicamente, apresentando características que favoreçam a sua aplicação no processamento de derivados lácteos. Os doze isolados selecionados são espécies de *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Lactococcus garvieae*, *L. lactis*, *Leuconostoc lactis* e *Enterococcus hirae*.

**Palavras-chave:** bactérias ácido lácticas; leite de búfala; potencial tecnológico; fatores patogênicos.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite de búfala é o segundo tipo de leite mais produzido no planeta, atingindo no ano de 2017 a produção de 120.353.705 toneladas em todo o mundo, correspondendo atualmente a 14,5 % da produção total. A Índia é o país com a maior produção deste leite, resultando em 86.261.680 toneladas e no segundo lugar está o Paquistão, com uma produção de 27.298.000 toneladas, seguido pela China, com 2.677.636 toneladas (FAO, 2017).

No Brasil, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2015), existem aproximadamente 1,5 milhões de bubalinos, que estão distribuídos por todos os estados brasileiros, além de ser considerado o país com o maior rebanho da espécie bubalina do ocidente. O crescimento da bubalinocultura no Brasil está atrelado a uma maior valorização do leite da búfala nas indústrias fabricantes de produtos lácteos, devido o aumento da demanda do mercado consumidor e da maior quantidade de sólidos totais presentes neste leite (BASTIANETTO, 2009).

Os produtos lácteos fabricados exclusivamente com leite bubalino são rentáveis para a indústria e comércio, pois os atributos deste leite favorecem a produção de derivados com importância nutricional e maior valor agregado. Além disso, a utilização do leite para produção de derivados é mais lucrativa para o criador (JORGE et al., 2002; BERNARDES, 2006; VIEIRA, 2009).

As BAL atribuem a fabricação dos derivados, qualidades tecnológicas e bioproteção em diversos alimentos, auxiliando no tipo de textura, aumento de sabor, vida útil e preservação (OLIVEIRA; ZANNINI; ARENDT, 2014). Constituem um grupo amplo de cocos e bacilos gram-positivos, tolerantes a ácidos e fermentativas (BROADBENT; BUDINICH; STEELE, 2016).

A investigação de BAL úteis, geneticamente seguras e de fontes autóctones estão gerando produtos regionalizados e características próprias, sendo estes fatores, contribuições relevantes à industrialização de produtos (ADNAN e TAN, 2007). Os gêneros que compõem o grupo das BAL são *Aerococcus*, *Atopobium*, *Brochotrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (LAHTINEN et al., 2011; MOTTA, 2015; KLEEREBEZEM et al., 2017).

Devido à importância dessas bactérias para o processo de fabricação de diversos derivados lácteos, além da procura por novas cepas autóctones, o presente estudo buscou identificar e caracterizar bactérias ácido lácticas presentes em amostras de leite cru de búfalas, da região Centro-oeste de Minas Gerais, a partir da microbiota autóctone desse leite, verificando um potencial tecnológico e ações patogênicas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram coletadas um total de 10 amostras de leite cru de búfalas, de 10 fazendas diferentes, localizadas no Centro-oeste de Minas Gerais. As coletas ocorreram em dias diferentes, sendo adquirido um volume de 200 mL de leite de búfalas por propriedade, em um recipiente estéril, retirado do tanque de resfriamento ou de latões logo após a ordenha. As amostras foram armazenadas em caixa isotérmica com gelo e transportadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal - INSPOA no Departamento de Medicina Veterinária - DVT, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, onde foram realizadas as análises.

### **2.2 Isolamento e identificação das bactérias ácido lácticas**

O cultivo e o isolamento das bactérias ácido lácticas foram realizados utilizando-se diluições decimais seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) das amostras de leite cru em solução salina a 0,85 %. A partir das diluições, a alíquota de 0,1 mL foi aplicada pelo método em superfície em placas contendo ágar *De Man, Rogosa e Sharpe* - (MRS, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) e ágar M17 complementado com 10 % de lactose e incubadas em jarras de anaerobiose (gerador de anaerobiose - GasPak, USA) a 37 °C por 48 horas. Após a incubação, foram selecionadas de 5 a 10 colônias de cada placa e estas foram repicadas para tubos contendo 5 mL de caldo dos meios correspondentes (MRS e M17). Os tubos foram incubados por 24 horas à 37 °C e após crescimento, os isolados foram novamente estriados em placas contendo meios de cultura MRS e M17, para a avaliação da pureza.

As colônias puras foram submetidas ao Teste da Catalase e à Coloração de Gram. As bactérias com morfologia (Bacilos e Cocos), Gram positivas e

Catalase negativas, provenientes dos tubos, foram estocadas, em duplicatas, em microtubos contendo 2 mL de MRS com 15 % de glicerol estéril, para as etapas futuras.

### 2.3 Identificação dos isolados

Os isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) foram agrupados por meio da técnica de Rep-PCR e a partir do grupo formado e perfil (*cluster*) foram selecionados para identificação da região 16S rRNA, afim de obter o gênero bacteriano.

#### 2.3.1 REP PCR

Os isolados foram reativados em 5 mL dos caldos correspondentes (MRS e M17) e incubados à 37 °C, *overnight*. Após o período de incubação, 1 mL do caldo de cada amostra, foi transferido para um microtubo e centrifugado a 1500g por 2 minutos, desprezando o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspenso em água ultrapura autoclavada, para obtenção do DNA genômico através do Kit Genomic Wizard DNA Purification kit (Promega Corp. Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de amplificação foi realizada de acordo com Gevers et al. (2001), com alterações, utilizando o primer GTG (5' - GTG GTG GTG GTG GTG - 3'), usando o programa constituído por uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 40 °C por 30 segundos e extensão a 65 °C por 8 minutos. Após os ciclos, efetuou-se uma extensão final de 65 °C por 16 minutos.

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2 % (Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) adicionado intercalante Unisafe®. Os fragmentos de DNA foram visualizados em analisador de imagens (L PIX – Loccu Biotecnologia), conjuntamente com marcador de peso de 1 Kilo base (kb) (Thermo), sendo as imagens armazenadas.

As imagens foram analisadas utilizando BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). As semelhanças entre os perfis foram calculadas usando a correlação de Dice, com otimização e tolerância de 5 % e os

dendogramas construídos usando o Método do Grupo de Pares Não Ponderados com Média Aritmética (UPGMA).

### 2.3.2 Sequenciamento dos isolados

Um isolado de cada *cluster* foi sequenciado utilizando *primers* universais 16S rRNA e os iniciadores 8f, (5'- CAC GGA TCC AGA CTT TGA T(C/T)(A/C) TGG CTC AG-3') e 1512r, (5'- GTG AAG CTT ACG G(C/T)T AGC TTG TTA CGA CTT-3'), de acordo com (WEISBURG et al., 1991). Para amplificação dos isolados utilizou-se um programa constituído por uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 segundos, anelamento a 54 °C por 20 segundos e extensão a 68 °C por 2 minutos. Após os ciclos, efetuou-se uma extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram armazenados em placas de 96 poços e enviados para o sequenciamento no laboratório da Macrogen Inc. (*Seoul, South Korea*). Os resultados foram analisados com auxílio do software Mega 7 e comparados por meio da ferramenta *Blast*, com o Centro Nacional de Biotecnologia- *NCBI/Genbank*.

## 2.4 Avaliação qualitativa do potencial tecnológico

Os isolados identificados no sequenciamento foram testados quanto ao seu potencial tecnológico a partir de ensaios físicos e bioquímicos qualitativos.

### 2.4.1 Produção de diacetil

A produção de diacetil foi definida de acordo com King (1948). Os isolados foram inoculados em 10 mL de leite UHT e incubados a 30 °C durante 24 horas. Um mililitro de cada suspensão celular foi combinado com 0,5 mL de  $\alpha$ -naftol (1 % p / v) e solução de KOH (16 % p / v) e incubado a 30 °C durante 10 minutos. A produção de diacetil foi indicada pela formação de um anel vermelho na parte superior dos tubos. O teste foi realizado em duplicata.

#### 2.4.2 Atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi avaliada por culturas de BAL na superfície seca de Ágar Contagem Padrão (ACP) acrescidos de Tributirina a 1 % com posterior incubação à 30 °C, durante 72 horas. A atividade lipolítica foi analisada por uma zona clara ao redor do crescimento das colônias (HANTSIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007). Em outro método, alíquotas de 1 µL das culturas previamente incubadas foram semeadas pontualmente em placas contendo ágar Lúria-Bertani suplementado com 2 g/L de CaCl<sub>2</sub> e 10 g/L de Tween 80, e incubadas a 37 °C por 48 horas. A atividade lipolítica foi identificada pela formação de halos opacos ao redor das colônias (BARBOSA, 2010).

#### 2.4.3 Atividade proteolítica extracelular

A atividade proteolítica extracelular foi avaliada conforme o método de Franciosi et al. (2009). Após reativação dos isolados, 2 µL foram inoculados na superfície de meio Ágar Contagem Padrão, acrescidos de 10 % leite em pó desnatado e incubados a 30 °C, durante 96 horas. A atividade proteolítica foi observada pela formação de uma zona clara ao redor das colônias.

#### 2.4.4 Formação de exopolissacarídeos (EPS)

As estirpes foram cultivadas em meio de ágar MRS, modificados contendo 2 % da fonte de carbono selecionada: glicose, sacarose, frutose e lactose. As culturas apresentadas nas placas foram incubadas a 30 °C por 72-120 horas e as cepas que produziram colônias viscosas foram consideradas positivas para o EPS (SMITINONT et al., 1999). Além deste teste, foi realizado outro, conforme Cogan (1996), em que a produção de EPS a partir da glicose foi determinada qualitativamente pela observação do grau de 'rigidez' das culturas que haviam sido cultivadas em MRS (10 % p/v), a 30 °C por 18 horas. Foram consideradas positivas as culturas que puderam ter seu coágulo manipulado, formando uma linha de inoculação em espiral.

#### 2.4.5 Perfil de Lactofermentação

Para a realização deste teste, utilizou-se o protocolo conforme Behmer (1985), para avaliação do perfil de lactofermentação. Foram inoculados 20 µL das culturas, em duplicata, em tubos cônicos (tipo Falcon), contendo 10 mL de leite em pó desnatado reconstituído a 10 % (m/v) esterilizado. Em seguida, estes foram incubados a 30 °C, por 24 horas. Os resultados foram interpretados de forma visual de acordo com o coágulo formado em: sem coágulo; com grumos; gelatinoso sem soro; gelatinoso com soro; caseoso com soro e gás; contraído com soro; coágulo pequeno no fundo do tubo, sem grumos e sem soro.

### 2.5 Avaliação qualitativa dos fatores de patogenicidade

Os mesmos isolados testados no item 2.4 foram investigados quanto a presença de fatores patogênicos.

#### 2.5.1 Atividade Desoxirribonuclease

1 µL das culturas *overnight* foi semeado pontualmente em placas contendo ágar DNase suplementado com verde de metila e incubadas a 37 °C por 48 horas. Atividade desoxirribonuclease foi avaliada através da formação de halos transparentes ao redor das colônias (BARBOSA, 2010).

#### 2.5.2 Gelatinase

Após período de incubação (*overnight*), uma alíquota de 1 µL do isolado foi semeada pontualmente em placas contendo ágar *Lúria-Bertani (LB)* suplementado com 30 g/L de gelatina e incubadas a 37 °C por 48 horas. Após a incubação, as placas foram mantidas a 4 °C por 4 horas, para confirmação dos resultados. A hidrólise da gelatina foi confirmada pela presença de halos opacos ao redor das colônias (BARBOSA, 2010).

### 2.5.3 Atividade hemolítica

Para verificação da atividade hemolítica, alíquotas de 1 µL das culturas previamente incubadas a 30 °C, foram semeadas pontualmente em placas contendo TSA (Oxoid Ltd.), suplementado com 5 % de sangue de cavalo defibrinado, com incubação a 37 °C por 48 horas. Os resultados foram classificados em: hemólise parcial ou alfa hemólise (halos esverdeados ao redor da colônia), hemólise total ou beta hemólise (halos transparentes ao redor da colônia), e ausência de hemólise ou gama hemólise (ausência de halo ao redor da colônia) (BARBOSA, 2010).

## 2.6 Análise quantitativa do potencial tecnológico

Os isolados que apresentaram características de bactérias com bom desempenho tecnológico e favorável aos fatores de virulência, foram selecionados para os testes quantitativos relacionados a atividade acidificante, atividade autolítica e capacidade de crescimento em diferentes concentrações de NaCl.

### 2.6.1 Atividade acidificante

As cepas foram reativadas em caldo MRS e M17 e incubadas à 30 °C, *overnight*. Tubos contendo 10 mL de leite desnatado esterilizado (10 % w/v, Molico, Nestle, São Paulo, SP, Brazil) foram inoculados com as cepas reativadas. O produto incubado foi aferido quanto ao pH no tempo 0, 3, 6 e 24 horas. Os dados estão expressos como a média da análise em duplicata (RIBEIRO et al., 2013).

### 2.6.2 Atividade autolítica

A autólise celular foi medida conforme o descrito por Mora et al. (2003). As cepas foram cultivadas em caldo MRS e M17 a 30 °C durante 24 horas, para atingir uma  $DO_{550nm}$  0.8-1. As células foram lavadas em tampão fosfato de potássio ( $50mmol^{-1}$ , pH 6,5), ressuspensas no mesmo tampão para uma  $DO_{550nm}$  de 0.6-0.8 e incubadas a 30 °C. O grau de autólise foi expresso

avaliando a diminuição na  $DO_{550nm}$ , após 4, 6, 24 e 48 horas, usando um espectrofotômetro Bel UV- M51 (Bel Engineering). As análises foram realizadas em duplicata.

### 2.6.3 Capacidade de crescimento em diferentes concentrações de NaCl

As cepas foram cultivadas em caldo MRS e M17, suplementados com 4 %, 6 % e 10 % de NaCl. A capacidade das cepas para crescer a cada diferente concentração de sal, foi avaliada após 24 horas de incubação a 30 °C, através da densidade óptica ( $DO_{550nm}$ ), utilizando o espectrofotômetro Bel UV- M51 (Bel Engineering). Todos os ensaios foram realizados em duplicata (DAL BELLO et al., 2012).

## 2.7 Análise estatística

Os testes quantitativos (acidificação; autólise; crescimento em NaCl) foram analisados na forma descritiva. Os testes qualitativos (produção de diacetil; lipolítico; proteolítico; produção de gás; produção de EPS; lactofermentação; DNase; gelatinase; hemolítico), foram analisados utilizando o Teste de Chi-quadrado para comparar as espécies bacterianas selecionadas (1= positivo e 0= negativo). A análise estatística foi realizada com o programa R (STUDIO, 2012), sendo a significância estatística definida como  $P < 0.05$ .

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Identificação

Ao todo, 148 isolados foram obtidos das 10 amostras de leite bubalino, sendo morfológicamente Gram positivos e catalase negativos. Deste grupo, 47 isolados foram selecionados para o sequenciamento, após análise dos perfis obtidos na Rep-PCR e a origem do isolado (Anexo 1).

O resultado do sequenciamento apresentou um total de 43 isolados pertencentes ao grupo de bactérias ácido lácticas, sendo estes oriundos de 5 gêneros (Tabela 1). Os gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus* foram os mais frequentes deste grupo. Outros 4 isolados foram descartados por serem

classificados como espécies que não fazem parte das BAL, sendo elas, *Aerococcus urinae equi*; duas espécies de *Raoutella*; uma espécie de *Klebsiella aerogenes*.

**Tabela 1.** Gêneros e espécies das bactérias ácido lácticas isoladas em amostras de leite cru de búfalas, da região Centro-Oeste de Minas Gerais, Brasil.

<b>Gêneros</b>	<b>Nº *(n=43)</b>	<b>Espécies</b>	<b>Nº *(n=43)</b>
<i>Lactococcus</i>	15 (35 %)	<i>Lactococcus garvieae</i>	7 (16,3 %)
		<i>Lactococcus lactis</i>	8 (18,6 %)
<i>Streptococcus</i>	9 (21 %)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	3 (7 %)
		<i>Streptococcus ferus</i>	1 (2,3 %)
		<i>Streptococcus uberis</i>	5 (11,6 %)
<i>Lactobacillus</i>	8 (19 %)	<i>Lactobacillus casei</i>	4 (9,3 %)
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	4 (9,3 %)
<i>Enterococcus</i>	7 (16 %)	<i>Enterococcus faecalis</i>	2 (4,7 %)
		<i>Enterococcus hirae</i>	5 (11,6 %)
<i>Leuconostoc</i>	4 (9 %)	<i>Leuconostoc lactis</i>	3 (7 %)
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1 (2,3 %)

\*Quantidade de isolados baseado no total de 43

### 3.2 Análise qualitativa do potencial tecnológico

Os resultados dos testes qualitativos do potencial tecnológico e patogênico dos 43 isolados de BAL estão apresentados no Anexo 2. A partir destes resultados, selecionou-se 12 isolados de BAL que apresentaram características desejáveis para utilização na indústria de alimentos (Tabela 2). Os resultados dos testes qualitativos de potencial tecnológico e fatores de patogenicidade dos 12 isolados selecionados estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 2.** Espécies de BAL selecionadas de leite cru de búfala

<b>Espécies</b>	<b>Nº de isolados</b>
<i>Enterococcus hirae</i>	1
<i>Lactobacillus casei</i>	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3
<i>Lactococcus garvieae</i>	1
<i>Lactococcus lactis</i>	3
<i>Leuconostoc lactis</i>	2
<b>Total</b>	<b>12</b>

No geral, observou-se que 9 (75 %) dos isolados foram produtores de diacetil, 100 % apresentaram atividade proteolítica e ausência de atividade lipolítica. Em relação à produção de gás, o gênero *Leuconostoc* foi o único que manifestou essa característica, sendo importante atributo para a indústria de alimentos, principalmente em determinados tipos de queijos (Tabela 3).

A produção de EPS apresentou resultado distinto entre os isolados, sendo o gênero *Lactobacillus* de melhor produção desta qualidade. As espécies encontradas neste estudo apresentam um padrão de coagulação variado, analisando os resultados expostos na Tabela 3, sendo desejável a coagulação produzida pelas espécies de *Lactococcus lactis* (Coágulo gelatinoso, com soro). Ademais, duas espécies de *Lactobacillus plantarum* também se destacam, por exibirem o padrão de coagulação (Gelatinoso, sem soro).

**Tabela 3.** Resultado da triagem das bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru de búfala, a partir da análise qualitativa do potencial tecnológico e patogênico.

Isolados positivos e negativos em testes de potencial tecnológico						Lactofermentação					Patogenicidade			
Isolados	Espécies	Diacetil	Lipolítico	Proteolítico	Produção de gás	Produção de EPS					Padrão de coagulação*	DNase	Gelatinase	Hemólise
						MRS	Lactose	Frutose	Glicose	Sacarose				
A	<i>Enterococcus hirae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	1	-	-	-
B	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	2	-	-	-
C	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	2	-	-	-
D	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	3	-	-	-
E	<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	2	-	-	-
F	<i>Lactobacillus paracasei</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	4	-	-	-
G	<i>Lactococcus garvieae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	3	-	-	-
H	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	4	-	-	-
I	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	+	-	+	-	+	+	+	4	-	-	-
J	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	4	-	-	-
K	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	5	-	-	-
L	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	5	-	-	-

Padrão de coagulação \*1= Com grumos; 2= Coágulo gelatinoso, sem soro; 3= Coágulo pequeno no fundo, sem grumos e sem soro; 4= Coágulo gelatinoso, com soro; 5= Coágulo caseoso, com soro e gás.

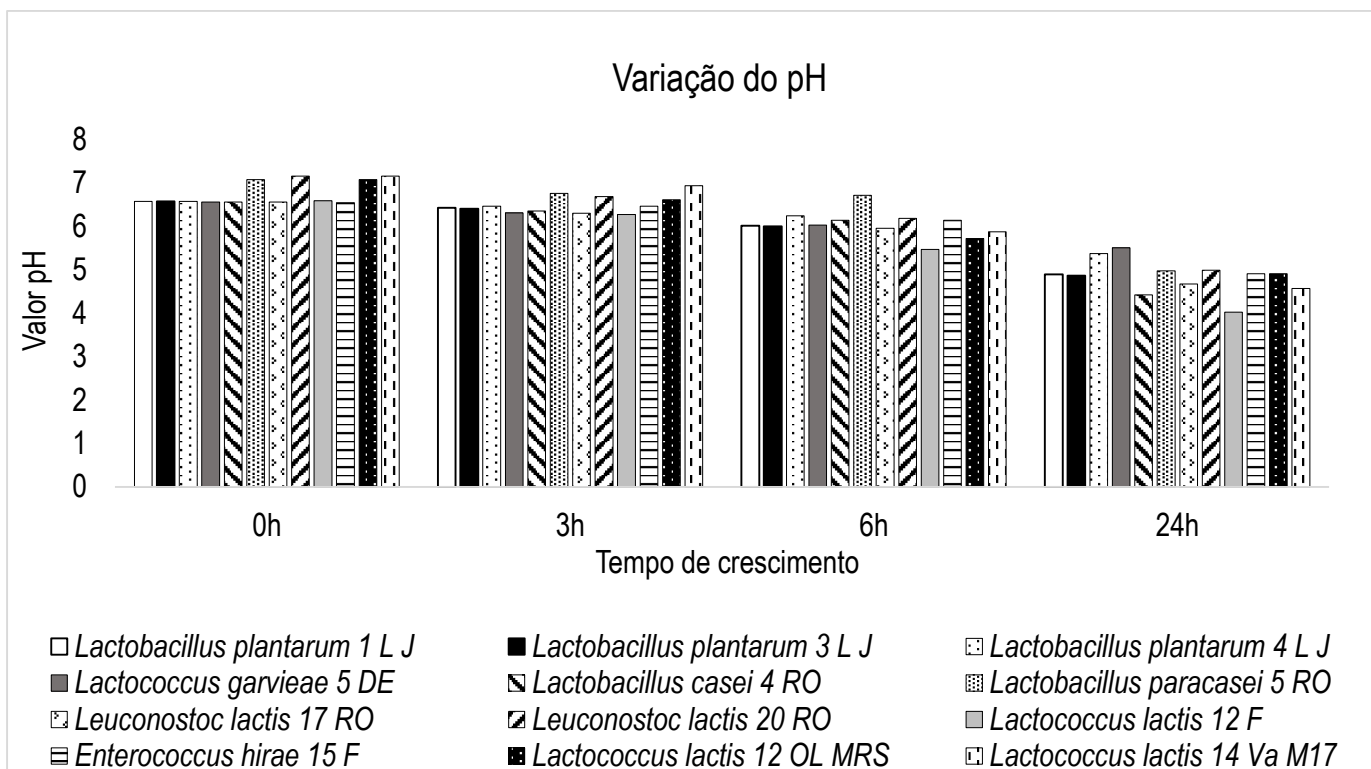
### **3.3 Avaliação dos fatores de patogenicidade**

Os potencial patogênico foi o primeiro critério para seleção dos 12 isolados finais. Ao analisar os resultados dos testes de patogenicidade dos 43 isolados (Anexo 2) observa-se que 24 (56 %) das BAL apresentaram resultado positivo para o teste de hemólise e 4 (9 %) resultado positivo para gelatinase, caracterizando-as assim como impróprias para serem utilizadas na fabricação de alimentos. No entanto, todas as BAL tiveram resultados negativos para o teste de DNase, sendo esta uma característica quista pela indústria. A partir desta análise foram eliminadas as BAL com potencial patogênico, selecionando àquelas que apresentaram resultados negativos para todos os testes patogênicos (Tabela 3).

### **3.4 Avaliação do potencial tecnológico quantitativo**

#### **3.4.1 Atividade acidificante**

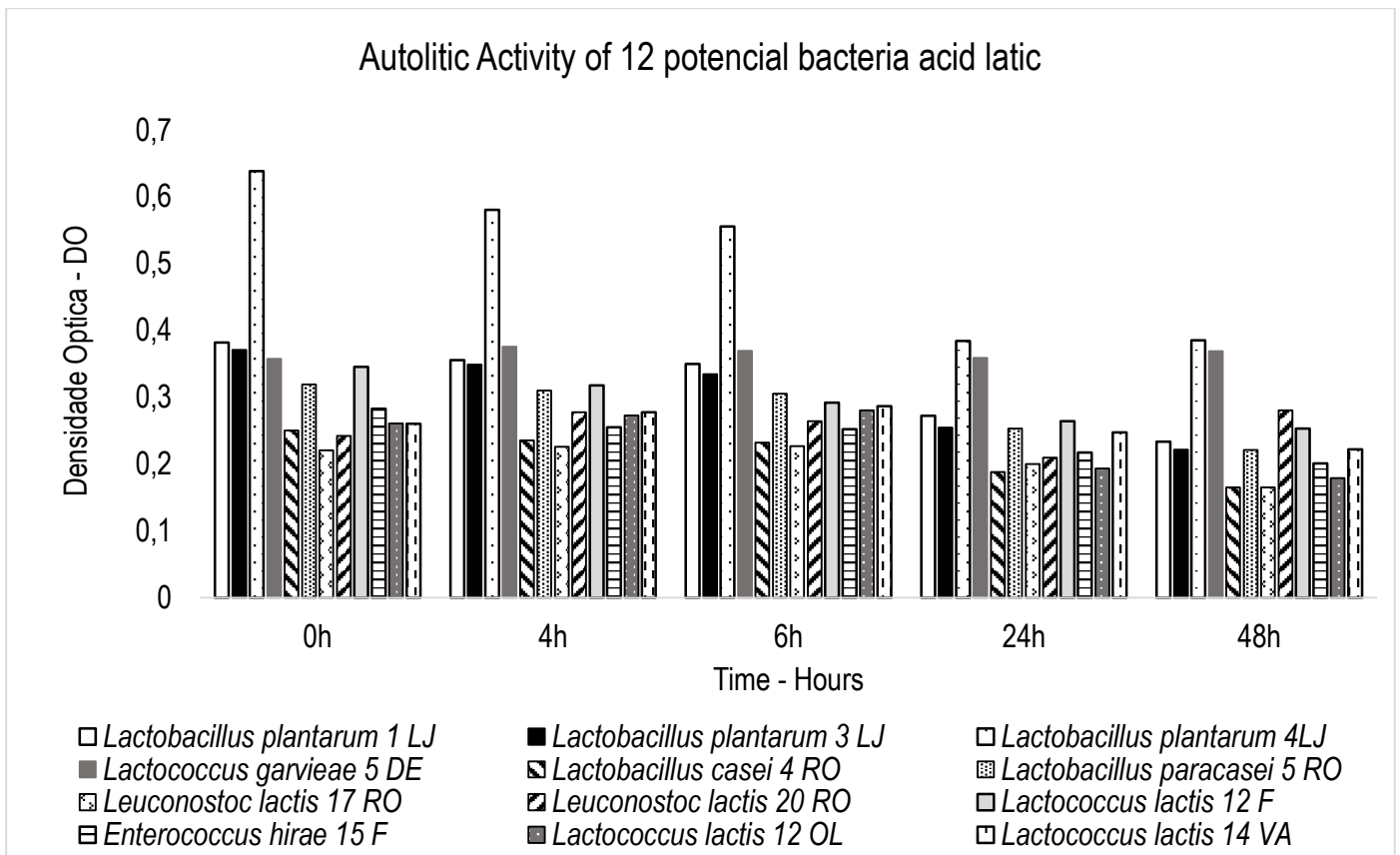
Os valores de pH inicial (zero horas) dos 12 isolados de bactérias ácido lácticas selecionados, apresentaram valores próximos a 7, diminuindo ao longo dos tempos testados até o intervalo de pH 4,0 a 5,5 obtido no tempo de 24 horas. No total, 10 (83 %) dos isolados testados atingiram um pH menor que 5 em 24 horas, destacando o *Lactococcus lactis* com o menor pH obtido (4,03) (Figura 1).



**Figura 1.** Potencial de acidificação de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de búfala.

### 3.4.2 Atividade autolítica

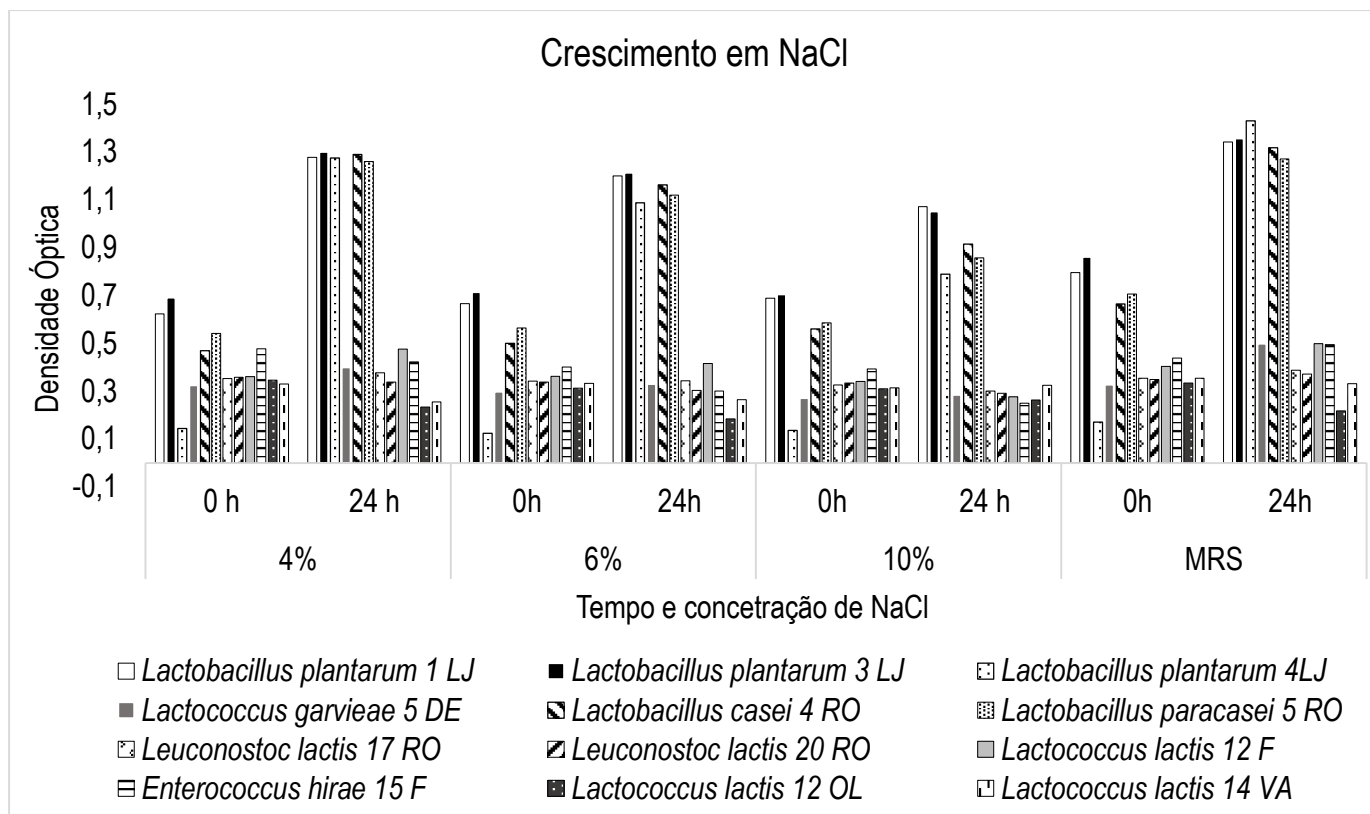
Os 12 isolados testados apresentaram uma queda na densidade óptica (D.O.) após 24 horas, comprovando um processo de autólise após este período. Cabe destacar que a espécie *Lactobacillus plantarum* apresentou a maior queda de D.O. (redução de 0,2), conforme Figura 2.



**Figura 2.** Avaliação da autólise de espécies de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de búfala.

### 3.4.3 Capacidade de crescimento em diferentes concentrações de NaCl

As espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* apresentaram o mesmo padrão de crescimento nas diferentes concentrações de NaCl, sendo capazes de se multiplicarem mesmo em uma concentração mais alta de sal. Dois isolados de *Lactobacillus plantarum* e o isolado de *L. casei* expressaram maior multiplicação em NaCl, conforme Figura 3. Ademais, o isolado de *Lactococcus garvieae* também foi capaz de se multiplicar em todas as concentrações de NaCl analisadas.



**Figura 3.** Osmotolerância de bactérias ácido lácticas isoladas de leite bubalino.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Frequência

A frequência de gêneros descrita nessa pesquisa (Tabela 1) assemelha-se ao encontrado em produtos lácteos fabricados com leite de búfala. As amostras de BAL viáveis manifestaram-se de maneira heterogênea em nosso trabalho, assim como em alguns trabalhos da literatura. Silva (2010), corroborando com este estudo, identificou após caracterização da microbiota láctica isolada de queijo *mozzarella* de búfala, bactérias semelhantes, constatando estirpes de *Lactobacillus casei* por meio do seqüenciamento do gene 16S rRNA em amostragens de coalhada e soro no decorrer do processamento de *mozzarella*, como descrito neste trabalho. O gênero *Lactobacillus* está presente na lista GRAS do *Codex Alimentarius* e tem sido bastante utilizado como probiótico (KEMPKA, 2008).

Em concordância com o presente trabalho, Morea e colaboradores (1999), também identificaram linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* em *mozzarella* de búfala, através do sequenciamento do gene 16S rRNA. No entanto, em uma

pesquisa feita por Villani e colaboradores (1997), esta cultura correspondeu a mais de 70 % das bactérias isoladas de soro fermento utilizado na fabricação desse produto, divergindo com os resultados deste trabalho, em que esse gênero apresentou a menor frequência. *Leuconostoc lactis* é uma BAL heterofermentativa, descrita na literatura com potencial para produção de diacetil e EPS em alimentos lácteos (SARAVANAN e SHETTY, 2016).

O gênero *Lactococcus* foi o grupo com maior frequência entre os isolados de BAL de leite de búfala, enquanto *Enterococcus* e *Leuconostoc* foram gêneros encontrados em menor quantidade (Tabela 1). A espécie *Lactococcus lactis* é geralmente reconhecido como seguro (GRAS), sendo capaz de produzir ácido láctico em culturas lácteas e auxiliar a proteólise do leite durante a fermentação, favorecendo às propriedades sensoriais e microbiológicas do produto (CAVANAGH et al., 2015). Além disto, a espécie *L. lactis ssp. lactis* constitui uma cultura *starter* muito utilizada na indústria de laticínios e por isto, tem elevada importância econômica, sendo utilizada na fabricação de leites fermentados, nata, manteiga e queijos (YERLIKAYA, 2019).

Outro importante gênero encontrado neste estudo foi o grupo *Enterococcus*. Esta bactéria tem sido empregada como probiótico para humanos ou animais, apesar deste gênero não ser considerado "geralmente reconhecido como seguro" (GRAS) (ARAÚJO e FERREIRA, 2013). Os *Enterococcus* podem contribuir às características sensoriais em alimentos fermentados, construindo ricas e profundas vias metabólicas (MORENO, 2006; VIMONT, 2017). Essas bactérias também são capazes de produzir uma diversidade de compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos e bacteriocinas (NESS, 2014).

Esta biodiversidade, como encontrado neste trabalho parece ser comumente encontrada na literatura. Segundo Franciosi (2009), a biodiversidade ocorre frequentemente em amostras de leite. Isto porquê a formação da população microbiana está relacionada a diversos fatores inerentes ao produto e ambiente, facilitando a presença de determinadas populações e conseqüentemente caracterizando a mesma. Esta situação foi descrita por Silva (2010), na qual a autora enfatiza que essa diversidade pode ser devido condições ambientais e sanitárias de cada coleta feita, tal como, origem e características do leite, manipulação e clima.

## 4.2 Potencial tecnológico

Estirpes de BAL têm sido isoladas a partir de leite e adicionadas como culturas *starters* ou adjuntas no decorrer da produção de alimentos, com o intuito de atribuir as características sensoriais desejáveis (QUIGLEY et al., 2013). A velocidade de acidificação e a intensidade de produção de ácidos são duas questões relevantes que devem ser ponderadas para a fermentação de derivados lácteos (CABRAL et al., 2016).

Nesse estudo todas as espécies de BAL selecionadas a partir do leite de búfala, tiveram declínio significativo do pH após 24 horas de fermentação (Figura 1). Os valores de pH atingidos assemelham-se aos encontrados por Silva (2010), no qual a maior parte dos isolados de *mozzarella* de búfala reduziu o valor de pH do leite  $\leq 5,0$ , contudo, a avaliação deu-se em 18 horas de fermentação.

Ainda, Silva (2010), relatou que em amostras de diferentes etapas e processamentos distintos na fabricação de *mozzarella* de búfala, oriundas de dois laticínios em São Paulo e avaliando o uso de leite pasteurizado e *in-natura*, predominaram as bactérias termofílicas no queijo, indicando essas bactérias como as principais envolvidas na fabricação do produto, assim como durante a estocagem. Isto está diretamente relacionado a utilização de culturas comerciais, compostas especificamente por bactérias termofílicas, para a otimização da produção. Portanto, podem ter sido isoladas culturas que já estavam presentes no fermento comercial, mascarando as reais bactérias ácido lácticas possíveis de serem encontradas naturalmente nos produtos daquela região. As bactérias termófilas não foram alvo deste estudo, e por isto, não podemos inferir que populações deste tipo de bactéria não estavam presentes.

Nesse estudo, as doze espécies selecionadas apresentaram de forma geral, uma variação similar do pH (Figura 1); esta característica pode estar relacionada ao grupo mesofílico, o qual os isolados pertencem. Outros grupos, como por exemplo, os termofílicos podem apresentar divergência na redução da acidez do meio. Isto foi relatado por Santos (2015), que ao usar culturas termofílicas, observou que a acidificação de cepas de *S. thermophilus*, *L. helveticus* e *L. delbrueckii* tiveram variações divergentes, mesmo para microrganismos da mesma espécie.

Os isolados selecionados foram tolerantes a concentrações de NaCl de 4, 6 e 10 % (Figura 3), correlato ao encontrado no estudo de Paixão (2016),

embora, tenha sido usado apenas as concentrações de 4 e 6,5 % por este autor. A osmotolerância é uma qualidade significativa para seleção de BAL para uso tecnológico. Já existem descrições na literatura de que muitas cepas isoladas de queijos possuem essa qualidade (REALE et al., 2015).

Ao avaliar a produção de diacetil em BAL, Paixão (2016) obteve variações na intensidade de produção desse composto orgânico. O mesmo foi observado nesse estudo, logo, todos os isolados que produziram diacetil, independente da intensidade (fraca ou forte) foram considerados positivos.

Além disto, todas as BAL analisadas do leite de búfala (Anexo 2), apresentaram atividade enzimática negativa para lipase, em concordância com resultados encontrados na literatura, em análises de leite cru e produtos lácteos de vaca (MORAES et al., 2010; Uecker, 2018). Ao analisar 14 cepas de *Lactococcus lactis* oriundas de leite cru e grãos de Kefir, Yerlikaya (2019) também constatou ausência de atividade lipolítica dos isolados.

As lipases são muito importantes no metabolismo lipídico bacteriano, na ligação em processos patogênicos e na hidrólise da gordura do leite (XIE et al., 2012). A atividade lipolítica juntamente com a proteólise é essencial na maturação de queijos em geral (FOX et al., 2000; MIETTINEN et al., 2002).

Nesse estudo, foi verificada a ausência de atividade proteolítica apenas por um isolado de *Enterococcus faecalis* (Anexo 2). Enzimas proteolíticas liberadas por BAL, podem favorecer conjuntamente às proteinases naturais do leite, uma ampla degradação da caseína no queijo (SANTOS, 2015). Porém, algumas enzimas mostram pouca ou ausência de atividade, possivelmente por serem intracelulares, como, por exemplo aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases, sendo desprendidas somente com a lise celular. A proteólise é um processo de grande importância para alguns tipos e maturação de queijos. A hidrólise da caseína ocorre por ação do coagulante, plasmina e/ou proteinases de células somáticas do leite; os peptídeos de diferentes tamanhos que são formados também são hidrolisados pelo coagulante e por enzimas de culturas *starters* e *não starters* presentes no queijo (McSWEENEY, 2004).

Observa-se que dos 43 isolados avaliados, as 4 BAL do gênero *Leuconostoc* produziram gás a partir da glicose, após serem cultivadas em caldo MRS, ao avaliar a formação de EPS. Esta característica é comum nesta espécie, devido sua ação heterofermentativa. A produção de gás também foi relatada no trabalho de Paixão (2016), ao avaliar 60 isolados de BAL a partir de glicose, no

qual, nove foram positivos. Segundo Pereira e colaboradores (2010), culturas homo e heterofermentativas complementam a formação de compostos aromáticos ou iniciadores.

As espécies que obtiveram melhor produção de EPS foram *E. hirae*, *L. plantarum*, *L. casei*; *L. paracasei* e *L. garvieae* (Tabela 3). Alguns isolados não foram capazes de produzir EPS no meio MRS ou nos açúcares utilizados, contrastando com o resultado obtido por Santos (2015), em que foi verificada a produção de EPS por todos os isolados, contudo, eram BAL termófilas. Ademais, de acordo com Petry e colaboradores (2000), o meio de fermentação influencia a produção de EPS pelas BAL.

Comumente, os EPS produzidos por BAL são tidos para uso alimentício e como naturais e contribuem para viscosidade e textura de iogurtes e vários tipos de queijos, substituindo amidos modificados quimicamente e gordura do leite em iogurtes comerciais. Além disso, há relatos na literatura que alguns EPS possuem características prebióticas relevantes, entre elas, ação antimicrobiana contra patógenos, efeitos antioxidantes e imunoestimulantes. Outrossim, podem auxiliar no controle da formação de biofilmes por microrganismos patogênicos (LI et al., 2014; WU et al., 2014).

#### 4.3 Fatores de patogenicidade

No presente trabalho, todos os isolados de BAL de leite de búfala não apresentaram atividade da enzima DNase em testes fenotípicos (Anexo 2), o que corrobora com alguns estudos em que foram avaliadas BAL provenientes de leite e derivados lácteos de cabra e vaca (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015; UECKER, 2018).

A DNase é uma enzima que propicia infecção do hospedeiro devido sua capacidade de degradação do ácido nucleico (DNA) e desta forma, caracteriza-se como um fator de virulência que não é visto com muita frequência em amostras provenientes de alimentos (BARBOSA et al., 2010). No presente trabalho, foi detectada atividade enzimática positiva para gelatinase em 4 (9 %) dos isolados (Anexo 2), divergindo de outros trabalhos, que tiveram resultados negativos para atividade da enzima gelatinase em todos os isolados estudados (WANG, 2011; GÓMEZ, 2016; UECKER, 2018).

Os isolados com atividade  $\alpha$ -hemolítica (halo esverdeado ao redor das colônias), foram classificados como negativos para hemólise, pois, apesar de produzirem hemólise incompleta, causada por enzimas capazes de lisar os eritrócitos no sangue humano, esse padrão de hemólise não é nocivo à saúde, sendo considerados positivos apenas os isolados que apresentam zonas de lise completa ( $\beta$ -hemólise) das hemácias ao redor das colônias (BARBOSA et al., 2010; ADIMPONG et al., 2012).

Em estudo realizado por Santos (2015), ao avaliar a atividade hemolítica de cepas autóctones de BAL termófilas de *Lactobacillus helveticus*, *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, observou-se que as cepas de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, produziram halo esverdeado (hemólise parcial), o que se correlaciona ao encontrado nesse estudo, em que as espécies de *L. plantarum*, apresentaram o mesmo padrão de hemólise.

Das espécies de *Enterococcus* isoladas do leite de búfala, 100 % (7/7) produziram hemolisinas, sendo uma espécie *Enterococcus hirae* classificada como negativa para hemólise, por apresentar halo esverdeado ao redor da colônia (Anexo 2). O mesmo foi relatado por Porto e colaboradores (2016), ao avaliarem 53 cepas de *Enterococcus* isolados de queijos de Coalho artesanais, todas produziram hemolisinas, havendo variação do padrão de hemólise formado conforme a origem do sangue utilizado no preparo do meio de cultura. Esse resultado confirma o que já tem sido relatado pela literatura, que o gênero *Enterococcus* apresenta determinantes fenotípicos virulentos como atividade hemolítica e genes codificadores de virulência. Portanto, a investigação de patogenicidade é de elevada importância para segurança alimentar e saúde pública.

Moraes et al. (2012), também analisaram a produção de hemolisinas em ágar sangue de cavalo em 43 cepas de *Enterococcus* oriundos de leite e queijo não pasteurizado, em Minas Gerais, e constataram beta-hemólise em 53,5 % das cepas, não havendo formação de alfa-hemólise nas demais. Discrepante aos resultados desse estudo e de outros encontrados na literatura, Marguet, Vallejo e Olivera (2008), ao usarem sangue humano para verificar a produção de hemolisinas de 10 estirpes de *Enterococcus*, provindas de queijos fabricados com leite de ovelhas, adquiridos de uma queijaria da Patagônia, não observaram atividade hemolítica nas estirpes estudadas.

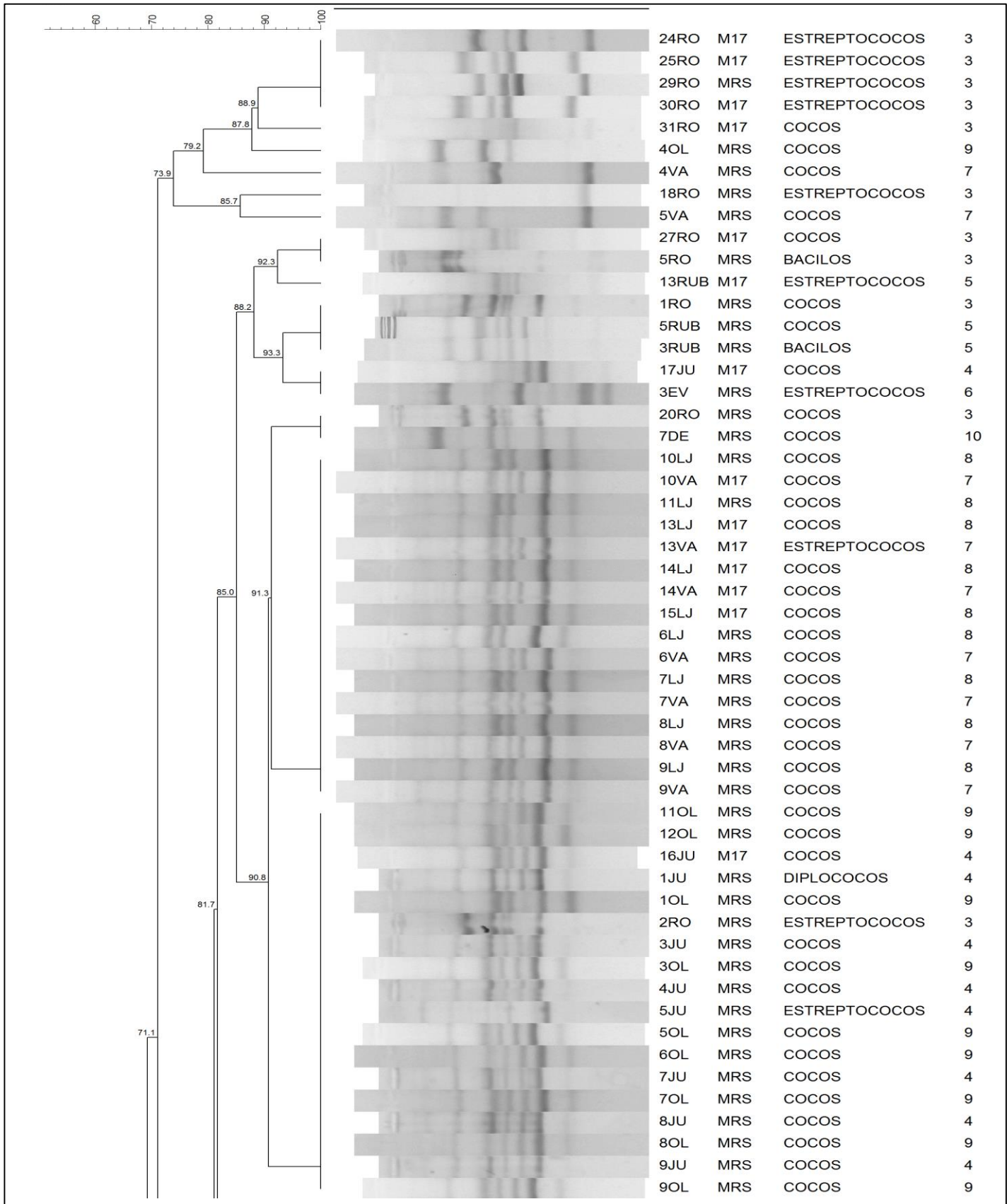
Uecker (2018), ao analisar 40 BAL com potencial probiótico, isoladas de produtos lácteos distintos, encontrou apenas hemólise incompleta (alfa-hemólise) e relatou que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. citreum* se destacaram entre os demais, com propício potencial de uso como probiótico, além de possuírem propriedades antimicrobianas e antioxidantes significativas.

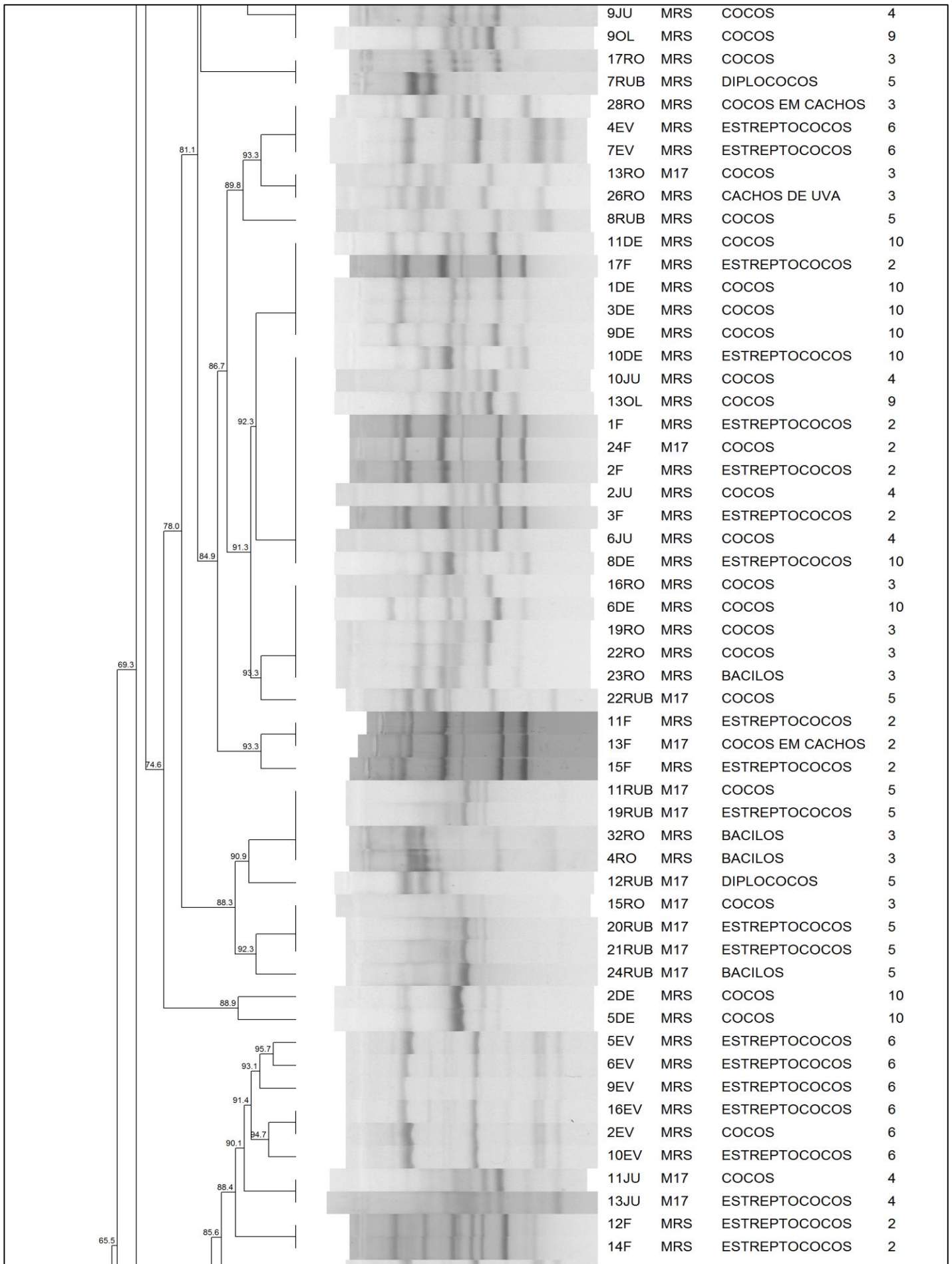
Já Paixão (2016), ao selecionar BAL autóctones de leite de cabra com propriedades probióticas, relata que no teste hemolítico, apenas um isolado foi beta-hemolítico (hemólise completa) e por isso, eliminado. Pois, a ausência de atividade hemolítica é uma regra de seleção para possíveis candidatos de estirpes para uso em derivados lácteos (MARAGKOUDAKIS et al., 2006).

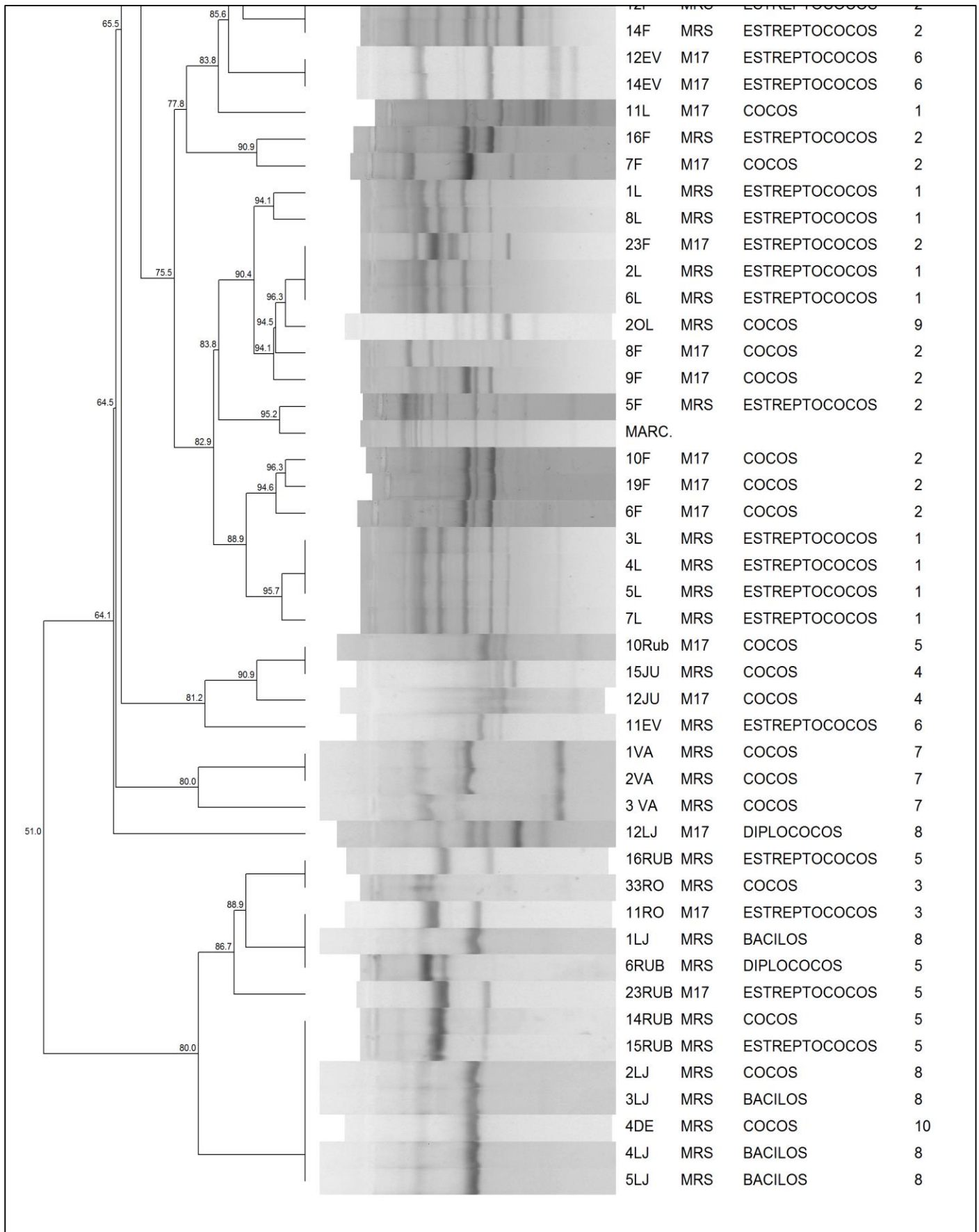
## **5. CONCLUSÃO**

O leite de búfala pode conter bactérias ácido lácticas com características que interessem a indústria alimentícia. Neste trabalho, 12 isolados de leite cru de búfalas apresentaram características com potenciais para serem utilizadas no processamento de derivados lácteos. Ademais, esses gêneros bacterianos têm sido muito estudados quanto à sua capacidade de produção de bacteriocinas, sendo de grande interesse para futuras pesquisas e aplicações.

**ANEXO 1- Dendograma baseado no resultado do Rep-PCR referente a 148 isolados testados**







## ANEXO 2 - Potencial tecnológico e patogênico dos 43 isolados

Isolados positivos e negativos em testes de potencial tecnológico						Lactofermentação					Patogenicidade			
Isolados	Espécies	Diacetil	Lipolítico	Proteolítico	Produção de gás	Produção de EPS					Padrão de coagulação	DNase	Gelatinase	Hemólise
						MRS	Lactose	Frutose	Glicose	Sacarose				
1	<i>Enterococcus hirae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	1	-	-	+
2	<i>Enterococcus hirae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	1	-	-	+
3	<i>Enterococcus hirae</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	2	-	-	+
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+	-	+	-	+	+	+	3	-	+	+
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	3	-	+	+
6	<i>Enterococcus hirae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	1	-	-	+
7	<i>Enterococcus hirae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	1	-	-	-
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	4	-	-	-
9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	4	-	-	-
10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	5	-	-	-
11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	5	-	-	+
12	<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	6	-	-	+
13	<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	4	-	-	-
14	<i>Lactobacillus paracasei</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	6	-	-	-
15	<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	4	-	-	+
16	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	6	-	-	+
17	<i>Lactococcus garvieae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	2	-	-	-
18	<i>Lactococcus garvieae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	5	-	-	-
19	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	+	6	-	-	+
20	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	6	-	-	+
21	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	6	-	-	+
22	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	6	-	-	+
23	<i>Lactococcus garvieae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	1	-	-	+
24	<i>Lactococcus garvieae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	2	-	-	-
25	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	6	-	-	-
26	<i>Lactococcus garvieae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	2	-	-	-
27	<i>Lactococcus garvieae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	2	-	-	-
28	<i>Lactococcus garvieae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	2	-	-	-
29	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	+	-	+	-	+	+	+	6	-	-	-
30	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	6	-	-	-
31	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	2	-	-	+
32	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	7	-	-	-
33	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	7	-	-	-
34	<i>Leuconostoc lactis</i>	-	-	+	+	+	-	+	+	+	7	-	-	+
35	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	-	6	-	+	-
36	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	6	-	-	+
37	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	6	-	+	+
38	<i>Streptococcus uberis</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	1	-	-	+
39	<i>Streptococcus uberis</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	+	1	-	-	+
40	<i>Streptococcus uberis</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	-	1	-	-	+
41	<i>Streptococcus uberis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
42	<i>Streptococcus uberis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	2	-	-	+
43	<i>Streptococcus ferus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	2	-	-	+

Padrão de coagulação \*1= Com grumos; 2= Sem coágulo; 3= Coágulo contraído com soro; 4= Coágulo gelatinoso, sem soro; 5= Coágulo pequeno no fundo, sem grumos e sem soro; 6= Coágulo gelatinoso, com soro; 7= Coágulo caseoso, com soro e gás.

## 6. REFERÊNCIAS

ADIMPONG, D. B. et al. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 75, p. 1-12, 2012.

ADNAN, A. F. M.; TAN, I. K. P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. **Bioresource Technology**, 98, 1380-1385, 2007.

ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G.; FERRARI, I. S.; SOUZA, J. V.; SILVA, C. D. A.; COSTA, M. M.; DIAS, F. S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103, 2015.

ARAÚJO, T. F; FERREIRA, C. L. L. F. The Genus *Enterococcus* As Probiotic: Safety Concerns. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Viçosa, v.56 n.3, p. 457-466, May/June 2013.

BARBOSA, J.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in North of Portugal. **Food Control**, v. 21, p. 651-656, 2010.

BASTIANETTO, E. Criação de búfalos no Brasil: situação e perspectiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 2009, n.6, p.98-103, dez. 2009.

BEHMER, M.L.A. Prova de lactofermentação. In: **Tecnologia do Leite - Produção, Industrialização e Análise**. 15ª ed. São Paulo. Ed. Nobel, Cap. 7, p. 59-61, 1985.

BERNARDES, O. **Os Búfalos no Brasil**. In: II SIMPÓSIO DE BÚFALO DE LAS AMÉRICAS E, II SIMPÓSIO EUROPA-AMERICA, 2006, Medellín, Proceedings..., Medellín/Colombia; v.3, p.18-23, CD ROM, 2006. Disponível em: <<https://vdocuments.site/download/simposio-de-bufalos-2006>>.

BROADBENT, J. R.; BUDINICH, M. F.; STEELE, J. L. Cheese: NSLB. Reference Module in **Food Science**, p. 639-644, 2016.

CABRAL, M. L. B.; et al. Queijos artesanais: fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v.3, n.4, p.207-215, 2016.

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

COGAN, T. M. History and taxonomy of starter cultures. In: Cogan, T.M., Accolas, J.P. (Eds.), **Dairy Starter Cultures**. John Wiley and Sons Inc., New York, p. 1–23, 1996.

DAL BELLO, B. D.; COCOLIN, L; ZEPPA, G.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology** 153, 58–65, 2012.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Faostat agriculture data (Agricultural production – live animals – livestock). FAO, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. Acesso em: 22 de março de 2019.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg, AN Aspen Publication, 587 p. 2000.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal** 19, 3-11, 2009.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters** 205, 31-36, 2001.

GÓMEZ, N. C et al. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 863, 2016.

HANTSIS-ZACHAROV, E. and HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Appl Environ Microbiol** 73, 7162–7168, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mg&tema=pecuaria2015>> acesso em 02.08.2017. Fonte: Produção da Pecuária Municipal – 2015.

JORGE, A. M., et al. **Efeito da utilização da somatotropina bovina recombinante (bST) sobre a produção de leite em búfalas**. *R. Bras. Zootec.*, vol.31, n.3, p.1230-1234, Jun 2002. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/bufalos>>.

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

KING, N. Modification of Voges–Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetyl methyl carbimol plus diacetyl in butter. **Dairy Ind** 13, 860-866, 1948.

KLEEREBEZEM, M.; KUIPERS, O. P.; SMID, E. Lactic acid bactéria - a continuing journey in science and application. **FEMS Microbiology Reviews** 41 (Supp\_1):S1-S2. 2017.

LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. and VON WRIGHT, A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press. 2011.

LI, W. et al. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P1, p. 732-739, 2014.

MARAGKOUDAKIS, P.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v.16, p.189-199, 2006.

MARGUET, E. R.; VALLEJO, M.; OLIVERA, N. L. Factores de virulência de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 42, n.4, p. 543- 548, 2008.

McSWEENEY, P. L. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p. 127-144, 2004.

MIETTINEN S.M., TUORILA H, PIIRONEN V, VEHKALAHTI K, HYVÖNEN L. Effect of emulsion characteristics on the release of aroma as detected by sensory evaluation, static headspace gas chromatography, and electronic nose. **Journal Agric Food Chem.** ul 17;50 (15), 2002.

MORA, D.; MUSACCHIO, F.; FORTINA, M. G.; SENINI, L.; MANACHINI, P. L. Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. **Journal of Applied Microbiology** 94, 561–570, 2003.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**, n. 43, p. 1320- 1324, 2010.

MORAES, P. M. et al. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 2, p. 318-328, 2012.

MOREA, M.; BARUZZI, F.; COCCONCELLI, P. S. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 4, p. 574-582, 1999.

MORENO, M. R. F.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology** 106 (1):1–24. 2006.

MOTTA, A. S.; GOMES, M. S. M. Propriedades tecnológicas e funcionais de bactérias lácticas: a importância destes microrganismos para alimentos. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 3, p. 172-184, mai/jun, 2015.

NESS, I. F.; DIEP, D. B.; IKE, Y. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (eds) *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Vol 2014. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston. 2014.

OLIVEIRA, P. M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. **Food Microbiology**, v.37, p.78-95, 2014.

PAIXÃO, I. S. F. Caracterização de Bactérias Ácido Lácticas autóctones de leite de cabra e sua funcionalidade no queijo coalho caprino artesanal. Petrolina, PE: UNIVASF, 2016, 87p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2016.

PEREIRA, C. L.; GRAÇA, J. A.; OGANDO, N. S.; GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Influence of bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. **Food Microbiology**, v.27, p.339-346, 2010.

PETRY, S. et al. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3427-3431, 2000.

PORTO, B. C., et al. Determinantes de virulência em *Enterococcus* endógenos de queijo artesanal. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 69-76, jan-mar, 2016. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2016.

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

REALE, A.; DI RENZO, T.; ROSSI, F.; ZOTTA, T.; LACUMIN, L.; PREZIUSO, M.; PARENTE, E.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, v.60, p.721-728, 2015.

RIBEIRO, S. C.; COELHO, M. C.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; DAPKEVICIUS, M. L. E.; SILVA, C. C. G. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. **Journal of Applied Microbiology** 116, 573-585, 2013.

SANTOS, C. L. A. **Caracterização de segurança e tecnológica de bactérias ácido lácticas termofílicas autóctones e aplicação em queijo Parmesão**. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita", São José do Rio Preto, São Paulo, 2015.

SARAVANAN, C.; SHETTY, P. K. Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli batter. **International Journal of Biological Macromolecules** 90:100-106. 2016..

SILVA, L. F. Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de búfala. São José do Rio Preto, SP: UNESP, 2010. 153 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2010.

SMITINONT, T.; TANSAKUL, C.; TANASUPAWAT, S.; KEERATIPIBUL, S.; NAVARINI, L.; BOSCO, M. AND CESCUTTI, P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. **Int J Food Microbiol** 51, 105–111, 1999.

TEIXEIRA, L. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 2005, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun. 2005.

UECKER, J. N. *Screening* de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e derivados com potencial probiótico. Pelotas, RS: UFPel, 2018. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, 2018.

VIEIRA, M. C. et al. Viabilidade econômica da implantação de uma unidade industrial para a produção de mozzarella e de massa coagulada, fermentada e congelada de leite de búfala. **Informações Econômicas**, SP, v. 39, n. 10, p. 32-42, 2009.

VILLANI, F.; MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, G.; COPPOLA, S. Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, n. 5, p. 578-588, 1997.

VIMONT, A.; FERNANDEZ, B.; HAMMAMI, R.; ABABSA, A.; DABA, H.; FLISS, I. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* LCW 44: a high potential probiotic candidate from raw camel milk. **Frontiers in Microbiology** 8:865. 2017.

WANG, L.; DONG, M.; ZHENG, J.; SONG, Q.; YIN, W.; LI, J.; NIU, W. Relationship of biofilm formation and *gelE* Gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from Root canals in Patients Requiring Endodontic Retreatment. **Journal of Endodontics**, v.37, n. 5, p.631-636, 2011.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A. & LANE, D. J. 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 173, 697-703, 1991.

WU, Q. et al. Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. **Scientific Reports**, v. 4, n. 4974, p. 1-7, 2014.

XIE, W.; KHOSASIH, V.; SUWANTO, A.; KIM, H. K. Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n.1, p.84-91, 2012.

YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal of Dairy Science**, Bornova, v. 102, n. 1, 2019.