

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**POTENCIAL TECNOLÓGICO E PROBIÓTICO DA
MICROBIOTA DE LEITE A2A2 DE VACAS JERSEY**

Autora: Cristiele Dayane Cardoso dos Santos
Orientadora: Dr.^a Flávia Oliveira Abrão Pessoa
Coorientador: Dr. Leandro Pereira Cappato

Rio Verde – GO
Setembro -2023

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**POTENCIAL TECNOLÓGICO E PROBIÓTICO DA MICROBIOTA DE
LEITE A2A2 DE VACAS JERSEY**

Autora: Cristiele Dayane Cardoso dos Santos
Orientadora: Dr.^a Flávia Oliveira Abrão Pessoa
Coorientador: Dr. Leandro Pereira Cappato

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde –Área de concentração Zootecnia.

Rio Verde – GO
Setembro –2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

SSA237
p SANTOS, CRISTIELE DAYANE CARDOSO DOS
POTENCIAL TECNOLÓGICO E PROBIÓTICO DA MICROBIOTA DE
LEITE A2A2 DE VACAS JERSEY / CRISTIELE DAYANE
CARDOSO DOS SANTOS; orientadora Flávia Oliveira
Abrão Pessoa; co-orientador Leandro Pereira Cappato
. -- Rio Verde, 2023.
64 p.

Dissertação (Mestrado em PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ZOOTECNIA) -- Instituto Federal Goiano, Campus
Rio Verde, 2023.

1. Atividade proteolítica. 2. Derivados lácteos.
3. Fermentação. 4. , Leuconostoc mesenteroides. I.
Oliveira Abrão Pessoa, Flávia , orient. II. Pereira
Cappato , Leandro , co-orient. III. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.510, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Cristiele Dayane Cardoso dos Santos

Matrícula:

2021102310240010

Título do trabalho:

POTENCIAL TECNOLÓGICO E PROBIÓTICO DA MICROBIOTA DE LEITE A2A2 DE VACAS JERSEY

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIF Goiano: / /

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(s) referido(s) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;

- Que obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;

- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde

07 / 11 / 2023

Local

Data



Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais



Ciente e de acordo:

Assinatura do(s) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**POTENCIAL TECNOLÓGICO E PROBIÓTICO DA
MICROBIOTA DE LEITE A2A2 DE VACAS JERSEY**

Autora: Cristiele Dayane Cardoso dos Santos
Orientadora: Flávia Oliveira Abrão Pessoa

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração em Zootecnia/Recursos
Pesqueiros.

APROVADA em 29 de setembro de 2023.

Dra. Stefania Marcia de Oliveira
Souza
Avaliadora externa
Uniceplac - DF

Dra. Margareti Medeiros
Avaliadora externa
Uniceplac - DF

Dra. Flávia Oliveira Abrão Pessoa

Presidente da banca
IF Goiano/CE

Documento assinado eletronicamente por:

- **Stefania Marcia de Oliveira Souza, Stefania Marcia de Oliveira Souza - Professor Avaliador de Banca - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - Uniceplac (00720144000112)**, em 29/09/2023 18:04:46.
- **Margareti Medeiros, Margareti Medeiros - Professor Avaliador de Banca - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - Uniceplac (00720144000112)**, em 29/09/2023 18:03:47.
- **Flavia Oliveira Abrao Pessoa, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 29/09/2023 18:01:32.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 31/08/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 527247

Código de Autenticação: 216e9c5b15



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3624-1000

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e intercessão constante em todos os momentos da minha vida. Ao Lucas meu grande amor, por toda paciência durante esses anos e a grande dedicação à nossa família. Ao meu filho Nicola, que mesmo tão pequenino mostrou o quanto podemos ser fortes frente as adversidades. À minha mãe, Virgília, que é meu maior e mais lindo exemplo de pessoa, sabedoria e coragem, e que nunca me deixou desistir de nada. Minhas amadas irmãs, Daniele, Denise e Cristiane, minhas melhores amigas e incentivadoras.

Aos meus sogros, Américo e Mônica (*in memoriam*), por todo carinho e incentivo ao longo desses anos. A todos os meus amigos, em especial a Lídia Caroline, minha amiga desde a graduação, meu ombro amigo, fonte de carinho e prestatividade que tanto contribuiu para minha chegada até aqui.

À minha orientadora professora Flávia Oliveira Abrão Pessoa, pela orientação, pelos aprendizados e notável paciência, que abraçou nossa pesquisa e que mesmo de longe nunca deixou de contribuir e apoiar-me. À professora/coordenadora do Programa de Pós-graduação em Zootecnia (PPGZ) Ana Paula Cardoso Gomide, pela prestatividade e incentivo desde o início. Ao meu coorientador Leandro Pereira Cappato, gratidão por ter dado a oportunidade de usufruir do laboratório de microbiologia aplicada e por me coorientar com grande maestria.

Aos demais professores com os quais convivi durante esta jornada e aos colegas do PPGZ, e a todos que fizeram a diferença durante os meus dias acadêmicos, tornando-os mais suportáveis, dividindo as pequenas alegrias, as conquistas, as frustrações e a rotina diária. Em especial Antônio e Felipe, a quem não encontro palavras que possam descrever a amizade construída.

À Jaqueline Ribeiro Lamounier do LabLeite UNB, pela prestatividade e disponibilidade em contribuir tanto para este estudo. Toda experiência e crescimento acadêmico adquiridos não seriam alcançados, se não com o apoio de todos vocês.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, que me permitiu com seus recursos e estrutura a realização desse trabalho. A FAPEG, pela bolsa a mim concedida.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

BIOGRAFIA DA AUTORA

Nascida em 22 de junho de 1993 em Brasília- DF, desde pequena sonhava em ser médica veterinária, sendo sua mãe a maior incentivadora, que sempre a apoiou e fez de tudo para que pudesse realizar o seu grande sonho. Em 2014 ao iniciar sua jornada e durante o seu curso, diversas áreas de atuação faziam-na se apaixonar cada vez mais pelo curso escolhido. Ao cursar o sétimo semestre e estudar a disciplina de tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, descobriu seu grande amor pela área de alimentos, principalmente qualidade do leite e derivados. Ao final de 2018 obteve a oportunidade de desenvolver um projeto de pesquisa com bactérias ácido lácticas no Laboratório de Análises de Leite e Derivados (LABLEITE), da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília (UnB), e ministrar uma pequena aula sobre a produção de queijos, área na qual já estava trabalhando, sempre se aprimorando e dedicando à área de produção de alimentos de origem animal. Na empresa Vale do Roncador, atuou durante três anos como gerente, sendo responsável pelo rebanho leiteiro e pela qualidade do leite produzido na propriedade. Obteve experiência no processamento e na fabricação de derivados lácteos. Ao finalizar sua graduação em 2018, o sonho de ingressar no mestrado já existia, mas naquele momento por causa do trabalho precisaria organizar-se para o novo desafio. No início do ano de 2021 participou do processo seletivo do Mestrado em Zootecnia pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano-Campus Rio Verde/GO, com a linha de pesquisa (qualidade e processamento de produtos de origem animal), no qual conseguiu êxito em sua aprovação, sendo também agraciada com a gestação do seu primeiro filho. No início de 2022 pós-pandemia, mudou-se para a cidade de Rio Verde para dedicar-se, de forma presencial. Em 2023 submeteu sua dissertação intitulada: “Potencial tecnológico e probiótico da microbiota de leite de vacas Jersey”.

ÍNDICE GERAL

	Página
Resumo	11
Abstract	12
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	14
1. Introdução geral	14
2. Revisão de Literatura	16
2.1. Potencial tecnológico das bactérias ácido lácticas	16
2.2. Potencial antagonista das bactérias ácido lácticas.....	22
2.3 Bactérias ácido lácticas como fonte de probióticos.....	25
Referências bibliográficas.....	32
CAPÍTULO II - POTENCIAL TECNOLÓGICO E PROBIÓTICO DA MICROBIOTA DE LEITE A.2A2 DE VACAS JERSEY.....	39
Resumo	39
Abstract.....	40
1. Introdução.....	41
2. Material e métodos	42
2.1 Área de estudo e coleta de amostras.....	43
2.2 Isolamento de bactérias ácido lácticas.....	43
2.3 Potencial antagonista.....	43
2.4 Avaliação do potencial tecnológico.....	43
2.4.1 Atividade acidificante.....	44
2.4.2 Atividade proteolítica extracelular.....	44
2.4.3 Formação de exopolissacarídeos	44
2.4.4 Produção de diacetil.....	45
2.5 Potencial probiótico.....	45
2.5.1 Desenvolvimento em diferentes valores de pH.....	45
2.5.2 Desenvolvimento em diferentes concentrações de bile.....	45
2.6 Sequenciamento	46
3. Resultados.....	46
4. Discussão.....	53
5. Conclusão.....	60
6. Referências bibliográficas	60

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Microrganismos com propriedades probióticas..... 29
Tabela 2	Frequência do potencial antagonista (halo \geq 2mm) de 55 isolados de BALs proveniente de leite de A2A2 de vacas Jersey, frente a microrganismos patogênicos..... 47
Tabela 3	Diâmetro de halos produzidos por 55 isolados de BALs frente a microrganismos patogênicos..... 47
Tabela 4	Frequência das características morfológicas dos isolados de BALs que apresentaram potencial antagonista frente aos patógenos testados..... 48
Tabela 5	Resultados da avaliação das características tecnológicas de 55 isolados de bactérias ácido lácticas..... 49
Tabela 6	Cepas de BALs selecionadas para etapa de potencial probiótico..... 50
Tabela 7	Identificação molecular dos isolados de bactérias ácido-láticas provenientes de leite A2A2 de vacas Jersey..... 53

ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Quadro 1	Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas..... 25
Quadro 2	Microrganismos indicadores utilizados na avaliação do potencial antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de cru bovino..... 43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Representação esquemática de forma simplificada das vias do metabolismo homofermentativo em bactérias lácticas do gênero <i>Lactobacillus</i> 17
Figura 2	Representação esquemática de forma simplificada das vias do metabolismo heterofermentativo em bactérias lácticas do gênero <i>Lactobacillus</i> 18
Figura 3	Possíveis efeitos funcionais de bactérias ácido lácticas na indústria de laticínios..... 20
Figura 4	Desenvolvimento das cepas C.7, C.8, C.11 e C.43 em caldo MRS em pH 1,2,3,7,8 e 12, durante 12 horas..... 51
Figura 5	Comparação do desenvolvimento das cepas C.7, C.11, C.23 e C.47 em caldo MRS em concentrações de 0,2%, 0,3%, 1% e 2% de bile, durante 10 horas..... 52

SIGLAS E ABREVIACOES

AA	Atividade Acidificante
APE	Atividade proteolítica extracelular
BALs	Bactérias cido lticas
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	cido desoxirribonucleico
EPS	Exopolissacarídeos
LPS	Lipopolissacarídeos
KOH	Hidróxido de potássio
NaCL	Cloreto de sódio
P/V	Peso Volume
DO	Densidade ptica
PCR	Reao em cadeia da polimerase
PD	Produo de diacetil
pH	Potencial hidrogeniônico
TGI	Trato gastrointestinal
DCV	Doenças cardiovasculares
UFC	Unidade formadora de colônias

RESUMO

SANTOS, Cristiele Dayane Cardoso. Potencial tecnológico e probiótico da microbiota de leite A2A2 de vacas Jersey. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, Goiás, Brasil, 2023. 67p.

As bactérias ácido lácticas são constituintes naturais da microbiota de vários alimentos, incluindo a do leite A2A2 *in natura*, e desempenham importantes papéis nas indústrias. São um grupo de microrganismos que apresentam papel significativo em variedade de processos fermentativos. Elas fermentam carboidratos e produzem ácido láctico como o principal produto, além disso, promovem a degradação de proteínas e lipídios resultando na produção de vários álcoois, aldeídos, ácidos, ésteres e compostos de enxofre. Tais compostos contribuem para o desenvolvimento de sabores específicos em diferentes produtos alimentícios fermentados. Também desempenham papel significativo para a saúde, quando são usadas como probióticos, por melhorar o equilíbrio microbiano intestinal. A pesquisa e o desenvolvimento da microbiota do leite A2A2 podem oferecer oportunidades para a indústria de laticínios melhorar a qualidade do leite e aumentar a lucratividade. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar a microbiota láctica do leite A2A2 de vacas Jersey de uma propriedade rural situada em Cidade Ocidental - GO e avaliar o seu potencial tecnológico. As amostras foram coletadas de leite em frascos estéreis e encaminhadas refrigeradas para o laboratório de microbiologia do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. As análises foram feitas através da identificação (caracterização morfológica e ausência de enzima catalase) dos isolados presentes nas amostras de leite, e posteriormente, determinadas as propriedades tecnológicas quanto à capacidade de acidificação, atividade proteolítica, formação exopolissacarídeos e produção de diacetil. As avaliações do potencial probiótico foram realizadas a partir do desenvolvimento das bactérias isoladas em diferentes valores de pH (1, 2, 3, 7, 8 e 12) e diferentes concentrações de bile (0,2%; 0,3%; 1% e 2%). Para a determinação da diversidade genética das amostras, foram realizados sequenciamentos genômicos. 44% dos isolados apresentaram características morfológicas de BALs, produzindo inibição frente a cepas alvos (*S. enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus* e *L. sakei*). Nas avaliações de potencial tecnológico, 7% das cepas demonstram a capacidade de acidificação abaixo de pH 6 em até 6 horas de incubação, enquanto 22% das cepas foram capazes de acidificação, após 24 horas de incubação. A atividade proteolítica foi observada em 20% das cepas, enquanto nenhuma das cepas testadas foram capazes de produzir exopolissacarídeos a partir da lactose, já para capacidade de produzir diacetil, 13% das cepas apresentaram essa característica. Para avaliação da capacidade de desenvolvimento em diferentes valores de pH, 58% das cepas apresentaram a viabilidade em pH ácido (1 a 3), contudo apenas 33%, apresentaram viabilidade durante às 12 horas de avaliação. Em relação a resistência aos sais biliares, 41% foram capazes de resistirem as concentrações de 1 e 2%. Para a determinação da diversidade genética das amostras, foram realizados sequenciamentos genômicos, sendo os gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc mesenteroides* identificados por meio de sequenciamento do gene codificador do RNA ribossomal do gene 16S. Resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que a microbiota láctica do leite A2A2 de vacas Jersey apresenta potencial tecnológico contribuindo para o desenvolvimento de produtos que atendam às exigências dos consumidores, alimentos saudáveis e naturais.

Palavras-chave: Atividade proteolítica, Derivados lácteos, Fermentação, *Leuconostoc mesenteroides*.

ABSTRACT

SANTOS, Cristiele Dayane Cardoso. Technological and probiotic potential of the microbiota of A2A2 milk from Jersey cows. Dissertation (Masters in Animal Science). Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, Goiás, Brazil, 2023. 67p.

Lactic acid bacteria are natural constituents of various foods microbiota, including A2A2 in natura milk, and play important roles in industries. They are a group of microorganisms that play a significant role in a variety of fermentation processes. They ferment dietary carbohydrates and produce lactic acid as the main fermentative product. Furthermore, the degradation of proteins and lipids and the production of various alcohols, aldehydes, acids, esters, and sulfur compounds contribute to the development of specific flavors in different fermented food products. They also play a significant health role when used as probiotics by improving intestinal microbial balance. The present work aims to characterize the lactic microbiota of A2A2 milk from Jersey cows from a rural property located in Cidade Occidental -GO and evaluate its technological potential. Samples were collected from pooled milk in sterile bottles and sent to the microbiology laboratory at the Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. The analyzes were carried out by identifying the lactic microbiota present in the milk samples, determining the technological properties regarding acidification capacity, proteolytic activity, exopolysaccharide formation and diacetyl production. The evaluations of the probiotic potential were carried out from the development of bacteria isolated in different pH values and different bile concentrations. To determine the genetic diversity of the samples, genomic sequencing was carried out. 44% of isolates contain morphological characteristics of LABs, preventing the prevention of target strains (*S. enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus* and *L. sakei*). In technological potential assessments, 7% of the strains demonstrated acidification capacity below pH 6 within 6 hours of incubation and 22% of the strains were capable of acidification after 24 hours of incubation. Proteolytic activity was observed in 20% strains, while none of the tested strains were able to produce exopolysaccharides from lactose, and 13% achieved diacetyl production capacity. The evaluation of the ability to develop at different pH values predicted 58% of the strains at acidic pH (1 to 3), but only 33% were predicted during the 12 hours of evaluation. 41% were able to withstand concentrations of 1% and 2% bile salt concentrations. The genera *Lactobacillus* and *Leuconostoc mesenteroides* were identified through sequencing of the gene encoding the 16S ribosomal RNA. Results obtained in this research revealed that the lactic microbiota of A2A2 milk from Jersey cows has technological potential contributing to the development of articles that can add more importance to this milk as well as the possibility of producing derivatives.

Key Words: Food. Dairy products. Fermentation. Health.

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO GERAL

As proteínas que compõe o leite bovino são divididas em proteínas do soro do leite, e as caseínas, que se subdividem em vários grupos (PALMA, 2020). Cerca de 80% das proteínas que constituem o leite são representadas pelas caseínas, que são subdivididas em quatro frações (α_1 , α_2 , β e κ - caseínas). Dentro da fração β -caseína são descritas 13 variantes, sendo a A1 e A2 as mais facilmente encontradas, que diferem apenas na posição do aminoácido 67, que é histidina em A1 ou prolina no leite A2, sendo este último produzido por vacas com o genótipo A2A2 (VITTE *et al.*, 2022; DANTAS *et al.*, 2023).

O leite de vaca convencional é composto por duas principais proteínas do leite, a caseína e a beta-caseína. A beta-caseína é encontrada em duas variantes principais: A1 e A2. A beta-caseína A2 é considerada uma variante ancestral, enquanto a A1 surgiu mais recentemente por causa da mutação genética. Neste ponto o leite A2A2 diferencia do leite convencional, por possuir a presença da beta-caseína A2, em oposição à beta-caseína A1. O leite A2A2 é obtido a partir de vacas que possuem uma linhagem genética específica, que produz exclusivamente a beta-caseína A2 (DANTAS *et al.*, 2023). Essas vacas são selecionadas por meio de testes genéticos ou cruzamento seletivo para garantir a predominância da beta-caseína A2 em seu leite.

A composição do leite tem sido objeto de estudo há décadas, e recentemente o leite A2A2 tem despertado atenção pelas alegações de que pode ser mais fácil de digerir e causar menos desconforto gastrointestinal em comparação com o leite convencional. A proteína beta-caseína é o principal componente proteico do leite, e suas variantes A1 e A2 têm sido objeto de estudo em relação aos efeitos na saúde humana. Pesquisas sugerem que a beta-caseína A1 pode ser responsável por reações adversas à ingestão de leite, como desconforto gastrointestinal e alergias. Por outro lado, o leite contendo apenas a variante A2 da beta-caseína, conhecido como leite A2A2, tem sido apontado como alternativa potencialmente mais saudável (JIANQIN *et al.*, 2015; RAHIMI, 2015).

Além de benefícios para produção de derivados lácteos, a microbiota do leite A2A2, possui potencial tecnológico significativo para a indústria de laticínios e para saúde humana (NOGUEIRA; SILVA, 2022; BARBOSA, 2019).

A microbiota do leite A2A2 contém bactérias ácido lácticas (BALs) que possuem

potencial bactericida e probiótico. As BALs podem promover a saúde intestinal, melhorar a função imunológica e prevenir ou tratar várias doenças. Portanto, o uso da microbiota do leite A2A2 na produção de alimentos probióticos pode oferecer benefícios significativos à saúde dos consumidores (SANTOS *et al.*, 2020).

Além dos efeitos de saudabilidade, a microbiota presente no leite A2A2 pode inibir o crescimento de bactérias causadoras de mastite, desta forma, mais pesquisas sobre a microbiota do leite A2A2 podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias para prevenir e tratar a mastite em vacas leiteiras, podendo melhorar a qualidade do leite e aumentar a lucratividade dos produtores de leite (PALMA, 2020).

O grupo das BALs compreende diversos gêneros de bactérias, os mais importantes são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium*. Esses microrganismos são Gram-positivos, catalase negativo, não formadores de esporos e que geralmente crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas (XIMENES, 2019).

Espécies de *Lactobacillus* são anaeróbias facultativas tolerantes a ácidos e podem ser homo ou heterofermentativos. A maioria das espécies de *Lactobacillus* são encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais. Espécies de *Lactococcus* são mais abundantes em produtos lácteos, como leite coalhado, e são amplamente utilizadas como iniciadores de fermentação na produção de laticínios (PEIXOTO, 2021).

Segundo Lima (2019), os *Streptococcus* foram reclassificados em *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* e *Streptococcus* com base em características bioquímicas e características moleculares. *Bifidobacterium* pertence a *Actinobacteria*, enquanto o restante pertence ao grupo *Firmicutes*. As subespécies de *L. lactis* (*L. lactis* e *L. cremoris*) são amplamente utilizadas como modelos de BALs genéricas para pesquisa, e a cepa IL1403 é onipresente em laboratórios de pesquisa (MIOTTO *et al.*, 2023). As BALs possuem o status de seguras (GRAS), devido à aparência onipresente nos alimentos e a contribuição para a microbiota saudável das superfícies mucosas de animais e humanos.

Pesquisas com BALs têm despertado o interesse de pesquisadores, indústrias de alimentos e farmacêuticas no mundo, não só pela capacidade de interferir no desenvolvimento microbiano de bactérias patogênicas, mas também pelos benefícios agregados durante a produção de derivados lácteos. Com capacidade de fermentar os carboidratos do leite, seu metabolismo proporciona a acidificação e fermentação de diversos derivados lácteos, conferindo a estes produtos características únicas de sabor,

aroma, textura, e ação probiótico que elas apresentam (TULINI *et al.*, 2016; MOURA, 2022). Além disso, várias cepas de BALs podem produzir bacteriocinas proteicas, sendo um atributo adicional frente a deterioração dos alimentos e inibição de microrganismos patogênicos (ROTTA *et al.* 2020).

A identificação da microbiota lática no leite representa importante papel na busca de novos produtos que possam contribuir para a tecnologia, produção de alimentos mais seguros e saudáveis. A utilização de culturas com comprovado potencial tecnológico, visa o desenvolvimento de produtos que atendam às exigências dos consumidores, alimentos saudáveis e naturais (PERALTA 2009; NOGUEIRA; SILVA; MOURA, 2022).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Potencial tecnológico das bactérias ácido lácticas

As BALs são um grupo de bactérias que desempenham papel significativo em uma variedade de processos de fermentação. Elas fermentam carboidratos alimentares e produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação. O ácido láctico confere sabor ácido fresco aos leites fermentados, auxilia na coagulação da coalhada e na formação da textura durante a fabricação de queijos, e o baixo pH ajuda a suprimir o crescimento de patógenos e microrganismos deteriorantes (GARCÍA-CANO *et al.*; VIECO-SAIZ *et al.*, 2019).

De modo semelhante, Ayivi *et al.* (2020) acrescentam que as bactérias lácticas são microrganismos Gram-positivos catalase negativos utilizados na produção de alimentos fermentados. Aparecem morfológicamente como cocos ou bastonetes e não formam esporos. São usados industrialmente em fermentações para melhorar o sabor e a textura de alimentos e rações. Elas produzem grandes quantidades de ácidos orgânicos e outras substâncias inibidoras, incluindo bacteriocinas, que mantêm microrganismos deteriorantes de alimentos e microrganismos patogênicos sob controle.

Para Moradi *et al.* (2020), podem ser encontradas em diversos habitats, incluindo alimentos e rações, água, solo e esgoto, no trato oral, respiratório, gastrointestinal e genital de humanos e animais, e sempre que substratos de carboidratos estiverem disponíveis. As bactérias ácido lácticas são classificadas em gêneros que compreendem *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Desses gêneros, *Lactobacillus* é o mais proeminente. São microrganismos dominantes no trato

gastrointestinal humano, competindo com patógenos e contribuindo para a manutenção da saúde do hospedeiro.

De acordo com Vieco-Saiz *et al.* (2019) o processo de fabricação de alguns derivados lácteos envolve a fermentação, um processo microbiano pelo qual a lactose é transformada em ácido láctico. Ao acumular no leite o ácido láctico altera as proteínas e, a textura do leite. As qualidades e aspectos particulares que caracterizam os diferentes produtos são por causa de outras variáveis como a temperatura ou a composição do leite. É o ácido láctico que confere aos produtos lácteos fermentados esse sabor ligeiramente ácido. Outros subprodutos produzidos pelas BALs fornecem sabores e aromas adicionais. Por exemplo, o acetaldeído dá ao iogurte seu sabor característico; o diacetil dá o aroma a diversos derivados lácteos fermentados.

Para Ayivi *et al.* (2020) e Moradi *et al.* (2020), as bactérias ácido lácticas usam carboidratos como fontes de carbono e energia, sem o uso de oxigênio. Elas produzem peroxidases como proteção contra danos causados por subprodutos de oxigênio. Ademais, as BALs homofermentativas usam carboidratos para produzir apenas ácido láctico, enquanto as heterofermentativas produzem ácido láctico e outros compostos, como ácido acético ou álcool e dióxido de carbono.

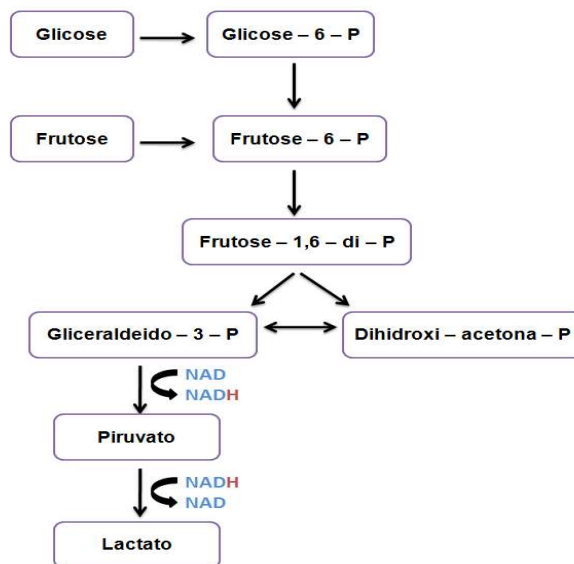


Figura 1. Representação esquemática de forma simplificada das vias do metabolismo homofermentativo em bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*.
Fonte: Adaptação de DE PAULA (2014).

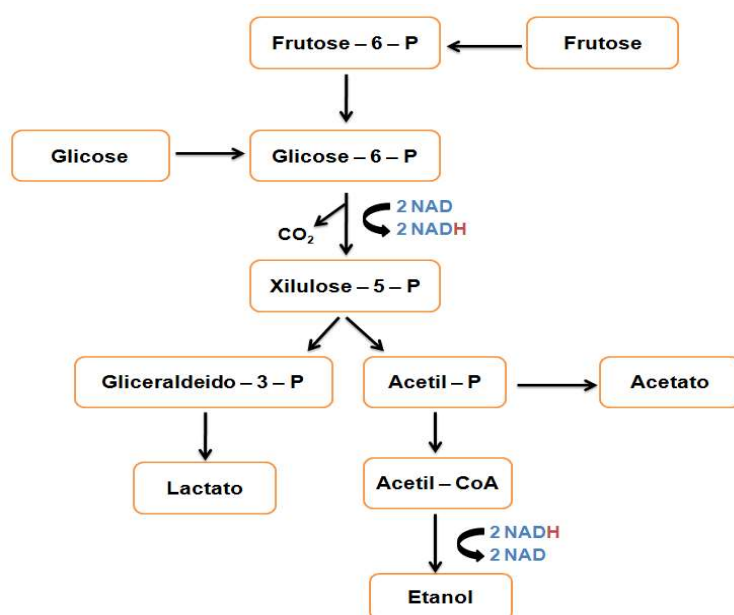


Figura 2. Representação esquemática de forma simplificada das vias do metabolismo heterofermentativo em bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*.

Fonte: Adaptação de DE PAULA (2014).

As BALs também são conhecidas pela produção de peptídeos antimicrobianos que são produzidos por espécies selecionadas de BALs, as chamadas bacteriocinas. As bacteriocinas originárias dessas bactérias têm atraído grande interesse industrial e científico como agentes de biocontrole pela prevenção segura e eficiente da deterioração de alimentos minimamente processados com o benefício da extensão da vida útil e prevenção de perdas econômicas.

Além disso, elas têm um status de presunção qualificada de segurança (QPS) e podem exercer defesa antimicrobiana seletivamente contra patógenos alimentares bacterianos, garantindo a segurança dos consumidores. O QPS significa segurança genérica em todos os usos possíveis e a avaliação abrange o princípio de quatro pontos cardiais; taxonomia, conhecimento científico, perfis de segurança e o uso final esperado. Espécies de *Lactobacillus*, incluindo termófilos de *Streptococcus*, *Lactococcus lactis* e algumas espécies de *Leuconostoc* e *Pediococcus* ganharam status de QPS. Atualmente, BALs isoladas principalmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e suas bacteriocinas são utilizados industrialmente na conservação de alimentos (AYIVI *et al.*, 2020).

Segundo Voidaru *et al.* (2020) várias cepas da BALs podem ser encontradas em produtos lácteos, como por exemplo, leite, iogurte e queijos, bem como em carnes fermentadas, vegetais fermentados, pães e na indústria farmacêutica. Segundo Dantas *et*

al. (2019), outros microrganismos, assim como o fermento láctico, podem ser adicionados às culturas para dar sabores únicos. Por exemplo, o álcool e o CO₂ produzidos pela levedura láctica contribuem para o sabor refrescante e espumoso do kefir, koumiss e leben. Outras técnicas que consistem em retirar o soro ou adicionar diferentes sabores também são utilizadas para criar grande variedade de produtos disponíveis no mercado.

A indústria alimentícia está constantemente em busca de novas cepas bacterianas, levantando estudos, isolamento e a caracterização de suas propriedades benéficas. Outros interesses das indústrias são pelos polissacarídeos extracelulares ou glucanos, produzidos pelas BALs, esses glucanos têm propriedades físico-químicas industrialmente muito úteis, pois ajudam na melhoria de diversos produtos (BARBOSA *et al.*, 2019).

Os glucanos são uma grande classe de polissacarídeos complexos que podem ser encontrados em abundância de fontes. Dependendo da origem, podem ser classificados como derivados de cereais ou não derivados de cereais. As fontes de cereais incluem aveia e cevada e fontes não cereais podem incluir cogumelos, algas, bactérias e algas marinhas (CHEN *et al.*, 2021). Os glucanos são compostos biologicamente ativos que têm sido amplamente relatados para melhorar a saúde. Há interesse crescente em alimentos que têm o potencial de reduzir o risco ou a incidência de doenças crônicas ou promover a expectativa de vida, e propriedades antienvhecimento. Isso levou ao aumento na conscientização sobre o efeito da dieta na saúde (KORCZ; VARGA, 2021).

Segundo Aburas *et al.* (2020) os glucanos da mesma fonte de espécies podem ter variações na estrutura. As variações podem incluir comprimento da cadeia, graus de ramificação, polimerização e estrutura conformacional 3D. A estrutura conformacional tridimensional pode ser bobina aleatória, hélice simples ou hélice tripla. Além disso, outros fatores que podem influenciar a estrutura incluem condições de crescimento, procedimento de extração e análise.

De acordo com Chen *et al.* (2021) no ano de 1979, Stephen De Felice criou o termo nutracêutico, que pode ser nutrientes isolados, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente modificados e produtos fitoterápicos. Os nutracêuticos são definidos como alimento ou componente alimentar que fornece benefícios a saúde, incluindo prevenção e/ou tratamento de doenças. Da mesma forma, os compostos bioativos são definidos como compostos essenciais e não essenciais que ocorrem na natureza, fazem parte da cadeia alimentar e demonstraram ter efeito na saúde humana.

As substâncias bioativas nos alimentos, conforme Korcz e Varga (2021) fornecem benefícios à saúde além dos nutricionais do produto. Os glucanos são relatados como

bioativos e nutracêuticos. Seus efeitos terapêuticos também podem ser amplamente classificados em duas categorias, efeitos metabólicos ou efeitos imunomoduladores, que são amplamente baseados na estrutura, determinados pela fonte.

Entretanto, Aburas *et al.* (2020) referem que os efeitos metabólicos são geralmente observados com glucanos derivados de cereais. Os efeitos incluem modulação do microbiota intestinal, redução do colesterol e diminuição do risco cardiovascular e diabético. Os glucanos não cereais estão associados a efeitos imunomoduladores, efeitos antitumorais, cicatrização de feridas e alívio de condições relacionadas ao sistema imunológico.

Nogueira (2022) e Moura (2022) afirmam que as BALs são utilizadas como importantes culturas iniciais em grande escala sob condições controladas. Ao comparar com os produtos sob fermentação natural, as BALs têm potenciais culturas iniciadoras que reduzem e dominam a diversidade de microrganismos em produtos lácteos fermentados, o uso de BALs na preservação e fermentação do leite para a produção de derivados e melhora da qualidade e a palatabilidade destes produtos (MOTTA, 2015).

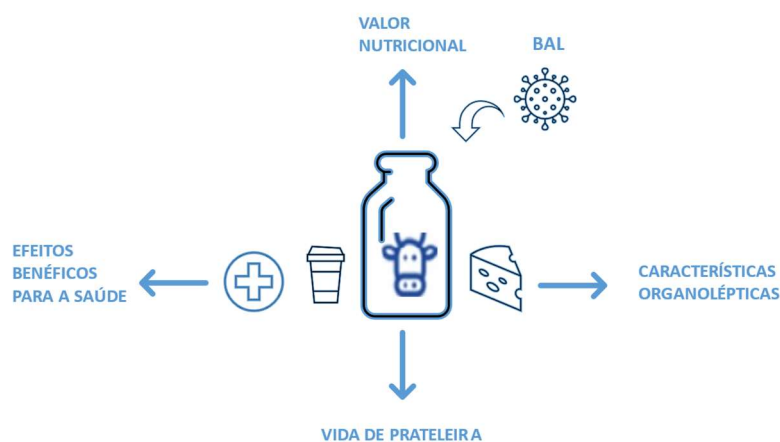


Figura 3. Possíveis efeitos funcionais de bactérias ácido lácticas na indústria de laticínios. Fonte: Adaptação de Agagunduz (2022).

Uma cultura iniciadora de acordo com Sharma *et al.* (2020) pode ser definida como preparação microbiana de grande número de células, com pelo menos um microrganismo a ser adicionado a uma matéria-prima produzindo um alimento fermentado, acelerando e direcionando seu processo de fermentação. O grupo das BALs ocupa papel central nestes processos, e tem longa e segura história de aplicação e

consumo na produção de alimentos e bebidas fermentados.

Isto porque provocam a rápida acidificação da matéria-prima através da produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico. Além disso, a produção de ácido acético, etanol, compostos de aroma, bacteriocinas, exopolissacarídeos e várias enzimas é importante. Desta forma, eles aumentam a vida útil e a segurança microbiana além de melhorarem a textura (ARAUJO *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de culturas bacterianas fermentadoras foi enorme nos últimos 15 anos, desde a descoberta da sequência completa do genoma de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 e a variedade de culturas iniciais comerciais, funcionais, bioprotetoras e probióticas com propriedades desejáveis foram comercializadas. Avanços na genética, biologia molecular, fisiologia e bioquímica das BALs forneceram novas percepções e aplicações para essas bactérias. A indústria alimentícia é hoje capaz de produzir produtos seguros e nutritivos com diferentes sabores, por vezes com propriedades especiais promotoras da saúde, que satisfazem as exigências de todos os consumidores e nichos de mercado, e que se assemelham às características dos produtos tradicionais. Além disso, o uso de cepas selecionadas de determinadas espécies com propriedades metabólicas conhecidas e altas performances tecnológicas melhorou o controle de qualidade total do processo de fabricação (YERLIKAYA, 2014; ARAUJO *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2020).

Para Medved'ová *et al.* (2020) a principal aplicação das BALs é como cultura inicial na fabricação de uma enorme variedade de produtos lácteos fermentados (queijos, iogurtes, leites fermentados), no processamento de carnes, peixes, frutas, vegetais e cereais. Além de contribuírem com as características organolépticas, também contribuem aumentando o valor nutricional dos alimentos fermentados.

As fermentações conduzidas por BALs, geralmente produzem subprodutos com bioatividade e uma gama diversificada de efeitos promotores da saúde, incluindo proteção contra agentes infecciosos, efeitos imunomoduladores, efeitos antialérgicos, efeitos antiobesidade, efeitos antioxidantes, aumentando a biodisponibilidade de vitaminas minerais, efeitos ansiolíticos, entre outros (SHARMA *et al.*, 2020). Segundo Araújo *et al.* (2020), uma metanálise destacou os efeitos do consumo de alimentos fermentados com BALs e os impactos positivos na manutenção do peso, enquanto estudos separados demonstraram que o consumo de iogurtes fermentados e laticínios podem atenuar a probabilidade de desenvolver doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2. O leite fermentado tem o potencial de melhorar os mecanismos envolvidos no metabolismo da

glicose e reduzir a dor muscular associada ao exercício resistido.

2.2 Potencial antagonista das bactérias ácido lácticas

Segundo Linares *et al.* (2017) as BALs pertencem a um grupo de bactérias benéficas, com diversas virtudes que vão além da fermentação de alimentos. Possuem a capacidade de produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas), e de interferir no desenvolvimento de bactérias patogênicas, além de proporcionar melhor equilíbrio microbiano intestinal. Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas sintetizadas por ribossomos de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que são liberadas para o meio extracelular, e que diferem no tamanho, alvo microbiano, modo de ação, mecanismo de liberação e de imunidade (MOURA, 2022).

Para Sharma *et al.* (2020) em vários nichos ecológicos, os microrganismos competem entre si pela sobrevivência e, por meio da evolução, formam comunidades microbianas únicas. Em alguns ecossistemas alimentares, as BALs constituem a microbiota dominante. Esses organismos são capazes de produzir compostos antimicrobianos contra a flora competidora, incluindo os que deterioram os alimentos e bactérias patogênicas. Sob condições ambientais desfavoráveis, muitas espécies de BALs também produzem exopolissacarídeos, que se protegem contra dessecação, bacteriófagos e ataque de protozoários.

A proteção dos alimentos deve-se à produção de ácidos orgânicos, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrogênio e diacetil, compostos antifúngicos como ácidos graxos, bacteriocinas e antibióticos como a reuterociclina (SHARMA *et al.*, 2020). São compostos proteicos biologicamente ativos, que atuam como bactericidas frente a microrganismos patogênicos (MEDEIROS, 2020).

A capacidade antagônica das cepas de BALs é fator importante para a avaliação de probióticos. A capacidade antagonista inclui adesão ao intestino, redução da adesão bacteriana patogênica ao intestino, agregação e coagregação, produção de substâncias antimicrobianas como bacteriocinas (CHOI *et al.*, 2018). As bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas (principalmente as BALs) apresentam maior interesse comercial, por serem consideradas mais seguras para o consumo, e por terem amplitude de inibição a patógenos (NOGUEIRA, 2022).

Para Choi *et al.* (2018), cepas de bactérias lácticas são potencialmente promissoras,

gerando agentes bioativos bactericidas capazes de controlar o crescimento dos patógenos. Os efeitos benéficos conferidos por esses organismos incluem a inibição de bactérias patogênicas Gram-negativas e positivas. De acordo com Mechai *et al.* (2020), múltiplos mecanismos de ação para o efeito benéfico das BALs como probióticos foram propostos. A capacidade de adesão do microrganismo probiótico à mucosa intestinal é considerada importante para muitos dos efeitos probióticos observados na saúde. A capacidade de aderir às células epiteliais e superfícies mucosas tem sido sugerida como sendo uma propriedade importante de muitas cepas bacterianas usadas como probióticos.

Essa adesão é um pré-requisito para a colonização dos probióticos na cavidade intestinal, proporcionando vantagem competitiva neste ecossistema. Várias pesquisas sugerem que a capacidade de microrganismos benéficos de agregar e aderir auxilia na colonização do intestino, e no estabelecimento de uma barreira que impede que os enteropatógenos estabeleçam uma infecção. Os fatores que previnem a infecção incluem a presença física de microrganismos benéficos e a modulação do sistema imunológico do intestino por esses organismos (MECHAI *et al.*, 2020).

As atividades metabólicas das bactérias lácticas, segundo Leska *et al.* (2022), tem capacidade de produzir rapidamente grandes quantidades de produtos ácidos com redução de pH concomitante. Embora seus efeitos específicos sejam difíceis de quantificar, outros produtos metabólicos das BALs, como peróxido de hidrogênio e diacetil, também podem contribuir para a antibiose geral e o potencial conservante desses produtos. A contribuição das bacteriocinas também é difícil de avaliar. Sugere-se que possam desempenhar papel na seleção da microflora que inicia a fermentação. Acredita-se que as bacteriocinas sejam importantes na capacidade das BALs de competir em ecossistemas não fermentativos, como o trato gastrointestinal, e pode conferir atividade antimicrobiana direta a microrganismos como *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, três dos mais importantes patógenos de origem alimentar.

Ressalta-se conforme Choi *et al.* (2018), que as BALs são competidoras de habitat bem-sucedidas, pela capacidade de exclusão competitiva, que consiste na liberação de substâncias antimicrobianas capazes de afetar o desenvolvimento de outros microrganismos. O principal produto do metabolismo das BALs é o ácido láctico, mas podem produzir outros ácidos orgânicos e compostos como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), dióxido de carbono (CO₂), diacetil e bacteriocinas.

Os ácidos orgânicos, especialmente o ácido láctico, são metabólitos produzidos como resultado do metabolismo do açúcar. São liberados para o ambiente reduzindo o

pH, inibindo o desenvolvimento de algumas populações de microrganismos indesejáveis. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem efeito oxidante sobre grupos sulfidrila de proteínas de membrana e sobre lipídios, danificando também a parede celular de alguns outros microrganismos (CHOI *et al.*, 2018).

Adicionalmente, Choi *et al.* (2018) referem que o H_2O_2 reage com O_2 , formando CO_2 reduzindo o O_2 livre e cria um ambiente anaeróbico que pode reduzir o desenvolvimento de populações aeróbicas. O diacetil está associado a um cheiro característico de alguns produtos lácteos, mas possui atividade antagônica quando interage com a membrana celular de algumas bactérias alterando algumas vias metabólicas.

O potencial bactericida tornou-se atrativo para as indústrias alimentícias, que têm demonstrado grandes esforços para o desenvolvimento de estudos sobre a sua aplicação para a preservação de alimentos, como meio alternativo dos conservantes químicos, sem causar interferência na qualidade destes (SANTOS *et al.*, 2020). Essa preocupação com a preservação dos alimentos ocorre porque muitas doenças são transmitidas por alimentos, por se tratar de veículo para bactérias como as *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella spp* (PALMA, 2020).

Para Ayivi *et al.* (2020) e Sharma *et al.* (2020) o uso de BALs na preservação de alimentos é conhecido como biopreservação, que é uma abordagem natural para o uso de microbiota controlada como alternativa para prolongar a vida útil e preservar os alimentos. Portanto, a biopreservação é considerada como um dos muitos atributos derivados das BALs no âmbito da segurança/deterioração de alimentos. Como as bactérias ácido lácticas produzem naturalmente bacteriocinas que auxiliam na conservação dos alimentos, elas funcionam como sistema de defesa antagônico, inibitório e antimicrobiano que atua contra patógenos e microrganismos deteriorantes. Como resultado, as BALs podem ser usadas como ferramenta para garantir a segurança e a qualidade dos produtos alimentícios.

Conforme Park *et al.* (2020) há pesquisa sobre bactérias ácido lácticas que confirmou como cepas específicas possuem propriedades probióticas e conferem características sensoriais únicas aos produtos alimentícios. A utilização das BALs em muitos produtos alimentares, confere vários benefícios à saúde humana quando são frequentemente consumidas em quantidades adequadas.

Existem várias bacteriocinas que já foram caracterizadas de acordo com estudos

bioquímicos e genéticos, como as lactocinas, plantaricinas, pediocinas e enterocinas, porém, a que é atualmente aceita como aditivo alimentar pela Organização Mundial de Saúde é a nisina, que tem utilização relatada há mais de 50 anos, e que atualmente é comercializada e utilizada como conservante de alimentos no Brasil, e em diversos países (NOGUEIRA, 2022).

Bactéria Láctica	Bacteriocina
<i>L. lactis</i> subsp.lactis	Nisina Lacticina 481 Bacteriocina V e VII
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacina F
<i>L. curvatus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Curvacina A
<i>L. carnis</i>	Bacteriocina S
<i>L. sake</i>	Sakacina A Sakacina P
<i>Lactobacillus sp.</i>	Bacteriocina
<i>Leuconostoc</i>	Leucocina A-UAL 187
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesenterocina 5 Mesenterocina Y105
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocina A
<i>Pediococcus</i>	Pediocina PA1

Quadro 1. Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas.

Fonte: Adaptação de MORENO *et al.* (2008).

Em função da atividade antimicrobiana, a maioria das bacteriocinas atuam desestabilizando seus patógenos (Gram-positivos) através da lise celular, sendo pouco eficazes contra bactérias Gram-negativas, por serem constituídas de uma membrana externa formada de lipopolissacarídeos (LPS) que atuam barreira mais resistente. Estas características também as tornam eficientes na bioconservação de alimentos pela ação inibitória de microrganismos deterioradores, e para finalidades terapêuticas, pela atuação contra patógenos variados (VOIADURA *et al.*, 2020).

2.3 Bactérias ácido lácticas como fonte de probióticos

Os consumidores estão cada vez mais exigentes por alimentos naturais e benéficos, a fim de melhorar a saúde e bem-estar, os probióticos desempenham papel importante nessa demanda, e os laticínios são comumente usados como veículos para

essas bactérias, representadas predominantemente por BALs. Devido à demanda dos consumidores, a indústria alimentícia está constantemente em busca de novas cepas, levando a estudos que visam o isolamento e a caracterização de suas propriedades benéficas (LINARES *et al.*, 2017).

Palma (2020), afirma que os probióticos são definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro". Bactérias têm longa história de uso seguro em alimentos. Há aumento no interesse por essas espécies, à medida que as pesquisas começam a revelar os muitos possíveis benefícios à saúde associados ao seu uso.

Devido as propriedades à saúde concedidas pela ingestão de derivados lácteos, estes produtos têm se tornado altamente consumidos com alta demanda. Por vários mecanismos, as BALs presentes no leite e derivados estão contribuindo para a saúde humana. Certas cepas de BALs como os gêneros *Lactobacillus*, são altamente utilizadas como bactérias promotoras de saúde.

Na pesquisa desenvolvida por Moraes *et al.* (2019) com o objetivo de avaliar o efeito das cepas probióticas de *Lactobacillus brevis* e *Bifidobacterium bifidum* no crescimento do biofilme de *Staphylococcus aureus*. Após análise, verificou-se que houve diferença significativa entre os grupos quando comparados em relação à quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

As ações das BALs apresentam vários benefícios bem estabelecidos, eles podem melhorar a digestão da lactose, desempenhar papel na prevenção e no tratamento da diarreia e agem no sistema imunológico, ajudando o corpo a resistir e combater as infecções. Mas, para que as BALs exerçam qualquer efeito probiótico, elas precisam ser capazes de sobreviver tanto aos ácidos do estômago (pH tão baixo quanto 1,5) quanto aos ácidos biliares (pH tão baixo quanto 2) (GILLILAND 1990; TSUDA; KODAMA, 2021).

A esse respeito, Maldonado *et al.* (2019) demonstraram por meio de microscopia eletrônica que 2 microrganismos probióticos, *L. casei* CRL 431 e *L. paracasei* CNCM I-1518, aderem às células epiteliais intestinais através dos receptores e medeiam a estimulação imune. Após essa interação, ocorreu aumento na produção de citocinas e proteína quimiotática macrófaga, das células epiteliais intestinais, sem alterar a barreira intestinal; apenas um ligeiro aumento na infiltração de células mononucleares do intestino delgado foi observado. Como consequência, as células epiteliais intestinais iniciam complexa rede de sinais que estimulam as células imunes associadas à lâmina própria e ativam principalmente a resposta inata e as citocinas liberadas pelos linfócitos T.

Do mesmo modo, Monteagudo-Mera *et al.* (2019) destacaram numerosas evidências que mostraram que os probióticos podem ser úteis para o tratamento e prevenção de infecções urogenitais, especialmente em mulheres. As células do epitélio da bexiga humana são comumente usadas *in vitro* para prever a capacidade de adesão dos probióticos e seu antagonismo contra patógenos durante a infecção urinária. Nesse sentido, diferentes ensaios clínicos também relataram uma colonização probiótica transitória na vagina e comprovaram a eficácia da profilaxia probiótica para reduzir a incidência de vaginose bacteriana.

Ademais, o ácido láctico (lactato), formado durante a quebra da glicose, têm efeito positivo na saúde. O lactato é encontrado em produtos lácteos fermentados, como o iogurte. Ao contribuir para a formação de um pH ácido no trato intestinal, o lactato aumenta a solubilidade e a disponibilidade do cálcio e, promove sua absorção. O lactato também aumenta a absorção de cálcio e de outros minerais, por exemplo ferro e fósforo (XIMENES, 2019).

Os efeitos positivos do lactato para a regulação da digestão são: melhor digestão das proteínas do leite por precipitação de finas partículas coaguladas, estimulação da síntese do suco gástrico e evacuação acelerada do conteúdo gástrico pela ativação das ondas peristálticas do estômago. Uma vez que algumas bactérias patogênicas não são tolerantes a ácidos, a diminuição do pH pelo lactato tem efeito bacteriostático ou bactericida sobre essas bactérias sensíveis a ácidos (GARCÍA-BURGOS *et al.*, 2020).

Entre os vários benefícios para a saúde as BALs são probióticos que agem na modulação da microbiota intestinal, imunomodulação, efeitos antimicrobianos, anticancerígenos e antiobesidade. Devido aos seus diversos benefícios, são utilizadas como ingredientes alimentícios funcionais. No entanto, nem todos as BAL são probióticos e os mesmos devem ser avaliados quanto aos seus atributos probióticos e perfil de segurança (WANG *et al.*, 2021).

Em concordância Hernandez-Gonzalez *et al.* (2021) destacam que as BALs compreendem grande variedade de gêneros. Existem em uma gama evidente de habitats, incluindo trato gastrointestinal, cavidade oral, trato vaginal de humanos e animais, alimentos fermentados, silagens e compostos. Eles possuem vários benefícios para a saúde do hospedeiro, como melhora da função imunológica, melhor digestão, controle de doenças inflamatórias intestinais, alívio da constipação e fortalecimento da barreira mucosa. Alguns isolados ainda possuem efeitos anticancerígenos ou antidiabéticos. Portanto as BALs foram consideradas como melhores candidatas a probiótico.

As BALs como candidatas a probióticos devem ser testadas quanto à sobrevivência no trato gastrointestinal, tolerância abaixo pH e bile, atributos de agregação, potencial antimicrobiano e perfil de segurança. BALs probióticos isolados de várias fontes, como vegetais, frutas, produtos lácteos e alimentos fermentados são usados como cultura inicial em vários produtos alimentícios. Devido aos seus benefícios para a saúde, os probióticos agora são tendência em produtos para alimentação humana e animal. Embora as BALs sejam a principal fonte de probióticos, o perfil de segurança deve ser avaliado antes da comercialização (HERNANDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2021).

Utilizada historicamente para melhorar a preservação de alguns alimentos, a pesquisa nutricional tem revelado seu papel fundamental no equilíbrio intestinal e imunológico. Os probióticos são microrganismos consumidos desde o início dos tempos por meio de certos alimentos fermentados (iogurte, queijo, chucrute etc.) (MORADI *et al.*, 2021).

As bactérias probióticas pertencem a apenas algumas famílias, dentro dessas famílias numerosas, de acordo com as pesquisas realizadas, certas cepas foram selecionadas por sua capacidade de sobreviver no intestino e pelas fortes interações que podem desenvolver com este. Elas formam barreira no intestino contra microrganismos indesejados (LINARES *et al.*, 2017). Essa barreira é passiva e ativa, passivas, porque ocupam espaço e consomem nutrientes essenciais para o crescimento microbiano, e ativas, pois os fermentos lácteos produzem as chamadas substâncias inibidoras, limitando a sobrevivência e proliferação de bactérias nocivas (TSUDA; KODOMA, 2021).

Nos últimos anos, os relatórios científicos mostram que as BALs têm muitos efeitos positivos para a saúde, são usadas como cultura inicial na fermentação do leite e por sua capacidade fermentativa e são enriquecedores de nutrientes, melhorando os atributos organolépticos, melhorando a segurança alimentar e trazendo benefícios para a saúde. A maioria das bactérias probióticas atualmente disponíveis no mercado, pertence aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (WIDYASTUTI, 2014; ÉUSEBIO, 2020).

Tabela 1. Microrganismos com propriedades probióticas

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias ácido lácticas
<i>L. acidophilus</i> ¹	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ²
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i> ¹	<i>B. bifidum</i> ¹	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ¹	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. gallinarum</i> ²	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. johnssonii</i>		
<i>L. paracasei</i> ¹		
<i>L. plantarum</i> ¹		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosu</i>		

¹Aplicação principal indústria alimentícia; ²Aplicação principal para animais.

Fonte: The American journal of clinical nutrition, v. 73.

De acordo com Sharma *et al.* (2021) as BALs são microrganismos seguros, capazes de proporcionar condições saudáveis a seres humanos e animais. Os probióticos são usados em medicina humana na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, distúrbios gastrointestinais, e como imunomoduladores, e na inibição da carcinogênese. Em medicina veterinária, além dessas aplicações, podem também serem usados como promotores de crescimento (MOURA, 2022).

Alguns estudos sugerem que os produtos alimentícios fermentados das bactérias proporcionam melhor digestibilidade, assimilação de nutrientes e efeitos sobre a constipação. Alguns exemplos de efeitos benéficos sob investigação incluem o alívio da intolerância à lactose, prevenção e tratamento da diarreia, manutenção da flora intestinal normal, antagonismo contra patógenos, estimulação do sistema imunológico, atividade anticarcinogênica e redução dos níveis de colesterol sérico (EUSÉBIO, 2020).

Para Tsuda, Kodoma (2021), as BALs representam a principal fonte de alimentos com características probióticas, comunicam-se com as células intestinais, permitindo ativação do sistema de defesa, através da ativação ocorrerá a produção de uma camada de muco protetora, de anticorpos e conseqüentemente, o endurecimento das junções entre as

células.

Elas participam, juntamente com as outras bactérias da microbiota, na escavação de resíduos de alimentos que não são capazes de digerir, tais como fibras ou, para alguns, lactose. Isso tem várias vantagens: por um lado, reduz a quantidade de resíduos e facilita sua eliminação. Por outro lado, esta digestão residual produz nutrientes essenciais para a mucosa intestinal e para o organismo. Numerosos estudos mostraram, portanto, a eficácia dos probióticos em manter o trânsito intestinal harmonioso (AJUWON, 2015; FERNANDO *et al.*, 2018).

Segundo Eusébio (2020); Moura (2022) eles induzem a reação imunológica essencial para a luta contra as infecções. Os probióticos têm mostrado repetidamente sua implicação na manutenção e retorno do conforto intestinal, em particular, em indivíduos com síndrome do intestino irritável. Da mesma forma, muitas pesquisas têm demonstrado o valor de probióticos na manutenção de uma resposta imune saudável e na restauração da microbiota intestinal alterada, após a ingestão de antibióticos. As cepas de BALs probióticos contido em produtos lácteos fermentados e seus compostos bioativos têm muitos efeitos positivos para a saúde, incluindo efeitos imunomoduladores e anti-hipertensivos (Aragón *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2012).

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem importante problema de saúde pública e o nível elevado de colesterol no sangue está entre os principais fatores de risco para DCV. Recentemente, foi relatado que o teor de colesterol de alguns produtos lácteos fermentados é menor do que o do leite (Bonczar *et al.*, 2016). Estudos mostram que bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados demonstraram efeito hipocolesterolêmico ao precipitar o colesterol com a hidrólise do ácido biliar conjugado enquanto assimilam o colesterol e os sais biliares. Por exemplo, cepas de *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolado do kefir tibetano diminuiu notavelmente os valores de triglicerídeos, colesterol total sérico e colesterol de lipoproteína de baixa densidade em ratos hipercolesterolêmicos, inibindo a doença de Niemann-Pick (Huang *et al.*, 2013).

Além disso, em pesquisas realizadas com ratos alimentados com uma dieta contendo altos níveis de colesterol, três cepas de BALs (*Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*) foram capazes de reduzir os níveis séricos de colesterol total, colesterol de lipoproteína de baixa densidade e triglicerídeos (Zheng *et al.*, 2013). Em um estudo clínico incluindo mulheres com sobrepeso e hipertensão, foi determinado que o queijo Minas Frescal fermentado com *Lactobacillus casei* aumentou o colesterol de lipoproteína de alta densidade, reduziu o colesterol de

lipoproteína de baixa densidade e triglicerídeos e afetou positivamente a hemoglobina e o hematócrito (Sperry *et al.*, 2018). Os efeitos hipocolesterolêmicos do kefir convencional também foram relatados quando comparados ao comercial (Bourrie *et al.*, 2018). Uma vez que os produtos lácteos fermentados tradicionais são fontes valiosas de *lactobacilos* probióticos com atividade de assimilação do colesterol, sua atividade hipocolesterolêmica é mais forte do que a de outros alimentos fermentados (Sun *et al.*, 2015).

Embora existam muitas linhagens probióticas bem caracterizadas disponíveis para uso comercial, o isolamento e caracterização de novas cepas é desejável para a formulação de alimentos probióticos modernos (FERNANDES *et al.*, 2018).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aburas, H.; İspirli, H.; Taylan, O.; Yilmaz, M. T.; & Dertli, E. Structural and physicochemical characterization and antioxidant activity of an α -D-glucan produced by sourdough isolate *Weissella cibaria* MED17. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 161, p. 648-655, 2020.

Agagunduz, D., Şahin, T. O., Ayten, Ş., Yilmaz, B., Guneşliol, B. E., Russo, P. Özogul, F. Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry. *Food Bioscience*, v. 47, p. 101617, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101617>

Ajuwon, K. M. Toward a better understanding of mechanisms of probiotics and prebiotics action in poultry species. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 25, n. 2, p. 277-283, 2016.

Akhmetsadykova, S.; Baubekova, A.; Konuspayeva, G.; Akhmetsadykov, N.; Faye, B.; Loiseau, G. Lactic acid bacteria biodiversity in raw and fermented camel milk. *African Journal of Food Science and Technology*, v. 6, n. 3, 2015. <http://dx.doi.org/10.14303/ajfst.2015.026>. https://agritrop.cirad.fr/575990/1/document_575990.

Araújo, J. R.; Tazi, A.; Burlen-Defranoux, O.; Vichier-Guerre, S.; Nigro, G., Licandro, H.; Sansonetti, P. J. Fermentation products of commensal bacteria alter enterocyte lipid metabolism. *Cell host & microbe*, v. 27, n. 3, p. 358-375. e7, 2020.

Aragón, F.; Carino, S.; Perdígón, G.; De Moreno D. L. A. (2014). The administration of milk fermented by the probiotic *Lactobacillus casei* CRL 431 exerts an immunomodulatory effect against a breast tumour in a mouse model. *Immunobiology*, 219(6), 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.02.005>

Ayivi, R. D.; Gyawali, R.; Krastanov, A.; Aljaloud, S. O.; Worku, M.; Tahergorabi, R.; Ibrahim, S. A. Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications. *Dairy*, v. 1, n. 3, p. 202-232, 2020.

Barbosa, M. G.; Souza, A. B.; Tavares, G. M.; Antunes, A. E. C. Leites A1 e A2: revisão sobre seus potenciais efeitos no trato digestório. *Segurança alimentar e nutricional*, v. 26, p. e019004-e019004, 2019.

Beristain-Bauza, S. C.; Palou, E.; López-Malo, A. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, v. 6, n. 2, p. 64-78, 2012.

Bonczar, G.; Walczycka, M. B.; Domagała, J.; Maciejowski, K.; Najgebauer-Lejko, D.; Sady, M.; Wszolek, M. Effect of dairy animal species and of the type of starter cultures on the cholesterol content of manufactured fermented milks. *Small Ruminant Research*, v. 136, p. 22–26, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.033>

Burgain, J.; Scher, J.; Francius, G.; Borges, F.; Corgneau, M.; Revol-Junelles, A. M.; Gaiani, C. Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interaction

swith food matrix components. *Advances in colloid and interface science*, v. 213, p. 21-35, 2014.

Bourrie, B. C. T. T.; Cotter, P. D.; Willing, B. P. Traditional kefir reduces weight gain and improves plasma and liver lipid profiles more success fully than a commercial equivalent in a mouse model of obesity. *Journal of Functional Foods*, v. 46, p. 29–37, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.039>

Castro, M. D. C.; Lopes, J. D.; Souza, R. G. D.; Souza, C. B. D.; Nascimento, A. D. R. Cadeia Produtiva do Leite em Goiás: uma análise para o Território Estrada de Ferro. *Conjuntura Econômica Goiana, Goiânia*, v. 30, p. 83- 98, 2014.

Chen, Z.; Ni, D.; Cheng, M.; Zhu, Y.; Mu, W. Comparative study of physicochemical properties of dextran and reuteran synthesised by two glucansucrases that are highly similar in amino acid sequence. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 56, n. 12, p. 6674-6684, 2021.

Choi, A. R.; Patra, J. K.; Kim, W. J.; Kang, S. S. Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 1963, 2018.

Colombo, M.; Castilho, N.; Todorov, S. D.; Nero, L. A. Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. *BMC Microbiology*, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1356-8>.

Dantas, A.; Veruck, S.; Prudencio, E. S. *Ciência e tecnologia de leite e produtos lácteos sem lactose*. Ponta Grossa. Atena Editora, 2019.

Dantas, A.; Kumar, H.; Prudencio, E. S.; De Avila J. L. B.; Orellana-Palma, P.; Dosoky, N. S.; Kumar, D. An approach on detection, quantification, technological properties, and trends market of A2 cowmilk. *Food Research International*, p. 112690, 2023.

Das, Deeplina; Goyal, Arun. Lactic acid bacteria in food industry. *Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology*, p. 757-772, 2012. doi:10.1007/978-94-007-2214-9_33

De Paula, Mariana Camargos de. Avaliação do risco da ocorrência de resistência a antibióticos e/ou bacteremia causada por bactérias ácido lácticas: uma revisão sistemática. 2014. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

De Vitte, K.; Kerziene, S.; Klementaviciute, J.; De Vitte, M.; Miseikiene, R.; Kudlinskiene, I.; Stankevicius, R. Relationship of β -casein genotypes (A1A1, A1A2 and A2A2) to the physicochemical composition and sensory characteristics of cows milk. *Journal of Applied Animal Research*, v. 50, n. 1, p. 161-166, 2022.

Eusébio, Francisca Nascimento. Avaliação do potencial de patogenicidade de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos tradicionais portugueses. 2020. Dissertação de Mestrado - Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Farias, I. M. S. C.; Lomele, R. L.; Oliveira R. R.; Sampaio, G. S. L.; Santos, C. T., Barbosa, L. G. B. Ácido láctico na redução microbiana e cor de carcaças bovinas. *Revista Veterinária e Zootecnia*, n. 76, 2019.

Maldonado Galdeano, C.; Cazorla, S. I.; Lemme Dumit, J. M.; Vélez, E.; Perdigón, G. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 74, n. 2, p. 115-124, 2019.

García-Burgos, M., Moreno-Fernández, J., Alférez, M. J., Díaz-Castro, J., & López-Aliaga, I. New Perspectives In Fermented Dairy Products and their health relevance. *Journal of Funtional Foods*, [s. l.], v. 72, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104059>.

García-Cano, I.; Rocha-Mendoza, D.; Ortega-Anaya, J.; Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 103, p. 5243-5257, 2019.

Garneau, J. E; Moineau, S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories*, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2011. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20>.

Gilliland, S. E. et al. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 7, n. 1-2, p. 175-188, 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04887.x>

Hernández-González, J. C.; Martínez-Tapia, A.; Lazcano-Hernández, G.; García-Pérez, B. E.; Castrejón-Jiménez, N. S. Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. *Animals*, v. 11, n. 4, p. 979, 2021.

Holzappel, W. H.; Haberer, P.; Geisen, R.; Björkroth, J.; Schillinger, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, v. 73, n. 2, p. 365s-373s, 2001.

Hohmann, L. G.; Yin, T.; Schweizer, H.; Giambra, I. J.; König, S.; Scholz, A. M. Comparative Effects of Milk Containing A1 versus A2 β -Casein on Health, Growth and β -Casomorphin-7 Level in Plasma of Neonatal Dairy Calves, *Animals*, v. 11, 2021

Huang, Y., Wu, F.; Wang, X.; Sui, Y.; Yang, L.; Wang, J. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 5, p. 2816–2825, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-637>.

Jianqin, S.; Leiming, X.; Lu, X., Yelland, G. W.; Ni, J.; Clarke, A. J. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutrition journal*, v. 15, p. 1-16, 2015.

Klijn, N.; Weerkamp, A. H.; De Vos, W. M. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and environmental microbiology*, v. 57, n. 11, p. 3390-3393, 1991.

Kok, C. R.; Hutkins, R. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutrition reviews*, v. 76, n. Supplement 1, p. 4-15, 2018.

KORCZ, E.; VARGA, L. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 110, p. 375-384, 2021.

Leska, A.; Nowak, A.; Szulc, J.; Motyl, I.; Czarnecka-Chrebelska, K. H. Antagonistic Activity of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria against Honeybee (*Apis mellifera* L.) Pathogens. *Pathogens*, v. 11, n. 11, p. 1367, 2022.

Lima, C. H. G. S. Avaliação de propriedades probióticas e tecnológicas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, 2019.

Linares, D. M.; Gómez, C.; Renes, E.; Fresno, J. M.; Tornadijo, M. E.; Ross, R. P.; Stanton, C. Lactic Acid Bacteria and Bifido bacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 846, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00846>

Medeiros, I. P. D. S. Efeito do polimorfismo do gene da beta-caseína na qualidade do leite da raça Sindi. 2020.

Medved'ová, A.; Konuchová, M.; Kvociková, K.; Hatalová, I.; Valík, L. U. Effect of Lactic Acid Bacteria Addition on the Microbiological Safety of Pasta-Filata Types of Cheeses. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 612528, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612528>

Miotto, S. P. S.; Fensterseifer, L. C.; de Souza H. G.; Martins, G.; Ficagna, E.; Steffens, J.; Cansian, R. L. Malolactic fermentation of lactic acid bacteria isolated from southern Brazilian red wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 8, p. 201, 2023.

Monteagudo-Mera, A.; Rastall, R. A.; Gibson, G. R.; Charalampopoulos, D.; Chatzifragkou A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 103, p. 6463-6472, 2019.

Moradi, M.; Kousheh, S. A.; Almasi, H.; Alizadeh, A.; Guimarães, J. T.; Yılmaz, N.; Lotfi, A. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 19, n. 6, p. 3390-3415, 2020.

Moradi, M.; Guimarães, J. T.; Sahin, S. Current applications of exopolysaccharides from lactic acid bacteria in the development of food active edible packaging. *Current Opinion*

in Food Science, v. 40, p. 33-39, 2021.

Moraes, M. C. C.; Costa, P. J. C.; Segundo, A. S. G.; Peruzzo, D. C. Avaliação do efeito de cepas probióticas em biofilme de *S. aureus* sobre discos de titânio com superfície tratada. Revista de Odontologia da UNESP, v. 48, p. e20190096, 2019.

Moreno, I.; Lerayer, A.L.S.; Leitão, M.F.F. Bacteriocinas de bactérias lácticas: Utilização em laticínios e fatores que afetam a sua eficiência. 2008. Artigo em Hypertexto. http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/bacteriocinas/index.htm

Motta, A.S.; Gomes, M. D. S. M. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. Revista do Instituto de Laticínios Cândidos Tostes, v. 70, n. 3, p. 172-184, 2015. DOI 10.14295/2238-6416.v70i3.403

Moura, K. S. A importância do conceito Clean Label no consumo de Leites Fermentados: uma pesquisa de mercado. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2022.

Nascimento, M. S.; Moreno, I.; Kuaye, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. Brazilian Journal of Food Technology, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

Nero, L. A.; De Mattos, M. R.; De Aguiar F. B.; Ortolani, M. B. T., Beloti, V.; De Melo F. B. D. G. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. In raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. Zoonoses and Public Health. v.55, p.299-305, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01130.x>

Nogueira, M. D.; Silva, R. N. D. Os potenciais efeitos da Caseína A1 na microbiota intestinal: uma revisão integrativa. 2022.

OGAKI, M. B.; Furlaneto, M. C.; Maia, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015.

Ortolani, M. B. T.; Yamazi, A. K.; Moraes, P. M.; Vicoso, G. N.; Nero, L. A. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. Foodborne pathogens and disease, v. 7, n. 2, p. 175-180, 2010.

Palma, J. M. Detecção e caracterização de marcadores de virulência e perfil de resistência antimicrobiana em *Escherichia coli* isoladas de ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves no estado do Goiás e Distrito Federal. 2020. Tese de Doutorado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/40237>.

Park, K. M.; Yoon, S. G.; Choi, T. H.; Kim, H. J.; Park, K. J.; Koo, M. The bactericidal effect of a combination of food-grade compounds and their application as alternative antibacterial agents for food contact surfaces. Foods, v. 9, n. 1, p. 59, 2020.

Peixoto, M. R. Levantamento de produtos probióticos caprinos disponíveis no mercado nacional e varejista de São Pedro da Aldeia-RJ e triagem de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de cabra. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Nutrição) - Instituto de Alimentação e Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2021.

Peralta, I. C.; Bertel, S. G.; Montoya, V. S. Impacto de las bacteriocinas, bactéria como preservantes em la indústria de alimentos. *Revista Teoría y Praxis Investigativa*, v. 4, n. 2, p. 27-31, 2009.

Rahimi Z.; Gholami M.; Yari K. Evaluation of beta-casein locus for detection of A1 and A2 alleles frequency using allele specific PCR in native cattle of Kermanshah, Iran. *Biharean Biologist*, v. 9, 2015.

Ribeiro, J. L. Avaliação do potencial tecnológico e antagonista das bactérias ácido lácticas isoladas no leite de búfala. 2018. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2019.

Rotta, I. S.; da Matta, M. F.; dos Santos, C. T. B.; Paiva, A. D.; Machado, A. B. F. Bactérias do ácido láctico potencialmente probióticas isoladas de leite não pasteurizado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 75, n. 3, p. 178-189, 2020.

Santos, B. B. dos; FRANCO, F. L. S.; Marques F. W. C. Uso de lasalocida sódica em rebanhos leiteiros - revisão bibliográfica. *Recital - Revista de Educação, Ciência e Tecnologia de Almenara/MG*, v. 2, n. 3, p. 10–17, 2021. DOI: 10.46636/recital.v2i3.115.

Schlottfeldt, C. L. Microbiota láctica de leites pasteurizados: caracterização e avaliação do potencial antagonista contra *Staphylococcus aureus*. 2019. Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Sun, Z.; Harris, H. M. B.; Mccann, A.; Guo, C.; Argim'On, S.; Zhang, W.; Yang, X.; Jeffery, I. B.; Cooney, J. C.; Kagawa, T. F.; Liu, W.; Song, Y.; Salvetti, E.; Wrobel, A.; Rasinkangas, P.; Parkhill, J.; Rea, M. C. Osullivan, O.; Ritari, J.; Otooole, P. W. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature communications*, v. 6, n. 1, p. 8322, 2015.

Sharma, V.; Sharma, N.; Jawed, B.; Nautiyal, S. C.; Singh, R.; Veena. High resolution melt curve analysis for the detection of A1, A2 β -casein variants in Indian cows. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, v. 3, n. 1, p. 144-148, 2013.

Sharma, R.; Garg, P.; Kumar, P.; Bhatia, S. K.; Kulshrestha, S. Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. *Fermentation*, v. 6, n. 4, p. 106, 2020.

Sharma, A.; Lavania, M.; Singh, R.; Lal, B. Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 28, n. 3, p. 1622-1632, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.062>.

Sperry, M. F.; Silva, H. L. A.; Balthazar, C. F.; Esmerino, E. A.; Verruck, S.; Prudencio, E. S.; Neto, R. P. C.; Tavares, M. I. B.; Peixoto, J. C.; Nazzaro, F.; Rocha, R. S.; Moraes, J.; Gomes, A. S. G.; Raices, R. S. L.; Silva, M. C.; Granato, D.; Pimentel, T. C. Freitas, M. Q.; Cruz, A. G. Probiotic Minas Frescal cheese added with *L. casei* 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women – a randomized double-blind pilot trial. *Journal of Functional Foods*, v. 45, p. 435-443, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.015>

Todorov, S. D.; Furtado, D. N.; Saad, S. M. I. Tome, E.; Franco, B. D. G. D. M. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, v. 110, n. 4, p. 971-986, 2011.

Tulini, F. L.; Hymery, N.; Haertlé, T.; Le Blay, G.; De Martinis, E. C. Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. *Journal of Dairy Research*, v. 83, n. 1, p. 115-124, 2016.

Tsuda, H.; Kodama, K. Evaluating the technological properties of lactic acid bacteria in Wagyu cattle milk. *Journal of Dairy Research*, v. 88, n. 2, p. 210-216, 2021.

Vieco-Saiz, N.; Belguesmia, Y.; Raspoet, R.; Auclair, E.; Gancel, F.; Kempf, I.; Drider, D. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 57, 2019.

Widyastuti, Y.; Febrisiantosa, A. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, v. 2014, 2014.

Ximenes, Cindy Anne Klausberger. Proteína alergênica do leite: estudo exploratório sobre a β -Caseína A1 e A2 em búfalos leiteiros. 2019.

Yerlikaya, O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 221-229, 2014. <https://doi.org/10.1590/fst.2014.0050>.

Wang, Y.; Wu, J.; Lv, M.; Shao, Z.; Hungwe, M.; Wang, J.; Geng, W. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 9, p. 612285, 2021.

Zheng, Y.; Lu, Y.; Wang, J.; Yang, L.; Pan, C.; Huang, Y. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69868, 2013 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069868>

CAPÍTULO II - POTENCIAL TECNOLÓGICO E PROBIÓTICO DA MICROBIOTA DE LEITE A2A2 DE VACAS JERSEY.

RESUMO

Objetivou-se fazer a seleção de Bactérias do Ácido Láticas (BAL) autóctones de leite com potencial tecnológico e probiótico. Foram coletadas 7 amostras de leite de conjunto cru, refrigerado em tanque de resfriamento de vacas da raça Jersey com genótipo A2A2, em uma pequena propriedade produtora de leite situada em Cidade Ocidental – GO e encaminhadas para o laboratório de microbiologia do Instituto Federal Goiano, no Campus Rio Verde. As análises foram desenvolvidas através da caracterização morfológica e teste de catalase, da microbiota láctica presente nas amostras de leite, além de determinar as propriedades tecnológicas (capacidade de acidificação, atividade proteolítica extracelular, produção de exopolissacarídeos, produção de diacetil, resistência em diferentes valores de pH e concentrações de bile). Obteve-se valores médios de $3,2 \times 10^5$ UFC/mL de BALs. Dos 124 isolados, 44% apresentaram características morfológicas de BALs, sendo 45% com morfologia de cocos, 29% cocobacilos e 26% de bacilos. Quanto a formação de halos de inibição, observou-se de 2mm a 6mm nos testes com bactérias Gram-negativas (*S. Enteritidis* e *E. Coli*), enquanto para bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e cepa controle *L. sakei*) obteve-se frequências menores para halos de 2mm a 6mm de diâmetro. Para todos os microrganismos alvo, os halos menos ocorrentes foram de 12-16mm e >20mm, sendo que os halos >20mm foram mais frequentes para *S. aureus* e *E. Coli*. Os resultados obtidos na avaliação da capacidade de acidificação demonstraram, que 7% das cepas (C.1; C.7; C.8; e C.11) demonstram a capacidade de acidificação abaixo de pH 6, variando entre 5,19 e 5,85 em até 6 horas de incubação. Já para pH < 5, 22% das cepas foram capazes de acidificação após 24 horas de incubação, sendo a capacidade que resultasse em pH menor de 4.6 observados nas cepas (C.7; C. 6; C.8; C.11; C.16; C.38; C.39 e C.43), com pH 4.58; 4,52; 4,44; 4,56; 4.59; 4.58; 4.59; 4.57, respectivamente. A atividade proteolítica foi observada em 20% cepas (C. 1; C.7; C.8; C.9; C.11; C.12; C.13; C.23; C.29; C.43; C.47). Nenhuma das cepas testadas foram capazes de produzir exopolissacarídeos a partir da lactose, sendo consideradas EPS negativas. Por outro lado, 13% apresentaram a capacidade de produzir diacetil. Em relação a avaliação da capacidade de desenvolvimento em diferentes valores de pH, 58% das cepas apresentaram a viabilidade em pH ácido (1 a 3), e apenas 33%, apresentaram viabilidade durante às 12 horas de avaliação. Para a capacidade de resistência as concentrações de sais biliares, 41% foram capazes de resistir as concentrações de 1% e 2% de concentração de sais biliares, mas não em todo o período de avaliação. Três isolados que mais demonstraram atributos nas avaliações, foram identificados por meio de sequenciamento do gene codificador do RNA ribossomal do gene 16S, sendo os gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc mesenteroides* identificados. Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que a microbiota láctica do leite A2A2 de vacas Jersey apresenta potencial tecnológico e probiótico. Portanto, a pesquisa e o desenvolvimento da microbiota do leite A2A2 podem oferecer oportunidades para a indústria de laticínios proporcionando melhorias, qualidade do leite e aumento na lucratividade.

Palavra-chave: Bactérias probióticas. Indústria de alimentos. *Lactobacillus*. *Leuconostoc*.

TECHNOLOGICAL AND PROBIOTIC POTENTIAL OF THE A2A2 MILK MICROBIOTA FROM JERSEY COWS

ABSTRACT

The objective was to select indigenous lactic acid bacteria (LAB) from milk with technological and probiotic potential. A total of 7 samples of raw milk were collected, refrigerated in a cooling tank from Jersey cows with genotype A2A2, on a small milk producing property located in Cidade Oeste – GO and sent to the microbiology laboratory of the Institute Federal Goiano, in Rio Verde Campus. The analyzes were developed through morphological characterization and catalase testing, of the lactic microbiota present in the milk samples, in addition to determining the technological properties (acidification capacity, extracellular proteolytic activity, production of exopolysaccharides, production of diacetyl, resistance at different values of pH and bile concentrations). Average values of 3.2×10^5 CFU/mL of BALs were obtained. Of the 124 isolates, 44% showed morphological characteristics of LABs, with 45% having the morphology of cocci, 29% coccobacilli and 26% bacilli. Regarding the formation of inhibition halos, it was observed from 2mm to 6mm in tests with Gram-negative bacteria (*S. Enteritidis* and *E. Coli*), while for Gram-positive bacteria (*S. aureus* and control strain *L. sakei*) lower frequencies were obtained for halos from 2mm to 6mm in diameter. For all target microorganisms, the least common halos were 12-16mm and >20mm, with halos >20mm being more frequent for *S. aureus* and *E. Coli*. The results obtained in the evaluation of the acidification capacity demonstrated that 7% of the strains (C.1; C.7; C.8; and C.11) demonstrated the acidification capacity below pH 6, varying between 5.19 and 5.85 within 6 hours of incubation. For pH < 5, 22% of the strains were capable of acidification after 24 hours of incubation, with the capacity resulting in a pH lower than 4.6 observed in the strains (C.7; C. 6; C.8; C.11; C.16; C.38; C.39 and C.43), with pH 4.58; 4.52; 4.44; 4.56; 4.59; 4.58; 4.59; 4.57, respectively. Proteolytic activity was observed in 20% strains (C. 1; C.7; C.8; C.9; C.11; C.12; C.13; C.23; C.29; C.43; C.47). None of the strains tested were capable of producing exopolysaccharides from lactose, being considered EPS negative. On the other hand, 13% showed the ability to produce diacetyl. Regarding the evaluation of the development capacity at different pH values, 58% of the strains showed viability at acidic pH (1 to 3), where only 33% showed viability during the 12 hours of evaluation. For the ability to resist bile salt concentrations, 41% were able to resist concentrations of 1% and 2% of bile salt concentrations, but not throughout the evaluation period. Three isolates that demonstrated the most attributes in the evaluations were identified through sequencing of the gene encoding the 16S ribosomal RNA, with the genera *Lactobacillus* and *Leuconostoc mesenteroides* identified. The results obtained in this research demonstrated that the lactic microbiota of A2A2 milk from Jersey cows has technological and probiotic potential. Therefore, research and development of the A2A2 milk microbiota can offer opportunities for the dairy industry to improve milk quality and increase profitability.

Keywords: Probiotic bacteria. Food industry. *Lactobacillus*. *Leuconostoc*.

1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado um dos alimentos básicos da dieta pelo alto valor nutricional. É o primeiro alimento empregado entre os mamíferos, fornecendo toda a energia e nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento em seus primeiros períodos de vida. A ingestão de leite cessa após o desmame em todos os mamíferos, exceto nos humanos, que continuam a consumi-lo na idade adulta, não apenas como leite, mas também como produtos lácteos (FERNANDEZ-RICO *et al.*, 2022).

O aumento expressivo do consumo de leite proveniente de vacas que produzem de maneira exclusiva os alelos A2 da β -caseína é concreto e tem recebido cada vez mais ênfase em âmbito mundial. Muitos países já regulamentaram o produto, que é conhecido na cultura popular de “Leite A2A2”, e diferentes indústrias têm oferecido para o consumidor essa opção (ARAGON, 2020).

Muitas características da proteína do leite são consequência de polimorfismos genéticos das vacas leiteiras, razão pela qual existem interessados em melhorar a produção de leite na indústria de laticínios e melhorar os rebanhos bovinos (FERNANDEZ-RICO *et al.*, 2022). A composição proteica explica muita das aplicações do leite na indústria, além de seu valor nutricional. Tem na sua composição aproximadamente 87% de água, 3% de proteínas, 3 a 4% de gorduras, 4 a 5 % de carboidrato (lactose), 0,1% de vitaminas e 0,8% de sais minerais, além de aminoácidos essenciais, sendo, um alimento de alto valor biológico (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2020).

Todavia, as implicações relacionadas à saúde da ingestão do leite de vaca também têm sido à base de estudos epidemiológicos recentes. Atualmente, cerca de 20% a 25% da população mundial apresenta algum agravo digestivo após o consumo de leite e seus derivados. Contudo, estima-se que somente 5% da população possuem intolerância à lactose. Diferentes pesquisas apontam que um percentual muito menor de consumidores de produtos à base de leite produzidos por vacas da raça Jersey apresenta esse tipo de problema (ARAGON, 2020).

Sabe-se que é na microbiota intestinal que os nutrientes que são ingeridos na alimentação são convertidos em produtos metabólicos que poderão afetar a saúde do intestino e por consequência a saúde do indivíduo. A dieta está associada de forma direta na integridade da mucosa do intestino e no equilíbrio da microbiota, visto, quando essa estabilização se rompe, pode ser instalado um quadro de disbiose intestinal (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Para tanto, levando em consideração o significado do leite para a nutrição e colonização por microrganismos do intestino de seres humanos, torna-se imperiosa a investigação do potencial biotecnológico da microbiota.

Desse modo, essa pesquisa teve como objetivo, caracterizar a microbiota láctica do leite A2A2 de vacas Jersey de uma propriedade rural situada em Cidade Ocidental -GO e avaliar o seu potencial antagonista frente a cepas patogênicas (*S. Enteritidis*, *E. coli* e *S. aureus*), tecnológico (capacidade de acidificação, atividade proteolítica, formação exopolissacarídeos e produção de diacetil) e probiótico, quanto ao seu desenvolvimento em diferentes valores de pH e concentrações de bile, além de determinar a diversidade genética da microbiota láctica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e coleta de amostras

As amostras foram coletadas de leite de conjunto cru, refrigerado em tanque de resfriamento, em uma pequena propriedade produtora de leite situada em Cidade Ocidental (16°06'08.2"S 47°47'03.1"W), região leste do estado de Goiás, sendo uma região que predomina o cerrado com tipologia climática tropical, com invernos secos e verões chuvosos. A propriedade de 30 hectares produz cerca de 200 litros de leite/dia de cerca de 15 animais da raça Jersey com genótipo A2A2 com idades entre 3 e 9 anos, alimentados em pasto, com média anual de 80.000 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Sete amostras foram coletadas ao longo de 5 meses em frascos estéreis e mantidas sob refrigeração acondicionadas em caixas térmicas e encaminhadas para o laboratório de microbiologia aplicada do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, para a realização das análises.

2.2 Isolamento de bactérias ácido lácticas

As amostras foram submetidas a diluições seriadas decimal (1:10), em solução salina NaCl 0,85%. As diluições foram semeadas em duplicatas por técnica de profundidade, em ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS ágar, Merck, Darmstadt, Germany) e incubadas a 35°C por 72 horas em jarra com gerador de anaerobiose (Jarra Anaeróbica PVC Branco, Permuton, A0400/JA0401) (NERO *et al.*, 2008; FERREIRA, 2017).

Após o período de incubação, as colônias foram selecionadas aleatoriamente

considerando a diversidade de colônias de BALs encontradas em cada placa e estriadas em novas placas contendo meio MRS, atingindo o total de 124 colônias que foram incubadas a 35° C por 48 horas. Após o período de incubação foram submetidas ao teste de catalase e coloração de Gram (RIBEIRO, 2019). No total 55 isolados com reação negativa ao teste de catalase, características morfológicas de cocos e bacilos foram selecionadas para os testes descritos no estudo, sendo armazenadas em ágar MRS sob temperatura de 4°C até o início da fase seguinte.

2.3 Potencial Antagonista

As 55 culturas isoladas de BAL foram testadas quanto ao potencial antagonista, sendo as cepas alvo: *Escherichia coli* (*E. coli*) em caldo EC BROTH (Himedia laboratories pvt. Ltd., Mumbai, Índia); *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) em água peptonada tamponada (Merck germany, USA); *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) em caldo infusão de cérebro e coração (BHI). Para o controle positivo, foi utilizado cepas de *Lactobacillus Sakei* 2^a (Lb Sakei), conhecida por ser produtora de bacteriocinas.

Quadro 2. Microrganismos indicadores utilizados na avaliação do potencial antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de cru bovino.

Microrganismos Indicadores	Procedência
<i>E. coli</i>	ATCC 22097
<i>S. aureus</i>	ATCC 25293
<i>S. enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>L. sakei</i>	2 ^a

As cepas alvo foram revitalizadas em meio Ágar Triptona de Soja (TSA), e cepa controle positivo em meio ágar MRS, sendo incubadas a 35°C por 24 horas. Após incubação, inóculos foram padronizados a 10⁸ UFC/mL, com NaCl 0,85%, de acordo com a escala nefelométrica de Mc Farland. As diluições seriadas decimais foram realizadas até 10⁵ nos respectivos caldos EC, água peptonada tamponada, BHI, e MRS de acordo com cada microrganismo.

As culturas foram submetidas ao protocolo *spot-on-the-lawn* (adaptada) para avaliação do perfil antagonista, que consistiu em inocular 20µL da cultura recuperada anteriormente em caldo MRS em placas contendo ágar MRS modificado com, 0,5% de

dextrose (Becton, Dickinson and company Sparks, USA), de forma que houvesse três pontos em cada placa de isolados e um ponto da *L. sakei* 2ª para o controle positivo. Após incubação de 35° C por 24 horas, cada placa recebeu uma sobrecamada de 8,0 mL dos inóculos com 10⁵ das cepas alvo em caldos EC, água peptonada, BHI, e MRS de acordo com a cepa, e 75% de meio semissólido, ágar bacteriológico (Himedia®).

Após a solidificação, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas, posteriormente sendo avaliadas quanto à formação de halos de inibição ao redor das colônias de BAL semeadas. Foram mensurados os diâmetros dos halos de inibição a partir de 2mm com auxílio de paquímetro digital (Absolute). A presença de halos de inibição = ou >2mm foi registrada como atividade antimicrobiana do isolado testado (ORTOLANI, 2010; KOCH, 2014; RIBEIRO, 2019).

2.4 Avaliação do potencial tecnológico

Para esta etapa os isolados de BALs foram revitalizados em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (Kasvi®) e incubados a 35°C por 24 horas, para que na sequência fossem realizados os testes de avaliação.

2.4.1 Atividade acidificante (AA)

Consistiu em inocular 1% volume de soluto de cepas revitalizadas em tubos contendo 10 mL de leite em pó desnatado reconstituído estéril (10% peso/volume) que foram incubadas a 37°C. Sendo o pH aferido com 0, 6 e 24 horas com um medidor de pH digital de bancada (Mod. LUCA-210), sendo os dados expressos com média da duplicata de cada isolado (RIBEIRO, 2019).

2.4.2 Atividade proteolítica extracelular (APE)

Sendo realizada conforme Dal Bello *et al.* (2012) e Ribeiro (2019), utilizando 20 microlitros de cada cultura revitalizada anteriormente em caldo BHI e inoculadas sobre a superfície de ágar bacteriológico (Himedia®) a 2% preparado com 10% p/v de leite desnatado em pó (Molico®), e depois incubado a 37°C durante quatro dias. A APE foi considerada positiva pela formação de zonas claras ao redor das colônias.

2.4.3 Formação de exopolissacarídeos (EPS)

A produção de EPS a partir da lactose foi determinada conforme Cogan (1986); COSTA (2010); Dal Bello *et al.* (2012), com adaptações. A produção de EPS a partir de lactose foi determinada após as alíquotas de cada cultura serem inoculadas em tubos contendo 10 ml leite desnatado em pó reconstituído (10% p/v), sendo incubadas a 37°C por 24 horas. A cultura seria considerada positiva de forma qualitativa (positivo ou negativo) para EPS se após coagulação formasse em uma espécie de fio viscoso.

2.4.4 Produção de diacetil (PD)

Para a avaliação da produção de diacetil, as estirpes revitalizadas (1% p/v) foram inoculadas em 10 mL de MRS e incubada a 37°C durante 24 horas. 1 ml de cada suspensão de células foi combinado com 0,5 mL de α -naftol (1% p/v) e KOH (16% p/v) e incubado a 37°C durante 10 minutos. A produção de diacetil foi indicada pela formação de um anel vermelho no topo dos tubos (DAL BELLO *et al.*, 2012); (RIBEIRO, 2019).

2.5 Potencial probiótico

2.5.1 Desenvolvimento em diferentes valores de pH

A simulação *in vitro* de resistência aos diferentes valores de pH para simulação de resistência ao ácido clorídrico, foi determinada conforme Dal Bello *et al.* (2012); Ribeiro (2019) com adaptações. Foram inoculados 66 μ L de cepas que estavam revitalizadas em caldo MRS, em tubos contendo 1,0 mL de solução salina fosfatada, composta por cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato dissódico, fosfato de potássio monobásico e ácido clorídrico, ajustados para pH 1, pH 2, pH 3, pH 7, pH 8 e pH 12, utilizando o ácido clorídrico 1N e o hidróxido de sódio 0,5M para ajustes do pH. Cada inóculo foi submetido à microplaca de microtitulação de 96 poços estéril (Olen® K30-5096U), e cada microtubo foi preenchido com 160 μ L de cada inóculo e avaliado por um período de 12 horas, através de leitor de MicroPlaca (Molecular Devices Versa Max), com densidade óptica (DO) de 640nm a 37°C.

2.5.2 Desenvolvimento em diferentes concentrações de bile

Para esta etapa foram inoculados 66 µL da cultura obtida com caldo MRS, em microtubos contendo 1,0mL do caldo MRS suplementado com sais biliares Oxbile (Oxgall) (Sinergia Científica) ajustados para 0,2%; 0,3%; 1% e 2%, e em seguida transferido 160 µL dos isolados para as mesmas microplacas (96 poços) estéreis. Após foram submetidas a leitor de MicroPlaca (Molecular Devices Versa Max), sendo a absorbância do cultivo determinada pela leitura de DO de 640nm a 37°C a cada 1 hora, durante 10 horas. Como controle negativo culturas cultivadas em caldo MRS foram utilizadas. Os experimentos foram realizados em duplicatas (TODOROV *et. al.*, 2011; RIBEIRO, 2019).

2.6 Sequenciamento

Após os testes e avaliações, 3 isolados de BALs que mais demonstraram potencial tecnológico e probiótico foram selecionadas para a realização do sequenciamento genético. Os isolados foram estriados em placas de Petri em meio MRS e enviados para a empresa Imunova Análises Biológicas LTDA, em Curitiba - Paraná.

As sequências de DNA bacteriano foram analisadas através de um pipeline tecnológico passando por duas etapas, sequenciamento do DNA e as etapas computacionais. A identificação das bactérias foi realizada por sequenciamento de genes específicos, pela técnica de Sanger, modificada (HEINER *et al.*, 1998). Para análise, o produto do sequenciamento foi convertido no seu equivalente reverso e complementar, e então as sequências obtidas foram alinhadas utilizando o software MegaX (versão 10.0.5, 2019). As sequências obtidas após o alinhamento foram então comparadas com sequências disponíveis no Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (NCBI, National Center for Biotechnology Information) através da ferramenta BLASTn®.

3. RESULTADOS

Potencial antagonista

Das 7 amostras coletadas de leite *in natura* obteve-se valores médios de $3,2 \times 10^5$ UFC/mL de BALs. Dos 124 isolados, 55 (44%) apresentaram características morfológicas de BALs, sendo reação ao teste de catalase negativa e coloração de Gram-positiva. Das 55 denominadas BALs, 25 (45%) com morfologia de cocos, 16 (29%) cocobacilos e 14 (26%) de bacilos.

Na tabela 2 é possível observar que dos 55 isolados de BALs 85,45% (47/55) apresentaram halos ≥ 2 mm, frente a bactéria Gram-negativa (*E. coli*) e (*S. Enteritidis*), enquanto 83,64% (46/55) frente a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e 80% (44/55) frente a cepa de *L. sakei*.

Tabela 2. Frequência do potencial antagonista (halo ≥ 2 mm) de 55 isolados de BALs proveniente de leite de A2A2 de vacas Jersey, frente a microrganismos patogênicos.

Microrganismo	n= 55	%
<i>Escherichia coli 22097</i>	47	85,45%
<i>Salmonella enteritidis ATCC 13076</i>	47	85,45%
<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	46	83,64%
<i>Lactobacillus sakei 2^a</i>	44	80,00%

Nota: (n) número de isolados e porcentagem de inibição a cepas alvo.

Os isolados de BALs foram categorizados de acordo com o diâmetro do halo de inibição formado para cada patógeno testado. Na tabela 3 observou-se que maior quantidade de isolados de BALs tiveram formação de halos de inibição de 2mm a 6mm nos testes com bactérias Gram-negativas (*S. Enteritidis* e *E. Coli*), enquanto bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e cepa controle *L. sakei*) obtiveram frequências menores para halos de 2mm a 6mm de diâmetro; os halos menos ocorrentes foram de 12-16mm e >20 mm para todos os microrganismos alvo. Halos >20 mm foram mais frequentes para *S. aureus* e *E. Coli*.

Tabela 3. Diâmetro médio de halos produzidos por 55 isolados de BALs frente a microrganismos patogênicos.

Microrganismo Alvo	<2mm	2-6mm	7-11mm	12-16mm	>20mm
	%	%	%	%	%
<i>Escherichia coli 22097</i>	14,55	54,55	25,45	0,00	5,45
<i>Salmonella enteritidis ATCC 13076</i>	14,55	58,18	21,82	1,82	3,64
<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	16,36	52,73	21,82	1,82	7,27
<i>Lactobacillus sakei 2^a</i>	20,00	50,91	27,27	0,00	1,82

Nota: <2 mm considerado negativo; >2 mm registrada como atividade antimicrobiana.

Com relação à frequência da morfologia dos isolados que apresentaram potencial antagonista frente aos patógenos, na tabela 4 observa-se que a partir dos 55 isolados que demonstraram potencial de inibição frente *E. coli*, 46,81% (22/55) eram cocos, 27,66% (13/55) cocobacilos e 25,53% (12/55) bacilos; frente a *S. Enteritidis* 48,98% (23/55) cocos, 25,53% (12/55) cocobacilos e 25,53% (12/55) bacilos; frente a *S. aureus* 47,83% (22/55) cocos, 28,26% (13/55) cocobacilos e 29,55 (13/55) bacilos.

Tabela 4. Frequência das características morfológicas dos isolados de BALs que apresentaram potencial antagonista frente aos patógenos testados.

Microrganismos	% Cocos	% Cocobacilos	% Bacilos
<i>Escherichia coli</i> 22097	46,81	27,66	25,53
<i>Salmonella</i> Enteritidis			
ATCC 13076	48,94	25,53	25,53
<i>Staphylococcus aureus</i>			
ATCC 25923	47,83	28,26	23,91
<i>Lactobacillus sakei</i> 2 ^a	40,91	29,55	29,55

Potencial tecnológico

Os resultados obtidos na avaliação da capacidade de acidificação demonstraram, conforme tabela 5, que dos 55 isolados, apenas 7% (4) cepas (C.1; C.7; C.8; e C.11) demonstram a capacidade de acidificação abaixo de pH 6, variando entre 5,19 e 5,85 em até 6 horas de incubação. Já para pH <5 observou-se que 22% (12/55) dos isolados foram capazes de acidificação após 24 horas de incubação, sendo a capacidade que resultasse em pH menor de 4.6 (ponto isoelétrico da caseína) observados nas cepas (C.7; C. 6; C.8; C.11; C.16; C.38; C.39 e C.43), com pH 4.58; 4,52; 4,44; 4,56; 4.59; 4.58; 4.59; 4.57, respectivamente.

Tabela 5. Resultados da avaliação das características tecnológicas de 55 isolados de bactérias ácido lácticas.

Isolados BALs	*Capacidade de acidificação (pH)			Potencial Tecnológico		
	0h	6h	24h	APE	EPS	Diacetil
C. 1	6,7	5,85	4,62	(+)	(-)	(-)
C. 2	6,7	6,55	5,71	(-)	(-)	(-)
C. 3	6,7	6,69	5,99	(-)	(-)	(-)
C. 4	6,7	6,67	5,76	(-)	(-)	(-)
C. 5	6,7	6,67	5,03	(-)	(-)	(-)
C. 6	6,7	6,65	4,58	(-)	(-)	(-)
C. 7	6,7	5,28	4,52	(+)	(-)	(+)
C. 8	6,7	5,19	4,44	(+)	(-)	(+)
C. 9	6,7	6,67	4,60	(+)	(-)	(-)
C. 10	6,7	6,67	5,10	(-)	(-)	(-)
C. 11	6,7	5,57	4,56	(+)	(-)	(+)
C. 12	6,7	6,28	5,65	(+)	(-)	(-)
C. 13	6,7	6,65	4,60	(+)	(-)	(+)
C. 14	6,7	6,54	5,42	(-)	(-)	(-)
C. 15	6,7	6,52	5,69	(-)	(-)	(-)
C. 16	6,7	6,69	4,59	(-)	(-)	(-)
C. 17	6,7	6,61	5,10	(-)	(-)	(-)
C. 18	6,7	6,37	5,83	(-)	(-)	(-)
C. 19	6,7	6,49	4,60	(-)	(-)	(-)
C. 20	6,7	6,39	5,55	(-)	(-)	(-)
C. 21	6,7	6,55	5,26	(-)	(-)	(-)
C. 22	6,7	6,69	5,00	(-)	(-)	(-)
C. 23	6,7	6,66	5,84	(+)	(-)	(-)
C. 24	6,7	6,54	5,20	(-)	(-)	(-)
C. 25	6,7	6,32	5,65	(-)	(-)	(-)
C. 26	6,7	6,21	5,71	(-)	(-)	(-)
C. 27	6,7	6,67	5,62	(-)	(-)	(-)
C. 28	6,7	6,45	5,54	(-)	(-)	(-)
C. 29	6,7	6,49	5,42	(+)	(-)	(-)
C. 30	6,7	6,39	5,69	(-)	(-)	(-)
C. 31	6,7	6,66	5,63	(-)	(-)	(-)
C. 32	6,7	6,28	5,10	(-)	(-)	(-)
C. 33	6,7	6,67	5,85	(-)	(-)	(-)
C. 34	6,7	6,12	5,52	(-)	(-)	(-)
C. 35	6,7	6,61	5,31	(-)	(-)	(-)
C. 36	6,7	6,45	5,26	(-)	(-)	(-)
C. 37	6,7	6,38	5,66	(-)	(-)	(-)

C. 38	6,7	6,48	4,58	(-)	(-)	(-)
C. 39	6,7	6,68	4,59	(-)	(-)	(-)
C. 40	6,7	6,45	5,42	(-)	(-)	(-)
C. 41	6,7	6,66	5,69	(-)	(-)	(-)
C. 42	6,7	6,63	5,65	(-)	(-)	(-)
C. 43	6,7	6,55	4,57	(+)	(-)	(-)
C. 44	6,7	6,48	5,54	(-)	(-)	(+)
C. 45	6,7	6,49	5,78	(-)	(-)	(-)
C. 46	6,7	6,37	5,10	(-)	(-)	(-)
C. 47	6,7	6,59	5,64	(+)	(-)	(+)
C. 48	6,7	6,58	5,42	(-)	(-)	(-)
C. 49	6,7	6,45	5,71	(-)	(-)	(-)
C. 50	6,7	6,45	5,10	(-)	(-)	(-)
C. 51	6,7	6,66	5,06	(-)	(-)	(-)
C. 52	6,7	6,48	5,55	(-)	(-)	(+)
C. 53	6,7	6,69	6,09	(-)	(-)	(-)
C. 54	6,7	6,66	5,21	(-)	(-)	(-)
C. 55	6,7	6,25	5,53	(-)	(-)	(-)

* Resultados expressos com médias das duplicatas de cada isolado.

Neste estudo, a atividade proteolítica foi observada em 20% (11) cepas (C. 1; C.7; C.8; C.9; C.11; C.12; C.13; C.23; C.29; C.43; C.47), sendo que 80% das cepas avaliadas não apresentaram atividade proteolítica extracelular (tabela 5). Conforme observado na tabela 5, nenhuma das cepas testadas foram capazes de produzir exopolissacarídeos a partir da lactose, sendo consideradas EPS negativas. Por outro lado, 13% (7) dos isolados apresentaram a capacidade de produzir diacetil.

Para a etapa seguinte, optou-se por avaliar as 12 cepas que mais apresentaram atributos nas avaliações tecnológicas, mostrando ser capazes de produzir atividade acidificante, e/ou atividade proteolítica extracelular, e/ou de produzir diacetil.

Tabela 6. Cepas de BALs selecionadas para etapa de potencial probiótico.

Isolados BALs	*Capacidade de acidificação (pH)			Potencial Tecnológico		
	0h	6h	24h	APE	EPS	*Diacetil
C. 1	6,7	5,85	4,62	(+)	(-)	(-)
C. 7	6,7	5,28	4,52	(+)	(-)	(+)
C. 8	6,7	5,19	4,44	(+)	(-)	(+)
C. 9	6,7	6,67	4,60	(+)	(-)	(-)

C. 11	6,7	5,57	4,56	(+)	(-)	(+)
C. 12	6,7	6,28	5,65	(+)	(-)	(-)
C. 13	6,7	6,65	4,60	(+)	(-)	(+)
C. 23	6,7	6,66	5,84	(+)	(-)	(-)
C. 29	6,7	6,49	5,42	(+)	(-)	(-)
C. 43	6,7	6,55	4,57	(+)	(-)	(-)
C. 47	6,7	6,59	5,64	(+)	(-)	(+)
C. 52	6,7	6,48	5,55	(-)	(-)	(+)

* Resultados expressos com médias das duplicatas de cada isolado.

Potencial probiótico

A avaliação da capacidade de desenvolvimento em diferentes valores de pH 58% (7/12) cepas apresentaram a viabilidade em pH ácido (1 a 3), mas sendo apenas 33% (4/12), que apresentaram viabilidade durante às 12 horas de avaliação, sendo as cepas (C.7; C.8; C.11 e C.43) as mais expressivas.

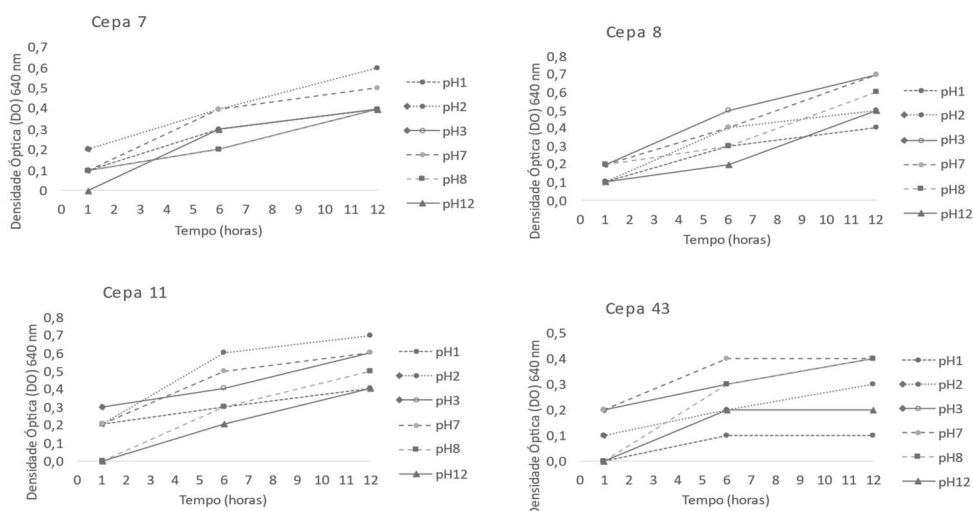


Figura 4. Comparação do desenvolvimento das cepas C.7, C.8, C.11 e C.43 em caldo MRS em pH 1,2,3,7,8,12, durante 12 horas. Cada resultado representa uma média de duas leituras.

Das 12 cepas selecionadas para esta etapa, 100% resistiram às concentrações de 0,2% e 0,3% durante o período de 10 horas de avaliação. Enquanto apenas 41% (5/12) foram capazes de resistirem as concentrações de 1% e 2%, mas não em todo o período de avaliação. Neste contexto, as cepas C.7; C.11 e C.47 conseguiram desenvolver no decorrer das 10 horas de avaliação, crescendo de forma semelhante ao controle.

Gilliland, Staley e Bush (1984) descreveram que para uma bactéria ser

considerada resistente à bile deve atingir a absorvância de 0,3 após seis horas de incubação com 0,3% de sais biliars. Utilizando de esse parâmetro, curvas de crescimento dos isolados na presença caldo MRS e simulações de bile, assim, como cepa controle, foram avaliadas ao nível de absorvância. Sendo abaixo os gráficos referentes à curva de crescimento das cepas isoladas que se desenvolveram em concentrações de bile.

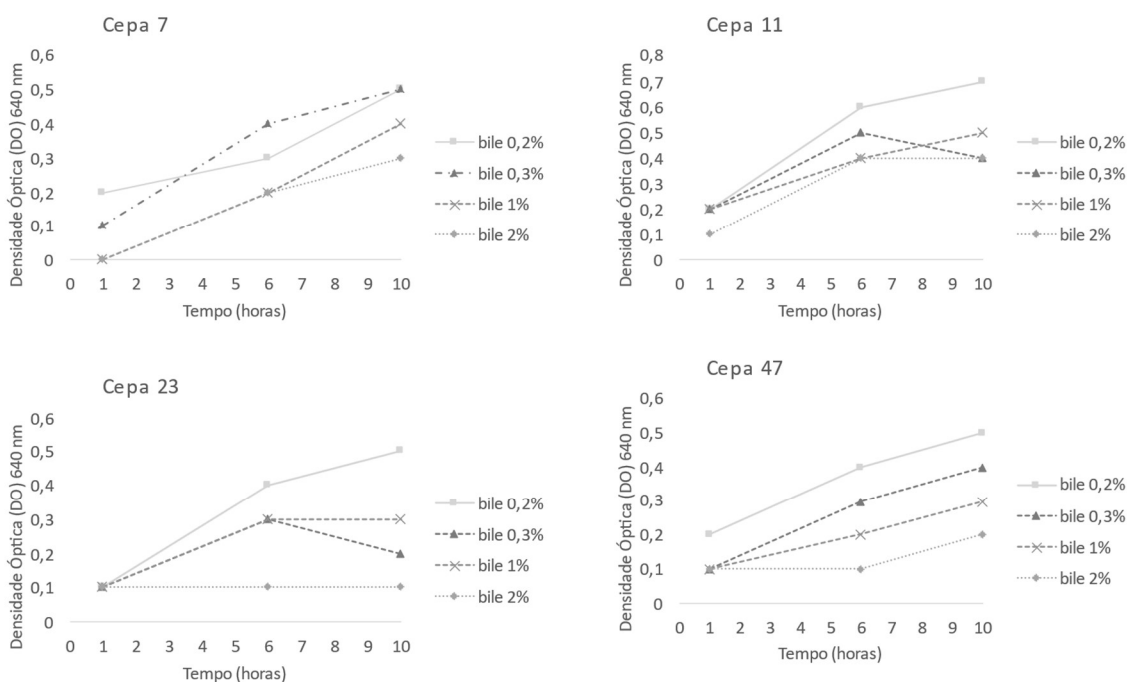


Figura 5. Comparação do desenvolvimento das cepas C.7, C.11, C.23 e C.47 em caldo MRS em concentrações de 0,2%, 0,3%, 1% e 2% de bile, durante 10 horas. Cada resultado representa uma média de duas leituras.

Sequenciamento

Três isolados seguiram para a identificação molecular, sendo os gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* identificados por meio de sequenciamento do gene codificador do RNA ribossomal do gene 16S. Na Tabela 7, estão os resultados do sequenciamento molecular da porção do gene 16S, em que foi possível identificar o gênero de 3 cepas e de 2 espécies. Para a amostra BALs A1 7726.2023 foi possível parear os resultados com bancos de dados apenas até nível de gênero, o qual foi *Lactobacillus* spp. Na caracterização ao nível de espécie, obteve incongruência dos resultados, e a cepa indicou similaridade com 2 espécies diferentes de *Lactobacillus* spp. (*L. casei* e *L. paracasei*) apresentando, entre si, similaridade filogenética de 99,85.

Tabela 7. Identificação molecular dos isolados de bactérias ácido-láticas provenientes de leite A2A2 de vacas Jersey.

Isolado	Identificação da amostra	Identificação da amostra
C.11	BALs A1 07726.2023	<i>Lactobacillus</i> spp.
C.7	BALs A2 07727.2023	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (1282/1282 pb)
C.8	BALs A3 07728.2023	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (1338/1339 pb)

4. DISCUSSÃO

Potencial antagonista

O estudo realizado por Schlottfedt (2019) observou a contagem média de BALs das mostras de leite pasteurizado de $1,5 \times 10^2$ UFC/mL e das amostras de leite pasteurizado tipo A de $1,3 \times 10^2$ UFC/mL, podendo ser o processo de pasteurização o responsável por resultados mais baixos que o observado nesta pesquisa. Já Ribeiro (2019), avaliando a microbiota de leite cru de búfalas observou contagem média de BALs de $4,67 \times 10^6$ UFC/mL, resultado acima do encontrado nesta pesquisa.

Quanto a caracterização morfológica a predominância de BALs caracterizadas com morfologia de cocos também foi observada por outros autores, sendo que Farahani (2017) e Ribeiro (2019) observaram que mais de 60% dos isolados eram cocos e menos de 2% de bacilos. No trabalho com leite pasteurizado Schlottfedt (2019), observou resultados semelhantes no que tange o isolamento de bacilos sendo 28,57% e 33,33% de bacilos isolados. Rotta (2020) isolando BALs de leite cru, também observou resultados parecidos, sendo que 23% dos isolados apresentaram-se como bacilos.

O leite apresenta enorme diversidade de bactérias, sejam elas benéficas ou não, e o que pode afetar essa diversidade são diversos fatores que vão desde a parte nutricional dos alimentos ofertados aos animais, ou até mesmo pela idade e ambiência dos animais (WENDLING E WESCHENFER, 2013).

Essas variações encontradas tanto nesta pesquisa quanto em outros experimentos mostram a grande diversidade da microbiota autóctone do leite em diferentes espécies e regiões diferentes.

No que se refere ao potencial antagonista, resultados menores foram observados por Giazzi (2017), ao estudar o potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de amostras de queijos e leite cru na região norte do estado do Paraná, em que, 50% (7/14) isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. Coli.* e 64% (9/14) apresentaram inibição contra *S. Enteritidis*.

Alexandre (2002) isolou 192 cepas de bactérias lácticas de cinco amostras de queijo de minas artesanal, oriundos da região do Serro, MG e observou que 25% (48/192) dos isolados foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de microrganismos indicadores, dentre eles 20,8% (10/48) das cepas, demonstraram amplo espectro frente a *S. Enteritidis* e *S. aureus*.

Diferentemente dos isolados formadores de halo de inibição frente à *E. coli*, analisados neste estudo, Alexandre (2002) observou que nenhuma das cepas isoladas foi capaz de inibir este microrganismo. Contudo, neste trabalho a observação foi que quase todos os isolados de BALs apresentaram potencial antagonista frente a todos os microrganismos alvo. Porém, não foram analisadas no presente estudo quais as substâncias segregadas por esses microrganismos que inibiram de forma efetiva microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, podendo ser por causa dos ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono, proteínas antimicrobianas sintetizadas, entre outros (FRANCO *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2008).

Na avaliação da formação de halos de inibição, resultados maiores do que os que encontrados nesta pesquisa foram descritos por Balduino *et al.*, (1999), que observaram a formação de halos de inibição por isolados de BALs medindo 7 e 8mm predominantemente. Duarte (2013), ao avaliar *in vitro* a atividade antagonista de cultura láctica observou que 20% (6/30) de seus isolados de BALs produziram halos de inibição de 10mm a 12mm frente a *E. coli*. Souza (2015) observou que 64% (36/56) de seus isolados de amostras de leite cru e queijo coalho apresentaram halos de inibição de até 21,5mm para *S. aureus* e halos de até 26,5mm para *E. coli*.

A atividade antagonista mesmo que não produzindo halos com tamanhos tão significativos quanto o descritos em outras pesquisas, deve ser considerada relevante, mesmo que a natureza das substâncias responsáveis pela inibição dos microrganismos alvos testados não tenha sido objeto de estudo dessa pesquisa.

Potencial tecnológico

Considera-se que a atividade acidificante é o resultado da capacidade de redução do pH, que colabora na produção de derivados contribuindo em texturas das massas e desenvolvimento dos sabores dos queijos. Porque a caseína que é uma proteína presente no leite possui o mesmo número de cargas positivas e negativas num valor de pH perto de 4,6 (RIBEIRO, 2019).

Quando o ponto isoelétrico (4,6) das caseínas é alcançado, a coagulação ocorre como resultado da formação de uma rede tridimensional composta por aglomerados e cadeias de caseínas (De Moura *et al.*, 2016). Nessas circunstâncias ocorre a precipitação, que resulta no fenômeno da coagulação do leite, essencial para a produção de derivados lácteos, principalmente queijos.

A função acidificante é a propriedade metabólica mais procurada das bactérias lácticas utilizadas na indústria alimentícia. Manifesta-se na produção de ácido lático a partir da fermentação de carboidratos durante o crescimento bacteriano (MARYAM, 2017).

Resultados semelhantes a esta pesquisa foram observados por Ribeiro (2019) com avaliação de leite de búfalas, que após seis horas de incubação dos isolados 84JL e 165JL ocorreu a diminuição do pH para 5,69 e 5,67, respectivamente, e após 24 horas para 4,48 e 4,5, sendo a acidificação de pH observada também após 24 horas.

A capacidade de acidificação mais demorada também foi realizada no estudo de Fernandes *et al.* (2018) em que seis isolados do gênero *Pediococcus*, também não observaram redução do pH nas 6 primeiras horas, observando o menor valor de pH de 6,19. Já em pesquisa realizada por Leonarski, (2016), 5 isolados de BALS isolados de leite orgânico destacaram-se na capacidade de acidificação, principalmente nas primeiras horas de fermentação, e muitas alcançaram o pH de 4,6 nos tempos de 6 e 8 horas.

A atividade proteolítica extracelular consiste na ação de proteinases e peptidases, que hidrolisam a caseína em pequenos peptídeos e aminoácidos. A ação de enzimas proteolíticas são de grande importância durante a maturação de queijos, em razão dos compostos aromáticos que são gerados, influenciando nas características organolépticas, contribuindo, também, na avaliação do estado de conservação (PERIN *et al.*, 2017; FREIRE, 2021).

Em concordância Dias *et al.* (2019) referem que a atividade proteolítica é uma propriedade essencial para culturas *starter*. O sistema proteolítico das BALs favorece o crescimento no leite para a degradação de caseínas e peptídeos, levando a produção de

aminoácidos livres, precursores de aroma e formação de sabor na fermentação de produtos lácteos e maturação de queijos.

Segundo pesquisa desenvolvida por Toe *et al.* (2019) as atividades proteolíticas extracelulares das BALs podem ser uma ferramenta vital para hidrolisar moléculas de proteínas extracelulares em aminoácidos livres, exibindo grande potencial para a produção funcional de aminoácidos. Muitos estudos concluíram que o sistema proteolítico das BALs é importante tanto na utilização de proteínas e peptídeos para o crescimento quanto no processo de maturação do leite em produtos lácteos.

Na presente pesquisa demonstrou que a atividade proteolítica foi observada apenas em 20%, das cepas avaliadas. Na pesquisa realizada por Lima *et al.* (2019) com o propósito de explorar a atividade proteolítica extracelular de 17 BALs isoladas de vários alimentos fermentados da Malásia. Os resultados obtidos revelaram que todos os isolados de BALs estudados foram capazes de produzir zona de hidrólise clara, mostrando-se capazes de produzir e secretar enzimas proteolíticas extracelulares.

Com vistas a avaliar o efeito dos graus de proteólise e atividade proteolítica de leite UHT integral, durante o período de armazenamento, Pinto *et al.* (2016) avaliaram que o tratamento UHT reduziu 93,2% da atividade proteolítica em relação ao leite cru. E, ao longo do período de estocagem do leite UHT integral ocorreu o aumento do grau de proteólise e da atividade proteolítica.

O crescimento até densidades celulares permitindo que as bactérias lácticas desempenhem funções de fermentação, depende de um sistema proteolítico capaz de satisfazer todas as necessidades de aminoácidos, através da hidrólise de proteínas. A quantidade disponível de tais compostos no ambiente natural é geralmente pequena, portanto, a principal função destas enzimas é a hidrólise de proteínas em componentes absorvidos pelas células bacterianas (FREIRE, 2021; KIELISZEK *et al.*, 2021).

Tratando-se dos exopolissacarídeos microbianos (EPS) sintetizados pelas BAL, eles desempenham papel importante na produção de lácteos fermentados. São usados em ampla variedade de aplicações industriais, incluindo alimentos, emulsificantes, estabilizantes. A produção EPS é um recurso utilizado pelas indústrias com a finalidade de aumentar a viscosidade de derivados lácteos, em especial de leites fermentados e iogurtes, substituindo amidos modificados quimicamente e gordura do leite em derivados lácteos comerciais, além da finalidade de agregação de células bacterianas, adesão a superfícies, formação de flocos, elementos estruturais de biofilmes, formação de uma barreira protetora para células e retenção de água para minimizar a dessecação celular

(SARAVANAN *et al.*, 2017; SOLMAZ *et al.*, 2018).

No presente estudo nenhum dos isolados foi capaz de produzir EPS. Esse achado tem semelhança com o estudo de Perin *et al.* (2017) que realizou o teste com 56 isolados de *Enterococcus* e *Lactococcus* de leite cru de cabras. E, Fernandes *et al.* (2018) que avaliaram seis isolados de *Pediococcus pentosaceus* em leite cru de ovelhas, e não observaram a produção de EPS. No estudo de Dal Bello *et al.* (2012) que avaliaram 20 cepas, foi determinado de forma qualitativa que todas eram EPS negativas

Todavia, conforme Solmaz *et al.* (2018) referem que os polissacarídeos extracelulares (EPS) são secretados por microrganismos, sendo responsáveis pela proteção contra substâncias antimicrobianas, bacteriófagos, estresse osmótico. A sua síntese é favorecida por estresses ambientais de microrganismos e constituem a maior parte das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por microrganismos.

Segundo Bastos *et al.* (2022) o diacetil é um dos metabólitos produzidos pelas BALs, que se destaca por seu potencial aromático, estando sua produção ligada à característica intrínseca de algumas bactérias em metabolizar o citrato. Além da capacidade de flavor, o composto possui a capacidade de inibir o desenvolvimento de alguns microrganismos, atuando diretamente nas funções vitais. Trata-se de um composto natural volátil que é amplamente utilizado na indústria de alimentos, pois proporciona textura cremosa e aroma amanteigado, característico de alguns queijos. (PERIN *et al.*, 2017).

Diferentemente desta pesquisa, Dal Bello *et al.* (2012) entre os vinte *L. lactis* testados, 35% dos isolados foram capazes de produzir altos níveis de diacetil. Em Ribeiro (2019), 32,1% dos isolados apresentaram a habilidade em produzir diacetil sendo eles *E. durans*; *E. faecalis*; *L. rhamnosus* e *L. lactis*. O estudo de Perin *et al.* (2017), que observaram que a maioria dos isolados de *Enterococcus* provenientes de leite cru de cabras foram capazes de produzir diacetil.

A produção de diacetil é considerada cultura-dependente porque nem todas BALs têm capacidade de metabolizar o citrato, portanto esse comportamento pode diferir entre as espécies e as culturas (PERIN *et al.*, 2017).

Potencial probiótico

Ademais, para que um microrganismo seja considerado um bom probiótico é necessário que apresente características desejáveis para a segurança, funcionalidade e uso tecnológico. Quando se trata de características probióticas os isolados devem possuir alta

tolerância a condições ácidas do hospedeiro, capacidade de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal, e o pH varia entre 1,5 e 2,0 (BAUTISTA-GALLEGO *et al.*, 2013); (FERNANDES *et al.*, 2018).

Nesse estudo, na avaliação da capacidade de desenvolvimento em diferentes valores de pH 58% das cepas apresentaram a viabilidade em pH ácido (1 a 3), sendo que apenas 33%, tiveram viabilidade durante às 12 horas de avaliação. Na pesquisa de Ribeiro (2019) observou-se que 50% dos isolados apresentaram viabilidade em pH ácido (de 1 a 3) durante o período de avaliação de 1 a 13 horas sendo *E. durans*; *E. faecalis*; *L. lactis*; *P. acidilactici* e *W. thailandensis*.

Segundo Gilliland (1984) considera-se que para uma bactéria ser considerada resistente à bile ela deve apresentar DO $\geq 0,3$ (640nm) após seis horas de incubação com 0,3% de sais biliares. Nessa pesquisa as 12 cepas selecionadas para esta etapa resistiram às concentrações de 0,2% e 0,3% durante o período de 10 horas de avaliação.

Em Ribeiro (2019) observou-se desenvolvimento de 60,71% isolados BALs na concentração de 0,3% de bile; 57,14% em bile a 1,0%; e 60,71% em concentração de 2,0%, em todos os tempos avaliados. Nessa última concentração, os isolados *E. dispar*; *E. durans*; *E. faecalis*; *L. lactis*; *P. acidilactici* e *W. paramesenteroides* foram os que apresentaram desenvolvimento mais expressivo.

Os sais biliares secretados para o intestino delgado também podem representar grande desafio para a sobrevivência bacteriana, portanto, é importante a seleção de isolados probióticos que apresentam resistência a altas concentrações de bile, visto que elas têm capacidade de desenvolver no intestino delgado de forma adequada. Estima-se que a existência de uma resistência a ácidos e tolerância a sais biliares são ponderados como os critérios basilares para a triagem de potenciais estirpes com intuítos probióticas (RIBEIRO *et al.*, 2021).

Relativo ao sequenciamento, três isolados seguiram para a identificação molecular, sendo os gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc mesenteroides* identificados. O *Lactobacillus* é um gênero de bactérias anaeróbicas facultativas, em forma de bastonete, gram-positivas, não formadoras de esporos, do filo Firmicutes, que metabolizam carboidratos para produzir ácido láctico, tornando-os o maior gênero dentro do grupo de BALs (DEMPSEY; CORR, 2022).

Conforme Dempsey e Corr (2022) as 261 espécies de *Lactobacillus* foram reclassificadas em 25 gêneros (incluindo 23 novos gêneros) pela diversidade genotípica, fenotípica e ecológica extremamente elevada. Tradicionalmente, as espécies podem ser

divididas em três grupos com base em seu metabolismo. O grupo homofermentativo obrigatório que fermenta carboidratos para produzir ácido láctico como subproduto principal (*L. acidophilus* e *L. salivarius*), o grupo heterofermentativo facultativo que, sob certas condições ou com certos substratos, fermenta carboidratos para produzir ácido láctico, etanol /ácido acético e dióxido de carbono como subprodutos (*L. casei* e *L. plantarum*) e o grupo obrigatoriamente heterofermentativo que sempre fermenta carboidratos para produzir ácido láctico, etanol/ácido acético e dióxido de carbono como subprodutos (*L. reuteri* e *L. fermentum*).

As espécies de *Lactobacillus* possuem qualidades que são comercialmente desejáveis tanto como suplementos de saúde como ferramentas no setor de tecnologia alimentar. Os principais usos dos *Lactobacillus* estão no processo de fabricação de laticínios fermentados, carnes ou alimentos vegetais e pães de massa fermentada, e são amplamente utilizados como probióticos, ou seja, microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (DE ANGELIS, 2011; DEMPSEY; CORR, 2022).

Devido à sua importância econômica, os *Lactobacillus* são altamente estudados e, em relação a outros gêneros bacterianos, são bem caracterizados em termos de genômica e de suas interações com humanos, em termos de saúde e doença. Essas características tornam as espécies de *Lactobacillus* candidatas probióticas ideais (DE ANGELIS, 2011).

Segundo Raimoni *et al* (2022) *Leuconostoc mesenteroides* é uma espécie de bactéria ácido-láctica heterofermentativa que habitam matrizes derivadas de plantas e uma variedade de alimentos fermentados (laticínios, massa, leite, vegetais e carnes), contribuindo para os processos de fermentação desejados ou desempenhando um papel na deterioração dos alimentos.

São bactérias sacarolíticas que catabolizam carboidratos em ácido láctico através da fermentação heteroláctica e habitam na variedade de nichos em que substratos à base de carboidratos estão disponíveis, como plantas, matrizes derivadas de plantas, silagem, alimentos fermentados (por exemplo, laticínios, massa fermentada, leite, vegetais e carnes), alimentos estragados e esgoto. Em alguns casos, as espécies estão associadas a um habitat específico, como vegetais, carnes ou outros alimentos (CANDELIERI *et al.*, 2021).

Na pesquisa de Raimondi *et al.* (2022) é evidenciado que cepas de *Leuconostoc*

spp. encontraram aplicações industriais promissoras na preparação de sistemas bioconservantes por fermentação de diferentes substratos. Foram utilizados como *starters* na fermentação de alimentos e bebidas para melhorar as propriedades nutricionais e sensoriais e prolongar a vida útil. Além disso, extratos bioativos obtidos de vegetais fermentados com *Leuconostoc* spp. encontrou aplicação na formulação de cosméticos inovadores.

No estudo de Candelieri *et al.* (2021) é delimitado que *Leuconostocs* são geralmente usados em culturas lácteas mistas, em que as cepas lactocócicas são as principais culturas iniciadoras produtoras de ácido. A fermentação do citrato por alguns *Leuconostoc* é importante, fornecendo tanto o diacetil como importante composto aromatizante em produtos lácteos (queijo, manteiga) quanto CO₂ para a formação de olhaduras que é desejável em alguns tipos de queijo. Outras propriedades importantes de algumas cepas de *Leuconostoc* incluem a remoção de acetaldeído e a produção de dextranos e bacteriocinas.

5. CONCLUSÃO

A presente pesquisa contribuiu para a caracterização de informações a respeito da microbiota láctica do leite A2A2 de vacas Jersey de uma propriedade rural situada em Cidade Ocidental-GO além disso, possibilitou a avaliação do potencial antagonista, tecnológico e probiótico do mesmo. Contribuindo para a solidificação do campo de pesquisa, bem como do aprofundamento dos pesquisadores envolvidos neste projeto, fornecendo subsídios para a ampliação e estímulo para posteriores estudos, viabilizando o aprofundamento acerca da temática e identificação de características que possam formalizar a produção de produtos que venham a agregar mais importância a esse leite, bem como na produção de derivados com potenciais culturas *starts* e com características probióticas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexandre, D. P.; Silva, M. R.; Souza, M. R.; Santos, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, v. 54, n.4, jul/ago. 2002.

Aragon, C. Leite A2A2: onde entra a raça Jersey?. SEMEX, 2020. Disponível em: <https://semex.com.br/node/3836>. Acesso em: 10 julho. 2023.

Bastos, P. A.; Martins, B; Lopes, D. S.; Da Silva, L. G. Caracterização de bactérias ácido lácticas autóctones de Bom Jesus do Itabapoana/RJ: ação antagonista contra *Listeria monocytogenes* e provas bioquímicas. *Vértices (Campos dos Goitacazes)*, v. 24, n. 1, 2022.

Balduino, R.; Oliveira, A.S.; Hauly, M. C. O. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Campinas, v.19, n.3, 1999.

Bautista-Gallego, J.; Arroyo-López, F. N.; Rantsiou, K.; Jiménez -Díaz R.; Garrido-Fernández, A.; Cocolin, L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented tableo lives with probiotic potential. *Food Research International* 50:135–142. 2013.

Candeliere, F., Raimondi, S., Spampinato, G., Tay, M. Y. F., Amaretti, A., Schlundt, J., & Rossi, M. Comparative genomics of *Leuconostoc carnosum*. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 605127, 2021.

Cogan, T. M. “Some Aspects of the Metabolism of Dairy Starter Cultures.” *Irish Journal of Food Science and Technology*, vol. 7, no. 1, 1983, pp. 1–13. JSTOR, <http://www.jstor.org/stable/25619545>. Accessed 22 julho 2023.

Costa, N. E., Hannon, J. A., Guinee, T. P., Auty, M. A. E., McSweeney, P. L. H., & Beresford, T. P. Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese. *Journal of dairy science*, v. 93, n. 8, p. 3469-3486, 2010.

Dal Bello, B., 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* v. 153, n. 1-2, p. 58-65, 2012.

De Angelis, Maria and Marco Gobetti. *Lactobacillus* spp.: general characteristics. In: *Encyclopedia of Dairy Science*, 2nd Edition. Academic Press, 2011. p. 78-90

Dempsey, Elaine; CORR, Sinéad C. *Lactobacillus* spp. for gastrointestinal health: Current and future perspectives. *Frontiers in immunology*, v. 13, p. 840245, 2022.

Dias, Maria Rita Souto; FUSIEGER, Andressa; Motta, Amanda de Souza da. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from sheep milk for potential use as non-starter cultures. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. Juiz de Fora. Vol. 74, no. 1 (Jan./Mar. 2019), p. 13-24, 2019.

Duarte M, C. K. H.; Cortez, N. M. S.; Cortez, M. A, S.; Franco, R. M. Ação antagonista de bactérias lácticas frente ao crescimento de estirpe patogênica. Enciclopédia biosfera, centro científico conhecer, v. 9, p 25, 2013.

Farahani, Z.; Rasooli, I.; Owlia, P. Isolation, identification and characterization of indigenous lactic acid bacteria for flavour improvement. International Food Research Journal. v. 24, n. 1, p. 428-436, 2017.

Fernandes, C. E.; Bento, R. A.; Stamford, T. L. M. Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. Higiene Alimentar. São Paulo, v.22, n.163, p.16-21, jul/ago. 2008.

Fernández-Rico, S., Mondragón, A. D. C., López Santamarina, A., Cardelle Cobas, A., Regal, P., Lamas, A., ... & Miranda, J. M. A2 milk: New perspectives for food technology and human health. Foods, v. 11, n. 16, p. 2387, 2022.

Fernandes, M. L.; Perin, L. M.; Todorov, S. D.; Nero, L. A.; Alencar, E. R.; Ferreira, M. A. *In vitro* evaluation of the safety and probiotic and technological potential of *Pediococcus pentosaceus* isolated from sheep milk. Semina: Ciências Agrárias, vol. 39, no. 1, 2018, January-February, pp. 113-131 Universidade Estadual de Londrina. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n1p113>.

Franco, R. M.; Oliveira, L. A. T.; Carvalho, J.C.A.P. Probióticos - Revisão. Higiene Alimentar. São Paulo, v.20, n.142, p.22-33, jul. 2006.

Franciosi, E; Settannia, L; Cavazza, A; Poznaski, E. Biodiversity and Technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. International Dairy Journal v. 19, n. 1, p. 3-11, 2009.

Freire, T. T.; Tolentino, A. L.; Ferreira, B. K. O.; Dos Santos, T. M. Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. Research, Society and Development, v. 10, n. 11, p. e513101119964-e513101119964, 2021.

Giazzi, A. Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo minas artesanais e leite cru. 2017. 77 p. Dissertação (Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina.

Gilliland, S. E.; Staley, T. E.; Bush, L. J. Importance of bile tolerance of lactobacillus acidophilus used as a dietary adjunct. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 67, n. 12, p. 3045 - 3051, 1984.

Heiner, C. R.; Hunkapiller, K. L.; Chen, S. M.; Glass, J. I.; Chen, E. Y. Sequencing multimegabase-template DNA with Big Dye terminator chemistry. Genome Research, v. 8, n. 5, p. 557-561, 1998.

Kieliszek, M.; Pobiega, K.; Piwowarek, K.; Kot, A. M. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. Molecules, v. 26, n. 7, p. 1858, 2021.

Leonarski, E.; Oliveira, J.; Cunha, V. L.; Ramos, C. J. R.; Passos, C. T. Investigação da

capacidade de acidificação de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de leite orgânico cru. 6º Simpósio em ciências e tecnologia de alimentos do Mercosul, Cascavel Paraná – Brasil, 2016.

Leska, A.; Nowak, A.; Szulc, J.; Motyl, I.; Czarnecka-Chrebelska, K. H. Antagonistic Activity of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria against Honeybee (*Apis mellifera* L.) Pathogens. *Pathogens*, v. 11, n. 11, p. 1367, 2022.

Lim, Y. H.; Foo, H. L.; Loh, T. C.; Mohamad, R.; Abdullah, N. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. *Journal of animal science and biotechnology*, v. 10, p. 1-13, 2019.

Maryam, B. M.; Datsugwai, M. S. S.; Shehu, I. The role of biotechnology in food production and processing. *Eng Appl Sci* 2 (6): 113–124. 2017. <https://doi.org/10.11648/j.eas.20170206.14>.

Mechai, A.; Debabza, M.; Zouari, S. Antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milks against multi-drug resistant and β -lactamases-producing pathogenic bacteria. *Res. J. Biotechnol*, v. 15, p. 4, 2020.

Mora, D.; Musacchio, F.; Fortina, M. G.; Senini, L., Manachini, P. L. Autolytica activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, n. 4, p. 561-570, 2003.

Motta, A.S.; Gomes, M. D. S. M. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. *Revista do Instituto de Laticínios Cândidos Tostes*, v. 70, n. 3, p. 172-184, 2015. DOI 10.14295/2238-6416.v70i3.403

Moura, K. S. A importância do conceito Clean Label no consumo de Leites Fermentados: uma pesquisa de mercado. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2022.

Nero, L. A.; De Mattos, M. R.; De Aguiar F. B.; Ortolani, M. B. T., Beloti, V.; De Melo F. B. D. G. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. In raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses and Public Health*. v.55, p.299-305, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01130.x>

Nogueira, M. D.; Silva, R. N. D. Os potenciais efeitos da Caseína A1 na microbiota intestinal: uma revisão integrativa. 2022.

De Moura O. K. A.; Jardim, D. M.; Da Silva C. K.; De Oliveira, G. V.; Vidigal, M. C. T. R. Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de queijo minas frescal de leite de cabra desenvolvido por acidificação direta e fermentação láctica. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 71, n. 3, p. 166-178, 2016.

Oliveira Cruz, R. M.; Machado, B. R. C.; de Lucena, T. C.; D’Avila, L. S. P.; Almeida,

T. T. G. Visão histórica e fisiológica da interação do leite e do trigo com a microbiota intestinal humana. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, n. 27, p. e1026-e1026, 2019.

Passerini, D.; Laroute, V.; Coddeville, M.; Le Bourgeois, P.; Loubière, P.; Ritzenthaler, P.; Coccain-Bousquet, M.; Davera-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.

Pinto, C. L. O.; Machado, S. G.; Cardoso, R. R.; Vanetti, M. C. D. Sedimentação, atividade proteolítica e proteólise de leite UHT integral durante o armazenamento. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 71, n. 4, 2016.

Piraino P., Z. T.; Ricciardi, A.; Mcsweeney P. L. H.; Parente, E. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. *International Dairy Journal*, v. 18, n. 1, p. 81-92, 2008.

Raimondi, S.; Candeliere, F.; Amaretti, A.; Costa, S.; Vertuani, S.; Spampinato, G., & Rossi, M. Phylogenomic analysis of the genus *Leuconostoc*. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 897656, 2022.

Ramakrishnan, M.; Eaton, T. K.; Sermet, O. M.; Savaiano, D. A. Milk containing A2 β -casein only, as a single meal, causes fewer symptoms of lactose intolerance than milk containing A1 and A2 β -caseins in subjects with lactose maldigestion and intolerance: A randomized, double-blind, crossover trial. *Nutrients*, v. 12, n. 12, p. 3855, 2020.

Ribeiro, J. L. Avaliação do potencial tecnológico e antagonista das bactérias ácido lácticas isoladas no leite de búfala. 2019. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2019.

Ribeiro, S. C.; Coelho, M. C.; Silva, C. C. G. A rapid screening method to evaluate acidifying activity by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 185, p. 106227, 2021.

Saravanan, C.; Rajesh, R.; Kaviarasan, T.; Muthukumar, K.; Kavitha, D.; & Shetty, P. H. Synthesis of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its application for degradation of azo-dyes. *Biotechnology Reports*, v. 15, p. 33-40, 2017.

Solmaz, K. B.; Ozcan, Y.; Mercan Dogan, N.; Bozkaya, O.; Ide, S. Characterization and production of extracellular polysaccharides (EPS) by *Bacillus pseudomycoloides* U10. *Environments*, v. 5, n. 6, p. 63, 2018.

Souza, L. B. Avaliação da microbiota láctica cultivável de leite bovino e queijo coalho produzidos no Rio Grande do Norte. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Semi-Árido. Mossoró, Rio Grande do Norte. 2015.

Schlottfeldt, C. L. Microbiota láctica de leites pasteurizados: caracterização e avaliação do potencial antagonista contra *Staphylococcus aureus*. 2019. Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Toe, C. J.; Foo, H. L.; Loh, T. C.; Mohamad, R.; Abdul Rahim, R.; Idrus, Z. Extracellular proteolytic activity and amino acid production by lactic acid bacteria isolated from Malaysian foods. *International Journal of molecular sciences*, v. 20, n. 7, p. 1777, 2019.

Wendling, L. K.; Weschenfer, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados-uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.