

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Andréia Monique Lermen

**PROPRIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS
ISOLADAS DE SORO DE LEITE DE BÚFALA E APLICAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE DERIVADOS LÁCTEOS**

Porto Alegre

2024

Andréia Monique Lermen

**PROPRIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS
ISOLADAS DE SORO DE LEITE DE BÚFALA E APLICAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE DERIVADOS LÁCTEOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof. Dra. Amanda de Souza da Motta

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Lermen , Andréia Monique
PROPRIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS
ISOLADAS DE SORO DE LEITE DE BÚFALA E APLICAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE DERIVADOS LÁCTEOS / Andréia Monique
Lermen . -- 2024.
240 f.
Orientadora: Amanda de Souza da Motta.

Coorientador: Adriano Brandelli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Bactérias ácido lácticas. 2. Soro de leite de búfala. 3. Propriedades biotecnológicas. 4. Leite fermentado de búfala. 5. Queijo colonial de búfala. I. da Motta, Amanda de Souza, orient. II. Brandelli, Adriano, coorient. III. Título.

“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo incentivo e apoio incondicional. Em especial aos meus pais, Ivete Terezinha Lermen e Paulo Vicente Lermen, que sempre me incentivaram a estudar e fizeram tudo que estava ao seu alcance para me proporcionar as melhores oportunidades. Se eu cheguei até aqui devo muito a vocês.

Ao meu noivo Felipe Abreu Fernandes, por todo apoio, incentivo, compreensão, carinho e cuidado. Obrigada por acompanhar minha trajetória no doutorado e ouvir minhas experiências laboratoriais. Obrigada por me encorajar sempre que eu tendia a desistir e por acreditar na minha capacidade e no meu potencial, muito mais do que eu acredito. Obrigada por ser esse suporte emocional junto ao Deno e por estar presente na minha vida. Te amo!

Às colegas do laboratório 222C do ICBS antigo - Danieli Quadros por ter me recebido tão bem no laboratório e as colegas Priscila Ribeiro Jankoski, Fernanda Genehr de Carvalho, Nathasha Noronha Arechavaleta e Vitória Leite Di Domenico. Às colegas do laboratório 538 do ICBS novo – Camila Zanfelice Müller, Gabriela Simões de Oliveira, Heloísa Giacomelli Ribeiro e Gabriela Doncato Duarte. Obrigada por tornarem o ambiente tão agradável e divertido. Obrigada pelas trocas de ideias, pelos lanches, cafés e fofocas.

À minha orientadora Amanda de Souza da Motta, pela orientação, dedicação e amizade. Obrigada por incentivar meu trabalho, por todos os ensinamentos e contribuir com minha trajetória acadêmica e científica.

Ao meu coorientador Adriano Brandelli, pela orientação, sugestões infundáveis e por contribuir com minha trajetória acadêmica e científica.

À coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA), por todo conhecimento propagado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelo ensino de qualidade e por proporcionar o acesso à qualificação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

PROPRIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE SORO DE LEITE DE BÚFALA E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE DERIVADOS LÁCTEOS¹

Autor: Andréia Monique Lermen

Orientadora: Prof^a. Dra. Amanda de Souza da Motta

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

RESUMO

O soro de leite de búfala pode ser fonte de bactérias ácidos lácticas (BAL), que podem ser isoladas e caracterizadas quanto ao seu potencial biotecnológico. Visando alcançar esse objetivo, foram isoladas 62 BAL do soro de leite de búfala, identificadas como *Lacticaseibacillus paracasei* (1,61%), *Enterococcus faecium* (4,84%) e *Lactococcus lactis* (93,55%), sendo que 98,38% demonstraram-se proteolíticas, 83,87% lipolíticas, 69,35% demonstraram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e 46,77% das BAL foram consideradas inócuas quanto a atividade hemolítica e de gelatinase. *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi selecionada devido sua atividade proteolítica e aplicada como cultura *starter* para fermentar o leite bubalino. O produto resultante atendeu aos parâmetros da Instrução Normativa nº 46/2007 e apresentou atividades antioxidantes, como captura dos radicais 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) (15,64%) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (59,46%), capacidade de quelar metais (26,61%) e poder redutor (0,279), além de capacidade em inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) (89,47%) de inibição. Além disso, *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi associada com *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 para elaboração de um queijo tipo colonial de búfala, o qual atendeu aos parâmetros microbiológicos após 60 dias de maturação e apresentou 24 ácidos graxos, dos quais 13 eram saturados, 6 monoinsaturados e 5 poliinsaturados. Portanto, o soro de leite bubalino pode ser fonte de BAL que possuem potencial para serem empregadas como culturas *starters*.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (239 p.) Setembro, 2024.

BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES OF LACTIC BACTERIA ISOLATED FROM BUFFALO WHEY AND APPLICATION IN THE PRODUCTION OF DAIRY PRODUCTS¹

Author: Andréia Monique Lermen

Advisor: Prof^a. Dra. Amanda de Souza da Motta

Co-Advisor: Prof. Dr. Adriano Brandelli

ABSTRACT

Buffalo whey can be a source of lactic acid bacteria (LAB), which can be isolated and characterized for their biotechnological potential. Aiming to achieve this objective, 62 LAB were isolated from buffalo milk whey and identified as *Lacticaseibacillus paracasei* (1,61%), *Enterococcus faecium* (4,84%), and *Lactococcus lactis* (93,55%). Among these, 98,38% were proteolytic, 83,87% were lipolytic, 69,35% demonstrated antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and 46,77% of the LAB were considered innocuous about hemolytic and gelatinase activity. *Lactococcus lactis* 32B4-1 was selected due to its proteolytic activity and applied as a starter culture to ferment buffalo milk. The resulting product met the parameters of Normative Instruction n° 46/2007 and exhibited antioxidant activities, including the scavenging of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (15,64%) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (59,46%) radicals, metal chelating capacity (26.61%), reducing power (0,279), and the ability to inhibit angiotensin-converting enzyme (ACE) activity (89,47%). Furthermore, *Lactococcus lactis* 32B4-1 was combined with *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 to produce a colonial-type buffalo cheese that met the microbiological parameters after 60 days of ripening. The cheese contained 24 fatty acids, including 13 saturated, 6 monounsaturated, and 5 polyunsaturated. Therefore, buffalo whey can serve as a source of LAB with potential for use as starter cultures.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (239 p.) September, 2024.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Aspectos gerais da bubalinocultura e produção leiteira	4
3.2 Soro de leite	6
3.3 Microbiota láctica do soro de leite	10
3.4 Aspectos de segurança das BAL	12
3.5 Propriedades tecnológicas das BAL.....	14
3.5.1 Capacidade de acidificação.....	15
3.5.2 Propriedades proteolíticas.....	16
3.5.3 Propriedades lipolíticas	18
3.6 Propriedades funcionais das BAL	19
3.6.1 Biopreservação de alimentos	21
3.7 Prospecção de novas BAL como culturas autóctones	22
3.8 Desenvolvimento de novos produtos a partir de culturas autóctones	24
3.8.1 Queijo colonial artesanal	25
3.8.2 Leite fermentado.....	27
3.9 Hidrolisados bioativos a partir de proteínas alimentares	28
3.9.1 Capacidade antioxidante	29
3.9.2 Potencial anti-hipertensivo	30
4. METODOLOGIA	33
4.1. Leite de búfala.....	33
4.2. Produção do soro de leite de búfala.....	33
4.3. Análises físico-químicas do soro de leite de búfala.....	33
4.4. Análises microbiológicas do soro de leite de búfala	33
4.5. Contagem, seleção e isolamento de BAL do soro de leite de búfala.....	34
4.6. Identificação de isolados bacterianos por MALDI-TOF/MS.....	35
4.7. Avaliação da atividade enzimática.....	35
4.8 Atividade antimicrobiana das BAL.....	36
4.9 Avaliação da inocuidade das BAL	36

4.10 Seleção de um microrganismo	36
4.11 Identificação Molecular de <i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1	37
4.12 Produção de protease utilizando <i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1.....	37
4.13 Produção de biofilme.....	39
4.14 Ensaio <i>in vitro</i> de tolerância a condições do trato gastrointestinal	40
4.15 Hidrofobicidade	40
4.16 Produção de leite fermentado de búfala.....	41
4.17 Determinação dos parâmetros de fermentação do leite de búfala	41
4.18 Análises físico-químicas do leite fermentado de búfala.....	42
4.19 Atividade antioxidante e anti-hipertensiva do leite fermentado de búfala	42
4.19.1 Captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)	42
4.19.2 Captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	43
4.19.3 Poder redutor	43
4.19.4 Atividade quelante de ferro.....	43
4.19.5 Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina do leite fermentado de búfala.....	44
4.20 Microrganismos usados como cultura <i>starter</i> do queijo colonial de búfala.....	44
4.21 Caracterização tecnológica da cultura <i>starter</i> autóctone.....	45
4.22 Avaliação de inocuidade da cultura <i>starter</i> autóctone	46
4.23 Produção das culturas <i>starters</i> autóctones	47
4.24 Avaliação do leite de búfala empregado na produção do queijo	47
4.25 Produção de queijo colonial de búfala.....	47
4.26 Avaliação bromatológica do queijo colonial de búfala	48
4.27 Avaliação microbiológica do queijo colonial de búfala.....	49
4.28 Perfil de ácidos graxos	49
4.29 Análises estatísticas	49
5. RESULTADOS	50
5.1. Artigo Científico I	51
5.2 Artigo Científico II	95
5.3 Artigo Científico III	119
5.4 Artigo Científico IV.....	139
5.5 Capítulo de Livro	172
5.6 Resultados não apresentados na forma de artigo.....	185

5.6.1 Identificação molecular.....	185
5.6.2 Produção de protease utilizando <i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1.....	185
5.6.3 Produção de biofilme.....	188
5.6.4 Ensaio <i>in vitro</i> de tolerância a condições do trato gastrointestinal	188
5.6.5 Hidrofobicidade.....	189
5.6.6 Caracterização tecnológica das culturas <i>starters</i>	189
6. DISCUSSÃO GERAL.....	191
7. CONCLUSÃO	201
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	203

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Composição do leite bovino e bubalino.....	5
Tabela 2 - Composição do soro de leite de diferentes origens.....	8

TABELAS DO ARTIGO 1

Table 1 - Compositional characteristics of sweet and acid whey. ^a	55
Table 2 – Protein composition and basic characteristics of whey proteins (Sweet whey) ^a	55
Table S1 – Different formulated beverages that contain whey and its derivatives.....	86

TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1 - Resultados da análise físico-química do soro de leite de búfala liofilizado.*.....	102
Tabela 2 - – Resultados da análise microbiológica do soro de leite de búfala.*	103
Tabela 3 – Contagem de BAL presentes no soro de leite de búfala, realizado no ágar MRS e M17, nas condições de aerobiose a 37 °C e anaerobiose a 30 °C.*.....	106
Tabela 4 - Atividade enzimática e atividade antimicrobiana de BAL isoladas de soro de leite de búfala. ^a	109

TABELAS DO ARTIGO 3

Tabela 1 – Características físico-químicas do leite de búfala fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1.....	128
--	-----

TABELAS DO ARTIGO 4

Tabela 1. Capacidade de crescimento das culturas <i>starters</i> em diferentes temperaturas e concentrações de NaCl, após 48 h.....	149
Tabela 2. Resultado da composição centesimal média do leite de búfala em comparação com os parâmetros oficiais da IN N° 76/2018 e SAA – 03/2008.....	151
Tabela 3. Resultados das análises microbiológicas dos queijos aos 10, 30 e 60 dias de maturação.....	156
Tabela 4. Perfil de ácidos graxos dos queijos aos 10, 30 e 60 dias de maturação....	159

TABELAS DOS RESULTADOS NÃO APRESENTADOS NA FORMA DE ARTIGO

Tabela 3 - Absorbância de densidade óptica média (DO) a 600 nm e classificação de biofilmes microbianos.....188

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Fluxograma da elaboração de queijo.....6

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figura 1 - a) Identificação através de MALDI-TOF de microrganismos isolados e selecionados de soro de leite de búfala e b) Perfil taxonômico de amostras de soro de leite de búfala em nível de gênero.....107

FIGURAS DO ARTIGO 3

Figura 1 – A) Contagem de células viáveis de *Lactococcus lactis* 32B4-1 (\log_{10} UFC/mL) (●) vs pH (▲). B) pH (▲) vs acidez titulável (■) do leite de búfala fermentado.....126

Figura 2 - Capacidade antioxidante do leite de búfala fermentado por *Lactococcus lactis* 32B4-1: (A) Capacidade de eliminação de radicais ABTS, (B) Capacidade de eliminação de radicais DPPH, (C) Capacidade quelante de Fe²⁺, (D) Capacidade de redução do poder.131

Figura 3 - Atividade inibitória da ACE do leite de búfala fermentado por *Lactococcus lactis* 32B4-1.132

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -Determinação qualitativa da atividade proteolítica da BAL <i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1, utilizando diferentes pH e temperaturas.	185
Gráfico 2 - Atividade proteolítica (♦) vs número de células viáveis (UFC/mL) de <i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1 (●), em diferentes períodos de incubação.	186
Gráfico 3 - Densidade óptica do meio a 600 nm (▲) vs número de células viáveis (UFC/mL) de <i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1 (●), em diferentes períodos de incubação.	187
Gráfico 4 - pH do meio (■) vs número de células viáveis (UFC/mL) de <i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1 (●), em diferentes períodos de incubação.	188
Gráfico 5 – Capacidade de acidificação: A) Leite UHT desnatado com <i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1 (▲); B) Leite UHT desnatado com <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LB 5.5 (■); C) Leite integral com 3% de gordura com <i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1 (♦); D) Leite integral com 3% de gordura com <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LB 5.5 (●).	189
Gráfico 6 – Autólise das culturas starters.	190

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -La	α -lactoalbumina
β -Lg	β -lactoglobulina
Abs	Absorbância
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AGL	Ácidos Graxos Livres
ANOVA	Análise de variância unidirecional
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
AO	Ágar Oxford
AT	Acidez Titulável
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bactéria Ácido Láctica
BHI	Brain Heart Infusion
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BP	Baird Parker
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBA	Columbia Blood Agar
CCRD	Central Composite Rotating Design
CECT	Type Culture Collection
CFU	Colony Formed Units
CLA	Ácido Linoléico Conjugado
CO ₂	Dióxido de Carbono
COD	Chemical Oxygen Demand
CPP	Contagem Padrão em Placas
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
DOP	Denominação de Origem Protegida
DPP-IV	Dipeptidyl Peptidase-IV

DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EEA	Estação Experimental Agronômica
EPS	Exopolissacarídeos
ESA	Extratos Solúveis em Água
Fe ²⁺	Íon Ferroso
Fe ³⁺	Íon Férrico
FeCl ₃	Cloreto férrico
FeSO ₄	Sulfato ferroso (II)
FM	Fermented milk
FOS	Fructooligosaccharides
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
GIP	Gastric Inhibitory Peptide
GIT	Gastrointestinal Tract
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GOS	Oligosaccharides
GRAS	Geralmente Reconhecidas como Seguras
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
HCCA	Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	High-Density Lipoprotein
HEPES	Ácido 2- [4-(2-hidroxi-etil) piperazin-1-il] etanossulfônico
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
ICTA	Instituto Ciência e Tecnologia de Alimentos
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1
IL-2	Interleukin-2
IN	Instrução Normativa
ISO	International Organization for Standardization
K ₂ SO ₄	Sulfato de Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio

LAB	Lactic Acid Bacteria
LDL	Low-Density Lipoprotein
LFDA	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight
MH	Muller Hünton
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIC	Concentração inibitória mínima
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCDC	National Collection of Type Cultures
NMP	Número Mais Provável
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
OVAT	one-variable-at-a-time
PBS	Phosphate bufferid saline
PCA	Plate Count Agar
PCR	Reações em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPGMAA	Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
R	Resistência
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotação por minuto
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
S	Suscetibilidade
SAA	Secretaria de Agricultura e Abastecimento
SGA	Simulated Gastric Acid
SIF	Simulated Intestinal Fluid
SM	Suscetibilidade Moderada
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Trato Gastrointestinal

TSA	Ágar Triptona de Soja
TSB	Soy Tryptone Broth
UFC	Unidades Formadas de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UHT	Ultra High Temperature
VRBA	Violet Red Bile Agar
WPC	Whey Protein Concentrate
WPI	Whey Protein Isolate
Ws	Supernatant weight
XLD	Xylose Lysine Desoxycholate
XOS	Xylooligosaccharides

1. INTRODUÇÃO

O soro de leite é a fração que é obtida da coagulação do leite, durante a produção de queijo ou caseína e, contém mais da metade dos nutrientes do leite, como proteínas, sais minerais, lactose, vitaminas, enzimas e gordura. Em virtude deste elevado conteúdo de substâncias orgânicas, o poder poluente do soro de leite é considerado alto. Além disso, há uma geração volumosa deste, pois para a produção de 1 quilo de queijo são necessários 10 litros de leite, o que gera em torno de 8 a 9 litros de soro. Portanto, o soro de leite é considerado o subproduto mais importante da indústria de laticínios e, na busca por alternativas para o seu aproveitamento, possibilitando a reciclagem desse material em outros de maior valor econômico a fim de torná-lo um coproduto, constatou-se que o soro de leite possui propriedades funcionais e bioativas. Logo, ele vem sendo utilizado na alimentação humana e animal, na formulação de bebidas, como ingrediente em produtos benéficos para a saúde, na produção de biogás, biohidrogênio e etanol. Destaca-se que há uma vasta literatura acerca do soro de leite bovino visando diferentes aplicações; contudo acerca do soro de leite de outros mamíferos, em especial o bubalino, ainda há poucos estudos.

Alternativamente, através do soro de leite, pode-se obter microrganismos, como bactérias ácido lácticas (BAL), que podem ser isoladas e investigadas quanto a suas propriedades tecnológicas e funcionais. Destaca-se que as BAL são muito apreciadas, devido a sua capacidade de atribuir características desejáveis aos alimentos, como aroma, propriedades sensoriais, proteção contra microrganismos patogênicos e deteriorantes, além de muitas possuírem propriedades probióticas. Isso deve-se a capacidade das BAL de produzirem diferentes metabólitos, como ácidos orgânicos, ácido propiônico, ácido benzóico, ácidos graxos, compostos voláteis, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, diacetil, acetoína, exopolissacarídeos e enzimas.

Nesse contexto, as BAL têm sido amplamente utilizadas pelas indústrias alimentícias como culturas *starters*, para elaboração de alimentos fermentados, pois desempenham propriedades tecnológicas de interesse, contribuem para o desenvolvimento das propriedades organolépticas, sensoriais e funcionais do produto final. Aliado a isso, há um crescente interesse em prospectar BAL de alimentos fermentados para obtenção de culturas *starters* autóctones. O uso de microrganismos

autóctones possibilita a produção de um alimento fermentado com características típicas, trazendo diferenciação ao mercado, promoção de qualidade e segurança aos produtos. Além disso, utilizar estes microrganismos para elaboração de produtos com leite de búfala traz uma inovação ao mercado, tendo em vista que o leite bubalino é o segundo mais consumido no Brasil e sua produção vem crescendo no estado do Rio Grande do Sul.

Importante frisar que as BAL estão presentes em diversos locais e, há muitos estudos na literatura que visam o seu isolamento de produtos lácteos de diferentes mamíferos, com destaque para leite e queijos. No entanto, pesquisas que buscam isolar BAL de soro de leite bubalino são escassas. Diante do exposto, investigar o soro de leite bubalino é de extrema relevância, especialmente porque se trata de um coproduto e subproduto pouco explorado quanto a suas propriedades físico-químicas e microbiológicas. Portanto, o presente estudo visou expandir o conhecimento acerca do soro de leite bubalino, bem como isolar BAL com propriedades biotecnológicas de interesse a fim de aplicá-las como culturas *starters* de alimentos fermentados de origem bubalina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e prospectar bactérias lácticas do soro de leite de búfala, avaliando suas propriedades biotecnológicas.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar os padrões de identidade e qualidade do soro de leite de búfala;

2.2.2 Isolar bactérias lácticas do soro de leite de búfala;

2.2.3 Avaliar a inocuidade e propriedades tecnológicas das bactérias lácticas;

2.2.4 Produzir um produto lácteo bubalino com *Lactococcus lactis* 32B4-1 e avaliar as potenciais atividades biológicas do leite fermentado;

2.2.5 Desenvolver um queijo tipo colonial de búfala com a cultura *starter* *Lactococcus lactis* 32B4-1 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos gerais da bubalinocultura e produção leiteira

Os búfalos foram introduzidos no Brasil no final do século XIX, em pequenos lotes oriundos da Ásia, Itália e Caribe (Bernardes, 2007). São animais que apresentam rusticidade e capacidade de adaptar-se a ambientes de baixa fertilidade e terrenos alagadiços (Cavali; Pereira, 2020), o que permitiu que pouco menos de 200 animais trazidos para o país resultassem em um rebanho atual de 3 milhões de búfalos (Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 2023).

O Brasil possui o maior rebanho bubalino no Ocidente (Cavali; Pereira, 2020). Os búfalos vêm sendo criados em todo o país, com destaque para a região Norte que possui 65,51% do rebanho, seguido da região Sudeste (13,29%), Nordeste (8,80%), Sul (8,65%) e Centro-Oeste (3,75%) (IBGE, 2017), destacando-se as seguintes raças: Murrah, Jafarabadi e suas cruzas, Mediterrâneo e Carabao (Ricci; Domingues, 2012). Inicialmente, a criação dos animais era destinada à produção de carne, mas a partir da década de 80 houve um crescente interesse na produção de leite (Bernardes, 2007).

É evidente que os rebanhos de búfalas leiteiras são uma atividade em ampla expansão, pois atualmente o leite de búfala é a segunda maior fonte de produção mundial de leite (Godinho et al., 2020). No Brasil, o leite de búfala também está ganhando espaço, pois já é possível encontrar produtos lácteos de búfala nas prateleiras dos supermercados. Essa expansão se deve à maior valorização do leite de búfala, ao aumento da demanda dos consumidores, ao sabor suave do leite e seus benefícios nutricionais (Miranda, 2021).

No estado do Rio Grande do Sul (RS) há 16 criadores de búfalos que são associados à Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (2023), mas somente três produtores possuem a criação de búfalas para fins de produção leiteira. Nesse contexto, destaca-se o trabalho desenvolvido por Godinho et al. (2020) no estado, onde foram avaliados parâmetros de qualidade microbiológica, físico-química e contagem de células somáticas do leite bubalino cru destinado à fabricação de derivados no RS. O trabalho teve como objetivo fornecer subsídios para o estabelecimento de um padrão de identidade e qualidade do leite bubalino cru, tendo

em vista que atualmente não há uma legislação federal específica para determinar o Padrão de Identidade e Qualidade do leite bubalino.

Destaca-se que o leite bubalino difere do leite bovino, tendo em vista que contém maiores teores de gordura, sólidos totais, proteínas, caseínas, lactose e teor de cinzas (Tabela 1). Além disso, a ausência de β -caroteno é uma das principais características na composição química do leite bubalino, conferindo-lhe a coloração branca (Ricci; Domingues, 2012). O leite de búfala é um produto valioso tanto *in natura* quanto na produção de derivados, pois devido a sua composição há um maior rendimento industrial. Os principais produtos obtidos são a muçarela e a ricota, contudo outros produtos já passaram a ser produzidos como doce de leite, provolone, iogurte, manteiga, sorvete e outros queijos regionais (Bernardes, 2007; Cavali; Pereira, 2020).

Tabela 1 – Composição do leite bovino e bubalino.

Parâmetros	Leite bovino	Leite Bubalino
Gordura (g/100g)	4,37	5,5
Proteína (g/100g)	3,30	4,06
Lactose (g/100g)	4,33	5,07
Sólidos totais (g/100g)	13,08	15,5
Sólidos não gordurosos (g/100g)	8,71	9,96
Acidez (g ácido láctico/mL)	0,17	0,16
Densidade (g/cm ³)	1,028	1,034
Contagem de Células Somáticas (cél/mL)	1,08x10 ⁶	9,5x10 ⁴
Contagem Padrão em Placa (UFC/mL)	4,6x10 ⁶	9,0x10 ⁴

Fonte: Godinho et al. (2020) e Müller et al. (2022).

Apesar da promissora e crescente comercialização dos derivados de leite de búfala, é importante ressaltar a geração de soro de leite oriunda da produção de queijos. Nos dias atuais, há um vasto conhecimento acerca do soro de leite bovino. Contudo, estudos no Brasil acerca da qualidade microbiológica e físico-química do soro de leite bubalino são escassos, assim como estudos que tenham investigado microrganismos, oriundos deste substrato, com potencial biotecnológico.

3.2 Soro de leite

O soro de leite é um subproduto líquido de cor amarelo esverdeado, devido à presença de riboflavina (Vitamina B2), resultante da produção de queijo ou caseína (Liu et al., 2018; Rocha-Mendoza et al., 2021). Na fabricação de queijos, o leite passa pelo processo de pasteurização rápida a 72 °C por 15 s ou pasteurização lenta a 64 °C por 30 min. Posteriormente, adiciona-se a cultura láctica ou enzima, a fim de promover a precipitação da caseína e, conseqüentemente, a formação da coalhada. Após a coagulação, a coalhada é cortada, agitada e aquecida para promover a separação do soro. Através do dessoramento, separa-se o soro da coalhada, que é enformada em diferentes moldes e tamanhos, a fim de conferir o formato desejado ao queijo. O queijo é prensado para expulsar o excedente de soro e em seguida, passa pelas etapas de salga e maturação, que dependem do tipo de queijo desejado, antes de ser embalado (Figura 1).

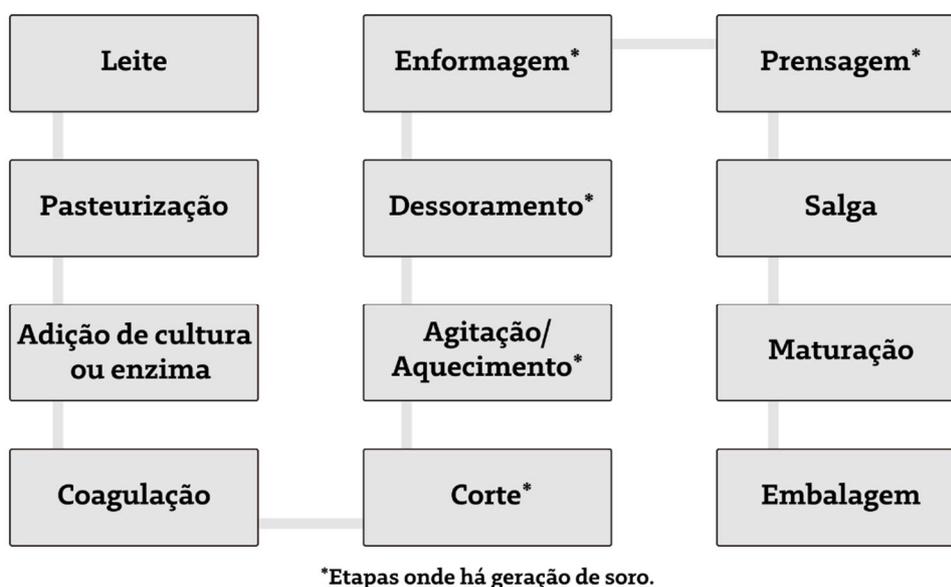


Figura 1 - Fluxograma da elaboração de queijo.

Fonte: Adaptado de Lira et al. (2009).

O soro de leite é classificado como ácido ou doce, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do Soro de Leite (Brasil, 2020). Essa classificação depende do soro obtido no processo de coagulação da caseína. O soro de leite ácido é produzido quando a coagulação da caseína é

realizada pela atividade de lactobacilos, ou pela adição de ácidos minerais (ácido clorídrico ou sulfúrico) ou orgânicos (ácido láctico) e até mesmo através da associação de lactobacilos e agentes enzimáticos. Esse processo ocorre em pH inferior a 5,6 e resulta da produção, por exemplo, de queijo cottage e caseína comercial. Já o soro de leite doce é gerado quando o processo de coagulação for realizado através de um agente enzimático, como o coalho, uma mistura de enzimas que contém a protease quimosina. Esse processo ocorre em pH próximo de 6,5 e resulta principalmente da fabricação dos queijos Cheddar, Provolone, Suíço e Muçarela (Lievore et al., 2015; Argenta; Scheer, 2019).

A constituição do soro de leite se dá, majoritariamente, por água (93-94%). Contudo, o soro de leite retém, aproximadamente, 50% dos nutrientes do leite, representados por proteínas, lactose, vitaminas e sais minerais (Ahmad et al., 2019). Além disso, sua composição depende de alguns fatores, como a origem do leite (bovino, ovino, caprino, bubalino e outros mamíferos) (Tabela 2), o tipo de alimentação dos animais produtores, fase de lactação, armazenamento do leite após a ordenha, tratamento térmico do leite e o método de precipitação da caseína (Lievore et al., 2015; Kaur et al., 2019).

Dentre as proteínas do soro de leite, α -lactoalbumina (α -La), β -lactoglobulina (β -Lg), albumina, imunoglobulinas e glicomacropéptido destacam-se por suas maiores concentrações, em relação à lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima (Maciel et al., 2020; Veskoukis et al., 2020). Somente o glicomacropéptido não está naturalmente presente no soro de leite, pois é produzido a partir da caseína durante a primeira etapa do processamento enzimático do queijo (Jakubowicz; Froy, 2013). Ademais, o soro de leite é uma fonte rica em aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) e peptídeos (Smithers, 2008).

Destaca-se que o soro de leite é considerado um efluente de impacto ambiental significativo por apresentar elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) variando de 30.000 a 60.000 mg/L, valor em torno de 75 vezes maior do que o sistema de esgoto de cidades modernas, além de elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO), em torno de 60.000 mg/L (Veskoukis et al., 2020; Argenta et al., 2021). Logo, se descartado de maneira inadequada no meio ambiente, o soro de leite pode levar ao desenvolvimento de eutrofização, impermeabilização e toxicidade, reduzindo a vida

aquática e distorcendo a estrutura física e química do solo (Mansor et al., 2021; Rao; Basak, 2021).

Tabela 2 - Composição do soro de leite de diferentes origens.

Soro de leite	Proteínas (%)	Lactose (%)	Gordura (%)	Cinzas (%)	Acidez láctica (°D)	pH	Referência
Bovino	0,73	3,64	0,39	0,56	0,70	6,44	Guedes et al. (2013)
	0,84	4,42	0,77	0,47	13,17	6,19	Teixeira et al. (2007)
	0,86	48,37*	0,27	0,52	1,64*	5,32*	Bald et al. (2014)
	0,84	4,18	-	0,61	0,61	4,37	Lievore et al. (2015)
	7,27*	42,46*	2,64*	-	-	6,52*	Argenta et al. (2021)
Bubalino	1,19	5,84	1,37	-	10,00	6,31	Lira et al. (2009)
	2,01	-	0,29	-	10,9	6,58	Caldeira et al. (2010)
	0,91	-	1,51	0,45	-	6,4	Lima et al. (2014)
	0,99	2,63	-	-	0,02	6,33	Sousa et al. (2020)
	10,89*	46,26*	4,97*	-	-	5,25*	Argenta et al. (2021)
Caprino	1,98	4,17	1,23	0,49	18,26	4,36	Garay et al. (2021)
	0,72	1,89	-	-	0,01	6,44	Sousa et al. (2020)
	8,93*	39,24*	3,73*	-	-	5,64*	Argenta et al. (2021)

*Nota: Valores em base seca.

Apesar de ser considerado um efluente oneroso para a indústria, a produção de queijo continua crescendo e, conseqüentemente também há maior geração de soro de leite. Considerando que, em torno de 8 a 9 L de soro de leite são gerados para produzir 1 kg de queijo, estima-se que a produção global de soro de leite em 2023 foi em torno de 230 milhões de toneladas (Rama et al., 2019). Nesse contexto, há a necessidade da abordagem de novos métodos para utilizar o soro de leite, a fim de reduzir os impactos ambientais do descarte, bem como reduzir o custo operacional do seu processamento. Logo, com a aplicação e pesquisas acerca dos benefícios do soro de leite, este que por muito tempo foi considerado como um resíduo da indústria, passa a ser um coproduto muito desejado (Rao; Basak, 2021; Zandona et al., 2021).

A produção de soro de leite em pó é a maneira mais comum de utilizar o soro de leite líquido, pois ele pode ser beneficiado na mesma indústria que o produz (Zandona et al., 2021). O soro de leite pode ser fracionado através de processos de recuperação e concentração dos componentes, como filtração por membranas, cromatografia, precipitação e secagem por *spray dryer*. A partir destes processamentos, produtos como soro em pó, concentrado de proteína de soro de leite, isolado de proteína de soro de leite, permeado de soro de leite, lactose e outras frações podem ser obtidos (Argenta; Scheer, 2019; Kaur et al., 2019). Ainda, o soro de leite pode ser utilizado na obtenção de hidrolisados, onde as proteínas do soro podem ser transformadas em peptídeos bioativos, que são definidos como fragmentos proteicos liberados através da hidrólise de proteínas, isto é, estes peptídeos não apresentam atividades biológicas enquanto parte da proteína precursora, mas quando liberados pela hidrólise podem apresentar bioatividades (Argenta; Scheer, 2019).

Atualmente, o soro de leite e seus constituintes são amplamente reconhecidos entre os esportistas e pessoas que praticam exercícios físicos, especialmente devido aos benefícios oferecidos, como melhorias no desempenho físico, auxílio na prevenção de atrofia muscular e melhor recuperação após o exercício (Ryan; Walsh, 2016). Também são investigados quanto a atuação na prevenção da sarcopenia (Kang et al., 2019; Zhao et al., 2022), no combate à obesidade (Badely et al., 2019), na melhoria da saúde gastrointestinal (Basciani et al., 2020; Feng et al., 2022), no manejo da hiperglicemia no diabetes tipo 2 (Jia et al., 2020; Gao et al., 2020), no combate a hipertensão (Xia et al., 2020; Zhao et al., 2022) e potencial antioxidante (Veskoukis et al., 2020).

Além disso, as indústrias de laticínios utilizam o soro de leite como um coproduto em bebidas. Na atualidade é possível encontrar uma vasta gama de produtos líquidos à base de soro de leite no mercado, incluindo bebidas fermentadas ou não fermentadas, mistura de soro de leite com suco de frutas, bebidas de soro de leite probióticas, prebióticas e simbióticas (Turkmen et al., 2019). O soro de leite também pode ser utilizado como um ingrediente em diferentes produtos alimentícios (Królczyk et al., 2016). Na indústria da carne pode ser aplicado em salsichas, mortadelas e linguiças (Badpa; Ahmad, 2014; Wójciak et al., 2015; Kononiuk; Karwowska, 2019). Além disso, é utilizado em produtos de padaria e confeitaria, na produção de pães, bolos, tortas, biscoitos e bolachas (Levin et al., 2016; Marques et al., 2016; Soares et al., 2018; Martins et al., 2018). Possui ampla aplicação em

iogurtes, doce de leite, leite condensado, creme de leite e produção de ricota (Ferreira et al., 2012; Caldeira et al., 2010; Lievore et al., 2015). Cabe ressaltar que, apesar do promissor uso do soro de leite como coproduto na elaboração de alimentos e bebidas, este deve apresentar qualidade físico-química e microbiológica de acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 80/2020, de 13 de agosto de 2020 (Brasil, 2020), a fim de evitar que se torne um veiculador de microrganismos patogênicos ao consumidor (Mendes; Souza, 2017).

Assim como na área alimentar, o soro de leite e seus constituintes também são pesquisados na produção de biocombustíveis, como bioetanol (Vincenzi et al., 2014; Murari et al., 2019), biogás (Comino et al., 2012) e biohidrogênio (Patel et al., 2016; Ghimire et al., 2017). Alternativamente, o soro de leite pode ser utilizado em processos biotecnológicos, como substrato em processos microbianos ou enzimáticos para obter novos produtos (Argenta; Scheer, 2019), como ração animal, bioproteína, probióticos, ácidos orgânicos, enzimas, bioconservantes, exopolissacarídeos e bioplásticos (Liu et al., 2018; Sahoo et al., 2020).

3.3 Microbiota láctica do soro de leite

A microbiota láctica do soro de leite é constituída, naturalmente, por bactérias ácido-lácticas (BAL), pois sua presença ocorre inicialmente na matéria-prima que origina o soro de leite (Falardeau et al., 2019; Duarte et al., 2020). Nesse contexto, destaca-se que as BAL fazem parte da microbiota láctica desde o processo de produção do leite, pois a partir do momento que o leite sai do úbere do animal, ele passa a entrar em contato com microrganismos que estão presentes no ambiente, como as BAL e até com possíveis patógenos, que podem estar na superfície do úbere, no equipamento de ordenha, nos equipamentos de transporte e armazenamento e, no ambiente da fábrica de laticínios (Rzepakowska et al., 2017; Marasco et al., 2022).

As BAL são um grupo de bactérias classificadas como gram-positivas, catalase negativa, não esporuladas, anaeróbicas ou microaerófilas, possuindo morfologia de bacilos ou cocos (Agagündüz et al., 2022). Crescem em pHs ácidos e são mesófilas ou termófilas, tendo temperatura ótima de crescimento entre 30 a 42 °C, respectivamente (Sabo et al., 2014). Os principais representantes das BAL incluem os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Essas bactérias são encontradas em uma ampla variedade de habitats

que vão desde o sistema urogenital, respiratório e digestivo de animais, além de produtos cárneos, legumes, bebidas e derivados lácteos (Stefanovic et al., 2017; Chittora et al., 2022). Logo, o soro de leite pode ser uma fonte para isolar BAL com propriedades funcionais e propriedades tecnológicas de interesse.

Diferentes estudos investigaram a composição microbiana do soro de leite. Duarte et al. (2020), por exemplo, pesquisaram a composição microbiana do soro de leite bovino em quatro laticínios na Itália e verificaram a presença de microrganismos mesófilos ($8,3 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^8$ UFC/mL), Enterobacteriaceae ($3,7 \times 10^0$ a $1,7 \times 10^6$ UFC/mL), *Pseudomonas* ($1,0 \times 10^1$ a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL) e microrganismos formadores de esporos aeróbicos ($1,0 \times 10^1$ a $2,0 \times 10^4$ UFC/mL). Através do sequenciamento do gene amplicon 16S rRNA, os autores verificaram que os gêneros mais abundantes foram *Streptococcus* (64,9%), *Lactobacillus* (18,1%), *Escherichia* (8,5%) e *Acinetobacter* (4,1%), que juntos representaram 95,6% da biodiversidade bacteriana total das amostras analisadas. Já Wang et al. (2017) averiguaram que *Lactobacillus*, *Acetobacter* e *Lactococcus lactis* foram os microrganismos dominantes nas amostras de soro de leite bovino, coletadas de quatro regiões da província de Yunnan, na China. Os autores ainda verificaram a presença, em menor abundância, dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Raoultella* e *Leuconostoc*. Conhecendo a importância das BAL e visando conhecer a biodiversidade destes microrganismos no soro de leite bovino, Liu et al. (2009) também desenvolveram um estudo em Yunnan, na China, onde identificaram a presença de 3 gêneros (*Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*) e 9 espécies diferentes, com prevalência de *Lactobacillus helveticus*, em um soro de leite ácido.

Segundo Zotta et al. (2021), culturas *starters* têm sido utilizadas há mais de 125 anos na fabricação de queijos e originalmente a prática envolvia a reutilização de parte do lote anterior de um alimento fermentado como inóculo para reiniciar a fermentação. Visando conhecer a comunidade microbiana *starters* de soro de leite natural de vaca e de búfala, Marasco et al. (2022) realizaram um estudo onde identificaram a prevalência de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* no soro de leite de búfala (19 isolados) e soro de leite de vaca (18 isolados). No entanto, também identificaram *Lactobacillus fermentum* (1 isolado), *Lactobacillus delbrueckii* (4 isolados) e *Streptococcus thermophilus* (4 isolados) no soro de leite de búfala e *Enterococcus faecium* (14 isolados) e *Streptococcus thermophilus* (9 isolados) no soro de leite de vaca. Em estudos desenvolvidos por Ercolini et al. (2001), a maioria da população microbiana

em culturas naturais de soro de leite bubalino, usados para produção de queijo muçarela de búfala, foi representada por estreptococos e lactobacilos (10^8 UFC/mL). Ainda, os microrganismos dominantes foram identificados como *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus fermentum* e *Enterococcus faecalis*. Posteriormente, Ercolini et al. (2008) desenvolveram estudo similar utilizando culturas naturais de soro de leite bovino para a fabricação do queijo Caciocavallo Silano Denominação de Origem Protegida (DOP), em diferentes regiões da Itália. Os autores constataram que a diversidade microbiana não é elevada, pois somente verificaram a ocorrência de *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*. Além disso, concluíram que a diversidade microbiana no soro de leite não depende da origem geográfica, tendo em vista que as mesmas espécies microbianas ocorreram nas diferentes regiões examinadas.

Observa-se que, nos estudos supracitados, o ambiente microecológico do soro de leite é muito complexo e a composição da comunidade microbiana é amostra-específica. Apesar disso, há características em comum, como a presença dominante de BAL. Nesse contexto, alguns estudos buscaram isolar e identificar BAL do soro de leite. Destaca-se o estudo desenvolvido por Rzepkowska et al. (2017), que buscou identificar BAL isoladas de soro de leite bovino. Os autores isolaram 16 BAL pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, identificadas através do 16S rDNA como *Lactobacillus fermentum* (9 isolados) e *Lactobacillus plantarum* (7 isolados). Já Sousa et al. (2020) isolaram BAL de soro de leite bovino (40 isolados), bubalino (37 isolados) e caprino (17 isolados). Os autores selecionaram 4 isolados identificados como *Enterococcus* spp. (CW36, BW32, GW33 e GW34) e um isolado identificado como *Lactococcus* spp. (BW27.74) e aplicaram em um leite fermentado, demonstrando que BAL isoladas de soro de leite podem ser utilizadas na indústria de laticínios com grande potencial como culturas *starters*.

3.4 Aspectos de segurança das BAL

Apesar das BAL serem Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS) para aplicação na indústria de alimentos (Kieliszek et al., 2021), elas precisam passar por avaliação de segurança para garantir a inocuidade dos isolados (Breyer et al., 2021).

Usualmente têm-se avaliado a atividade hemolítica, capacidade de hidrolisar gelatina, atividade mucinolítica e detecção de DNase, pois são fatores que contribuem para a virulência em microrganismos (Divisekera et al., 2019; Breyer et al., 2021; Rodrigues et al., 2021). Inclusive, a ausência de atividade hemolítica é considerada um pré-requisito de segurança para a seleção da cepa probiótica (FAO/WHO, 2002). A hemólise é um conhecido fator de virulência entre os microrganismos patogênicos (Tallapragada et al., 2018). Além disso, a gelatinase é outro fator amplamente investigado, tendo em vista que é conhecida por contribuir para a formação de biofilme e virulência através da degradação de uma grande quantidade de substratos do hospedeiro, como por exemplo, colágeno, fibrinogênio, fibrina, endotelina-1 e bradicinina (Thurlow et al., 2010). No estudo desenvolvido por Breyer et al. (2021), ao avaliar o potencial probiótico das BAL, nenhum microrganismo demonstrou atividade hemolítica e capacidade de hidrolisar gelatina. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores ao avaliar o perfil de segurança das BAL em relação a atividade hemolítica (Cui et al., 2018; Shi et al., 2019; Colombo et al., 2020; Reuben et al., 2020) e atividade de gelatinase (Dias et al., 2019; Colombo et al., 2020).

Além disso, a resistência das BAL a determinados antimicrobianos também deve ser avaliada, tendo em vista a crescente problemática da resistência antimicrobiana no mundo. O amplo uso dos antimicrobianos para tratar infecções humanas, para promover o crescimento de aves e gado, controlar patógenos animais e vegetais na agricultura, levou ao desenvolvimento de bactérias resistentes a antimicrobianos (WHO, 2005). Considerando o aumento da demanda por alimentos probióticos e a possibilidade de interações entre as bactérias probióticas e o comensal intestinal, a transferibilidade dos genes de resistência deve ser bem compreendida (Jose et al., 2015).

A resistência a antimicrobianos pode ser intrínseca, como resultado de uma característica estrutural ou funcional, inerente de cada espécie (Costa; Silva Júnior, 2017). Um exemplo é a resistência dos lactobacilos à vancomicina. Vancomicina inibe o crescimento bacteriano ao interferir na síntese de peptidoglicano, que é um constituinte importante da parede celular bacteriana gram-positiva (Jose et al., 2015). Diversos estudos já demonstraram BAL resistentes à vancomicina (Ouoba et al., 2008; Costa et al., 2013; Rzepkowska et al., 2017; Colombo et al., 2020; Rotta et al., 2020). Além disso, a resistência a antimicrobianos também pode ser adquirida como resultado de mutações, induzidas por radiações ionizantes e não ionizantes, agentes

alquilantes ou espécies reativas de oxigênio (ROS) (Costa; Silva Júnior, 2017), ou através da aquisição de material genético exógeno presente anteriormente em outro microrganismo por meio de transferência horizontal (Kaktcham et al., 2012). A resistência intrínseca e a resistência adquirida exclusivamente através de mutações não são diretamente transferíveis. No entanto, se essas mutações ocorrerem em genes que possam ser mobilizados (por exemplo, integrados em plasmídeos ou transposons), eles podem se tornar transmissíveis por transferência horizontal, o que representa uma ameaça à disseminação da resistência entre bactérias, incluindo as não patogênicas (Courvalin, 2006).

Portanto, pode-se avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos através de métodos como concentração inibitória mínima (minimum inhibitory concentration - MIC) (CLSI, 2020), difusão em disco segundo Kirby-Bauer (1966) e através de equipamentos automatizados que utilizam o método MIC. Apesar da MIC e de técnicas automatizadas serem uma tendência, pela sua rapidez, o método de Kirby-Bauer continua sendo amplamente utilizado, devido ao seu baixo custo e a flexibilidade de seleção de drogas quando comparado com as demais técnicas (Turnidge et al., 2011).

3.5 Propriedades tecnológicas das BAL

Na indústria alimentícia, o termo *starter* se refere aos microrganismos que são adicionados ao produto com um propósito tecnológico (Mayo et al., 2021). Nesse contexto, as BAL são interessantes como culturas *starters* para a indústria, tendo em vista que podem desempenhar propriedades tecnológicas de interesse (García-Cano et al., 2019).

As BAL *starters* são utilizadas para iniciar e controlar os processos fermentativos, além de modificarem as características da matéria-prima e promoverem benefícios, como aumento das propriedades organolépticas, nutricionais e aumento de vida de prateleira. Destaca-se que as culturas *starters* são amplamente utilizadas na indústria de laticínios, especialmente na produção de produtos lácteos fermentados (García-Cano et al., 2019; Araújo-Rodrigues et al., 2021; Zotta et al., 2021). Segundo Bruno e Carvalho (2009), *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus* são consideradas as duas culturas *starters* industriais mais importantes.

Quando a BAL *starter* é responsável pela acidificação do leite, ela é considerada uma cultura primária, no entanto, se as BAL estão envolvidas no desenvolvimento do aroma e sabor do produto fermentado, elas são consideradas culturas secundárias ou adjuntas (Mayo et al., 2021; González-González et al., 2022). Além disso, o desenvolvimento de textura, sabor e aroma em produtos alimentícios fermentados, se dá por meio de alterações bioquímicas nos componentes do leite através dos processos de glicólise, lipólise e proteólise (Bintsis, 2018).

3.5.1 Capacidade de acidificação

Em processos de fermentação, as BAL desempenham um papel crucial através da acidificação, tendo em vista que atuam na conversão da lactose em ácido láctico e outros ácidos orgânicos, como os ácidos acético e fórmico (Sarhir et al., 2023).

Na elaboração de produtos lácteos, a rápida capacidade de acidificação da BAL e a intensidade da produção de ácido são dois fatores importantes (Lima et al., 2022). Quando a produção de ácido láctico é suficiente, a caseína coagula em seu ponto isoelétrico (pH 4,6), o que é fundamental na fabricação de queijos, caracterizando a firmeza da coalhada (Pasquale et al., 2019). A característica de reduzir o pH no início da fermentação é fundamental para a coagulação e redução de microrganismos contaminantes. Ademais, a acidificação de um produto a um pH próximo de 4,0 também permite uma maior conservação do produto fermentado, auxilia na dessoragem da coalhada e contribui no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos alimentos fermentados (Cabral et al., 2016).

A atividade acidificante de cada BAL está relacionada com a sua capacidade específica de decompor as substâncias no meio e torná-las capazes de assimilação (Penna et al., 2015). Logo, as BAL que são conhecidas como acidificantes rápidas, apresentam um potencial como culturas *starters*, enquanto as BAL que possuem uma atividade mais lenta, podem ser utilizadas como culturas secundárias (Lima et al., 2022).

Nesse contexto, atualmente várias BAL com diferentes capacidades de acidificação e fermentação são usadas como culturas *starters* (Sarhir et al., 2023). Segundo Bruno e Carvalho (2009), *Lactococcus* é o microrganismo mais utilizado para a produção de ácido nas fermentações lácteas, pois são capazes de converter rapidamente a lactose em ácido láctico. Salienta-se que as espécies *Lactococcus lactis*

subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* são as mais utilizadas para produção da grande maioria dos queijos (Mayo et al., 2021). Na sequência, destaca-se o *Streptococcus thermophilus*, sendo considerado a segunda cultura *starter* mais importante nesse sentido, pois é tradicionalmente usado como cultura primária na fabricação de queijos, como os queijos Emmental, Gruyère, Parmigiano, Grana, Mozzarella e Cheddar, além de ser utilizado na elaboração de iogurte. Já o *Leuconostoc* possui uma capacidade acidificante reduzida, sendo utilizado como uma cultura secundária nos produtos lácteos e em conjunto com outros microrganismos, com a finalidade de fornecer qualidade organoléptica aos produtos lácteos. Além disso, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* também podem ser usados como culturas adjuntas ou secundárias com o objetivo de desenvolver sabor (Bruno; Carvalho, 2009).

Ao investigar um microrganismo para aplicação como cultura *starter*, a capacidade acidificante é um fator importante a ser avaliado. Usualmente os autores avaliam a capacidade de acidificação cultivando a BAL em leite, medindo o pH ao longo do período de fermentação. No estudo desenvolvido por Terzic-Vidojevic et al. (2015), após 6h de incubação, o leite inoculado com *Lactococcus lactis* estava com pH abaixo de 5 (4,52 para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGAL1-4 e 4,70 para *Lactococcus lactis* ZGBP5-9), enquanto o leite inoculado com *Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium* estava com pH 5,46 e 5,48, respectivamente. O que demonstra a capacidade de *Lactococcus* acidificar rapidamente o leite. Entretanto, diversos estudos demonstraram que o pH do leite fermentado por BAL encontrava-se abaixo de 5,0, após 12 h de fermentação (Badis et al., 2004; Franciosi et al., 2009; Cabral et al., 2016; Salvucci et al., 2016; Araújo-Rodrigues et al., 2021). De acordo com Salvucci et al. (2016), este rápido potencial de acidificação é importante na elaboração de alimentos fermentados onde valores de pH mais baixos são desejados não apenas pelas propriedades organolépticas, mas também para prevenir o crescimento de microrganismos patogênicos.

3.5.2 Propriedades proteolíticas

As BAL possuem um sistema proteolítico muito importante para a produção de produtos lácteos fermentados (Motta; Gomes, 2015). Destaca-se que a proteólise é um pré-requisito para o crescimento das BAL no leite, e subsequente degradação das

proteínas do leite, sendo um fator de grande importância na produção de queijos, por exemplo (Forsythe, 2013).

O sistema proteolítico da BAL possui a capacidade de hidrolisar a caseína, principal componente da proteína do leite. Logo, as proteínas são convertidas em peptídeos e depois em aminoácidos. Os aminoácidos são essenciais para o crescimento bacteriano, pois as BAL os utilizam como fonte de nitrogênio (Liu et al., 2020; Kieliszek et al., 2021). Ademais, quando esses aminoácidos livres são catabolizados, formam-se compostos de aroma voláteis, incluindo, por exemplo, ácidos, aldeídos, álcoois e ésteres, ou compostos de enxofre (Agagündüz et al., 2022).

Nesse sentido, é importante frisar que os diferentes metabólitos produzidos pelas BAL são responsáveis pelas propriedades organolépticas dos produtos lácteos fermentados (Tulini et al., 2016). Na fabricação de queijos, por exemplo, os aminoácidos oriundos da proteólise são os principais precursores de compostos de sabor específicos (Motta; Gomes, 2015). Além disso, a proteólise também melhora a digestibilidade dos produtos lácteos, o que é de interesse da indústria de fórmulas infantis (García-Cano et al., 2019).

De acordo com Kieliszek et al. (2021), a atividade proteolítica das BAL varia muito em relação as espécies. Entre os cocos, as espécies mais ativas são *Lactococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, enquanto o menos ativo é *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. No que tange aos lactobacilos utilizados na indústria de laticínios, as espécies mais proteoliticamente ativas são *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus acidophilus*, enquanto a espécie menos ativa é *Lactiplantibacillus plantarum* (Lim et al., 2019; Kieliszek et al., 2021).

Devido ao conhecimento da importância da proteólise, diversos estudos têm analisado a capacidade proteolítica das BAL e, usualmente, os testes são realizados qualitativamente em ágar leite. Em estudo desenvolvido por Breyer et al. (2021) foram isolados microrganismos do leite de búfala e identificados como *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Staphylococcus*. Com o objetivo de estudar as propriedades das BAL, os autores selecionaram 11 microrganismos (*Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*), e destes somente um não demonstrou atividade proteolítica em ágar leite. Resultados similares foram encontrados por Araújo-Rodrigues et al. (2021), pois de 11 *Lactobacillus* spp. isolados do queijo Serpa DOP, somente 9 isolados demonstraram atividade proteolítica no ágar leite. Já Silva

et al. (2020) verificaram que somente 18 BAL, de um total de 37 isolados de produtos lácteos ovinos, demonstraram atividade proteolítica em ágar leite que variou entre 1,5 a 23 mm. Nos estudos de Rzepkowska et al. (2017), ao determinarem o perfil enzimático usando API ZYM, as BAL do gênero *Lactobacillus*, isoladas de soro de leite bovino, apresentaram baixa atividade proteolítica, com exceção de *Lactobacillus fermentum* S10, que apresentou alta atividade proteolítica. Já Sousa et al. (2020) isolaram BAL de soro de leite bovino (40 isolados), bubalino (37 isolados) e caprino (17 isolados). As BAL oriundas do soro de leite caprino apresentaram forte atividade proteolítica (~59% dos isolados) em ágar leite.

3.5.3 Propriedades lipolíticas

As BAL apresentam propriedades lipolíticas, embora sejam consideradas fracamente lipolíticas em relação às espécies dos gêneros *Penicillium* e *Pseudomonas* (García-Cano et al., 2019). No entanto, essa atividade desempenhada pelas BAL também contribui na promoção de propriedades importantes nos alimentos, sendo de interesse na fermentação de vegetais, aplicações em alimentos assados e desenvolvimento de sabor em produtos lácteos fermentados (Tanasupawat et al., 2015).

O processo de lipólise é responsável pela hidrólise de triglicerídeos do leite gerando ácidos graxos livres, glicerol e intermediários, como mono e diglicerídeos (Motta; Gomes, 2015; Agagüdüz et al., 2022). Esses compostos contribuem para o aroma e o sabor de alguns alimentos (Motta; Gomes, 2015). No amadurecimento do queijo, por exemplo, a lipólise é um processo bioquímico importante, considerando que os ácidos graxos livres que são gerados, são compostos sensoriais importantes que contribuem para o desenvolvimento do sabor do produto (Esteban-Torres et al., 2014).

Nesse sentido, para a BAL *starter* a atividade lipolítica é muito interessante, por quebrar a gordura do leite durante a maturação para induzir a produção de aroma sem dar um sabor rançoso ao produto (García-Cano et al., 2019; Yalçinkaya; Kılıç, 2019). Logo, o grau de lipólise de uma BAL é um fator importante a ser investigado para selecionar microrganismos utilizados como culturas *starters*.

Portanto, a atividade lipolítica de BAL também tem sido foco de diferentes estudos. García-Cano et al. (2019) isolaram 137 BAL de produtos lácteos e usaram p-

nitrofenil acetato como substrato para analisar a atividade lipolítica. Os autores verificaram que 50,3% dos isolados exibiram atividade lipolítica. Outros estudos também utilizaram ágar tributirina para avaliar a atividade lipolítica (Carpiné et al., 2010; Câmara et al., 2019; Silva et al., 2020; Araújo-Rodrigues et al., 2021). No entanto também há estudos que utilizam Tween-80 (Yalçinkaya; Kılıç, 2019; Colombo et al., 2020) e até mesmo banha de porco para detectar a atividade lipolítica (Carpiné et al., 2010). Em estudos desenvolvidos por Rzepkowska et al. (2017), as BAL isoladas de soro de leite bovino apresentaram baixa ou média atividade lipolítica, que foi determinada através de API ZYM. Já Araújo-Rodrigues et al. (2021) avaliaram a atividade lipolítica de 11 BAL isoladas de queijo Serpa DOP e somente 4 BAL do gênero *Lactobacillus* spp. demonstraram atividade enzimática. Silva et al. (2020) obtiveram resultados semelhantes, pois de 37 BAL isoladas de produtos lácteos ovinos, somente 5 demonstraram atividade lipolítica em ágar tributirina, com halos variando entre 7,30 a 15,4 mm. Resultados inferiores foram encontrados por Yalçinkaya e Kılıç (2019), tendo em vista que apenas 8 isolados, de um total de 73 BAL isoladas de azeitonas, apresentaram resultados positivos em ágar contendo Tween-80. Os autores ainda avaliaram de maneira quantitativa a atividade lipolítica, que foi medida entre 0,2 e 1,09 U/ml, em 27 isolados e, consideraram que apesar da baixa atividade lipolítica, isso foi vantajoso para utilizar a BAL como cultura *starter*.

3.6 Propriedades funcionais das BAL

Além de desempenhar propriedades tecnológicas, as BAL também têm sido amplamente estudadas em relação ao seu potencial probiótico (Ghahremani et al., 2015; Dlamini et al., 2019; Reuben et al., 2020; Breyer et al., 2021; Mohammed; Çon, 2021; Rodrigues et al., 2021). Probióticos são definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2002). Inclusive, é importante ressaltar que juntamente com espécies do gênero *Bifidobacterium*, diversas espécies de BAL já foram reconhecidas como probióticas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2020). Os microrganismos probióticos estão em evidência na atualidade, devido aos benefícios que promovem à saúde do consumidor (Syngai et al., 2016; Roobab et al., 2020; González-González et al., 2022; Lee et al., 2022).

Para um microrganismo ser considerado probiótico, ele deve ser capaz de exercer um efeito benéfico sobre os hospedeiros, deve ser não patogênico e não tóxico, ser capaz de sobreviver e metabolizar no ambiente intestinal, além de ser estável sob condições de armazenamento (FAO/OMS, 2002). Destaca-se que para seleção de microrganismos funcionais, a capacidade de sobrevivência do microrganismo ao trato gastrointestinal (TGI) do hospedeiro e a capacidade de aderir às células epiteliais são fatores importantes que devem ser avaliados. Essa capacidade permite a eliminação competitiva de microrganismos patogênicos no intestino, favorecendo a colonização e modulação de substâncias que produzem efeitos benéficos ao hospedeiro (Lando et al., 2023). A capacidade de adesão pode ser avaliada através de formação de biofilme *in vitro* (Stepanovic et al., 2004), autoagregação (Zuo et al., 2019) e hidrofobicidade da superfície (Thapa et al., 2004).

Ademais, as BAL também podem fornecer benefícios à saúde através de compostos funcionais em alimentos, como exopolissacarídeos (EPS), vitaminas, peptídeos bioativos e enzimas (Souza; Dias, 2017).

A produção de EPS por BAL está entre as propriedades funcionais mais promissoras. EPS são polímeros de açúcar produzidos naturalmente com um papel distinto e significativo, um dos quais é realçar o sabor e textura dos alimentos (Farid et al., 2021). Além disso, já foi relatado que os EPS possuem a capacidade de modular a microbiota intestinal e a resposta imune do hospedeiro, tendo em vista que são capazes de interagir diretamente com receptores intestinais (Souza; Dias, 2017; González-González et al., 2022).

As BAL também podem produzir vitaminas que possuem uma ação neuroprotetora, um efeito que pode impedir o desenvolvimento e a progressão de doenças neurodegenerativas. O ácido gama aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, é uma molécula que pode ser produzida por BAL (González-González et al., 2022). Em estudo desenvolvido por Kamiloğlu (2022), 8 BAL isoladas de salsicha fermentada turca mostraram-se produtoras de GABA, sendo *Lactobacillus plantarum* KS-25 o maior produtor. Ainda, os autores verificaram que os isolados foram produtores de EPS e mostraram atividade antioxidante.

As BAL são capazes de produzir β -galactosidase, uma enzima que ajuda a hidrolisar a lactose antes de atingir o cólon, onde sofre rápida degradação pela microbiota. Sob determinadas condições, essa enzima também pode sintetizar

açúcares complexos chamados galactooligosacarídeos, conhecidos como prebióticos (Fara et al., 2020; Lando et al., 2023).

Microrganismos funcionais também podem competir com patógenos por nutrientes, secretando substâncias como bacteriocinas, que eliminam ou reduzem a presença de patógenos (Tulini et al., 2016). Logo, a atividade antimicrobiana de BAL frente a microrganismos patogênicos é um tema de relevância para a indústria.

3.6.1 Biopreservação de alimentos

As BAL são importantes na biopreservação de alimentos, tendo em vista que são capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. Essa inibição exercida pelas BAL está relacionada com a produção de compostos antimicrobianos, nomeadamente ácidos orgânicos, ácido propiônico, ácido benzóico, diacetil, acetoína, peróxido de hidrogênio, ácidos graxos e bacteriocinas (Tulini et al., 2016).

De acordo com Bartkiene et al. (2020), a biopreservação de alimentos é a designação dada para os procedimentos e estratégias utilizados para a preservação de alimentos usando microrganismos seguros não patogênicos selecionados. Esses microrganismos protetores atuam prevenindo o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, protegendo os alimentos contra desenvolvimento de bolores e deterioração bacteriana, aumentando o prazo de validade dos alimentos, além de melhorar a segurança dos produtos.

Dentre os microrganismos que podem ser utilizados, as BAL destacam-se por produzirem metabólitos antimicrobianos e por serem reconhecidas como seguras para a saúde humana e além disso, estão presentes em diversos produtos alimentícios como microbiota natural desejável (Bartkiene et al., 2020; Silva et al., 2020) A atividade antibacteriana das BAL foi intensamente descrita em muitos estudos (Atanasova et al., 2014; Tulini et al., 2016; Rzepkowska et al., 2017; Cui et al., 2018; Silva et al., 2020). Vários deles examinaram um efeito antagônico da BAL contra espécies bacterianas indicadoras.

De acordo com Coman et al. (2014), os testes de antagonismo envolvem a detecção da inibição do crescimento de uma cepa indicadora causada pela bactéria em estudo. Atanasova et al. (2014) testaram a atividade antimicrobiana de BAL contra alguns patógenos alimentares, como *Escherichia coli* ATCC 11777, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Salmonella choleraesuis* ser. Enteritidis ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Listeria innocua* F e *Enterobacter aerogenes* ATCC

13048. Os isolados *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* demonstraram atividade antimicrobiana contra vários patógenos. Já nos estudos desenvolvidos por Cui et al. (2018), 12 BAL isoladas de queijo artesanal demonstraram atividade antibacteriana de amplo espectro contra bactérias enteropatogênicas gram-positivas e gram-negativas. Por sua vez, Silva et al. (2020) testaram a atividade antimicrobiana contra os microrganismos indicadores *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* D157:H7 ATCC 43895 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. No entanto, a atividade antimicrobiana foi observada em apenas uma BAL contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Na pesquisa desenvolvida por Tulini et al. (2016), os 815 isolados de leite e queijo de vaca, búfala e cabra foram testados quanto a atividade antimicrobiana. Apenas três isolados identificados como *Streptococcus uberis* (cepas FT86, FT126 e FT190) foram produtores de bacteriocinas, enquanto outros quatro identificados como *Weissella confusa* FT424, *Weissella helenica* FT476, *Leuconostoc citreum* FT671 e *Lactobacillus plantarum* FT723 apresentaram alta atividade antifúngica. Nos estudos desenvolvidos por Rzepkowska et al. (2017) foi avaliada a atividade antagônica das BAL, isoladas de soro de leite bovino, frente a cepas indicadoras: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Shigella* spp. (isolada de alimento). Os autores verificaram que a atividade antagonista das BAL foi maior para as espécies da família Enterobacteriaceae do que para as cepas de *Listeria monocytogenes*, tendo em vista que se obteve zonas de inibição maiores para *Escherichia coli* ATCC 10536 ($7,5 \pm 0,33$ mm) e menores para *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ($4,66 \pm 0,33$ mm). Já nos estudos de Sousa et al. (2020), a maioria dos isolados não foi capaz de inibir o crescimento de patógenos, porém cabe ressaltar que cerca de 50% das BAL isoladas de soro de leite caprino inibiram o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3.7 Prospecção de novas BAL como culturas autóctones

Historicamente, os humanos produziam alimentos fermentados utilizando a técnica de reinoculação, que consistia em utilizar a coalhada anterior ou massa fermentada ou produto previamente fermentado, como inóculo para reiniciar a

fermentação (Zotta et al., 2021; González-González et al., 2022). Isso levou à perda de diversidade microbiana natural em favor de um número menor de microrganismos adaptados a determinadas condições ambientais, em contrapartida também garantiu um certo controle sobre o processo de fermentação e reprodutibilidade (González-González et al., 2022).

Hoje em dia, fermentações espontâneas e não espontâneas são usadas na elaboração de produtos (González-González et al., 2022). Destaca-se que produtos obtidos por meio da fermentação espontânea são uma fonte para o isolamento de novos microrganismos com propriedades tecnológicas e funcionais (Tamang et al., 2016). Já para as fermentações não espontâneas, ou seja, processos controlados, usualmente se utiliza culturas *starters*, dentre as quais se destacam as BAL (Abarquero et al., 2023). O uso de BAL na fermentação de alimentos é uma técnica muito antiga, considerando que produtos lácteos fermentados, como iogurte e queijo, apareceram na dieta humana há cerca de 8.000 a 10.000 anos (Bintsis, 2018). Nesse contexto, prospectar BAL de alimentos fermentados é uma alternativa interessante para obtenção de culturas *starters* autóctones.

Uma cultura *starter* autóctone consiste em uma cepa ou um grupo de cepas microbianas bem adaptadas ao processo tecnológico, isoladas e selecionadas do produto original (Araújo-Rodrigues et al., 2021). As BAL autóctones podem fornecer um meio de promover a qualidade e a segurança dos produtos alimentares fermentados tradicionais, além de minimizar a perda de características típicas do produto que uma cultura comercial poderia causar (Câmara et al., 2019).

Na literatura há muitos estudos que visam avaliar a segurança e as características tecnológicas de BAL isoladas de variedades de queijos (Pavunc et al., 2012; Terzic-Vidojevic et al., 2015; Cabral et al., 2016; Câmara et al., 2019; Araújo-Rodrigues et al., 2021; Abarquero et al., 2023), leite fermentado (Obioha et al., 2021; Wirawati; Widodo, 2021; Paul et al., 2023), leite cru (Tulini et al., 2016; Farahani et al., 2017; Saidi et al., 2019; Tsuda; Kodama, 2021), carnes fermentadas (Klingberg et al., 2005; Landeta et al., 2013; Kamiloğlu, 2022; Milani et al., 2024) e vegetais fermentados (Beganovic et al., 2014; Sáez et al., 2018; Merabti et al., 2019), a fim de selecionar estas bactérias como culturas *starters* autóctones.

Ao avaliar as características tecnológicas de uma cultura *starter* autóctone, a capacidade de acidificação é uma das propriedades mais importantes das BAL *starters*. Na fabricação de queijos, uma rápida diminuição do pH é considerada crucial,

pois é essencial para a coagulação, firmeza da coalhada e controle de microrganismos indesejáveis (Ribeiro et al., 2013).

Além disso, o estudo da atividade enzimática do microrganismo também é essencial. Na produção de um queijo por exemplo, as BAL desempenham um papel importante nos eventos bioquímicos que ocorrem durante a maturação, como a proteólise e a lipólise, que contribuem significativamente para o desenvolvimento de sabor e aroma (Abarquero et al., 2023). As BAL também são conhecidas por produzirem substâncias que possuem atividade antimicrobiana (Bintsis, 2018). A principal atividade antimicrobiana das BAL se deve à produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas que impedem o crescimento de microrganismos patogênicos ou deteriorantes (Abarquero et al., 2023). Além disso, ao investigar o potencial da cultura *starter*, pode-se averiguar se a BAL produz compostos como diacetil, acetoína e EPS, pois estes influenciam no aroma e na textura dos alimentos fermentados (Ribeiro et al., 2013).

Outro fator a ser avaliado é a capacidade do microrganismo produzir gás. Quando essa produção é indesejada, ocorre o aparecimento de rachaduras em queijos, resultando em perdas financeiras para a indústria de laticínios (Porcellato et al., 2015). Enquanto em outros produtos a produção de gás é desejável e necessária, aumentando assim o número e/ou o tamanho das olhaduras em queijos como, por exemplo, Gouda, Edam e Danbo (Fröhlich-Wyder et al., 2013; Pedersen et al., 2013).

Devido as possíveis aplicações das BAL *starters*, estas devem ser capazes de tolerar diferentes condições adversas, como desafios ácidos e osmóticos, estresses térmicos e congelamento, encontrados na produção industrial e durante o armazenamento de preparações e alimentos (Reale et al., 2015). Na produção de queijos, por exemplo, as BAL são expostas a diferentes temperaturas e altas concentrações de sal e devem tolerar essas condições (Ribeiro et al., 2013).

3.8 Desenvolvimento de novos produtos a partir de culturas autóctones

O desenvolvimento de produtos fermentados com culturas autóctones vem se tornando uma realidade e tem ganhado destaque crescente nos últimos anos (Lima et al., 2022). Ademais, o uso dos microrganismos autóctones é interessante, considerando que isso possibilita elaborar um produto típico mantendo as características sensoriais originais desejadas (Mangia et al., 2013).

Os alimentos fermentados estão em evidência devido ao conhecimento dos mecanismos envolvidos na promoção da saúde (Rezac et al., 2018). De acordo com Rastogi et al. (2022), os alimentos fermentados possuem propriedades únicas, como propriedades probióticas, antimicrobianas, antioxidantes, produção de peptídeos, entre outras propriedades que proporcionam benefícios à saúde dos consumidores.

Além das questões relacionadas à saúde, os novos produtos fermentados devem possuir qualidade nutricional, além de ter uma associação com impactos ambientais mínimos, também devem buscar promover o desenvolvimento econômico e social (Lima et al., 2022). Estima-se que até 2030, a produção de alimentos por meio da biotecnologia deve crescer em pelo menos 50%, impactando na geração de novos produtos e na preservação de alimentos e bebidas tradicionais (Omolulu et al., 2020). Portanto, estratégias para elaborar produtos através da fermentação e o uso de microrganismos autóctones resultam em produtos inovadores, que podem impulsionar a economia de um local.

3.8.1 Queijo colonial artesanal

A produção de queijos no Brasil se iniciou, possivelmente, com os queijos originados de Portugal (Araújo et al., 2020). Após isso, diferentes tipos de queijos foram desenvolvidos no país, com destaque para o estado de Minas Gerais como o maior produtor de queijos no Brasil. Além dele, estados como Goiás, São Paulo, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraná, Santa Catarina, Pará e Rio Grande do Sul já são regiões conhecidas pela tradição na produção de queijo (SENAR, 2022).

Os queijos são um produto que tem grande importância econômica, social e cultural no estado do Rio Grande do Sul (EMBRAPA, 2021). Trata-se de uma importante herança cultural da colonização, pois o saber-fazer foi transmitido de geração em geração entre os descendentes de imigrantes europeus (Ambrosini et al., 2020). Além disso, o queijo era produzido inicialmente na propriedade para consumo familiar, mas o produto excedente passou a ser comercializado, tornando-se uma fonte de renda para muitas famílias (Braccini et al., 2020; Piecha; Zanini, 2023).

Hoje em dia, no estado do Rio Grande do Sul destacam-se o queijo colonial, o queijo colonial temperado, o queijo serrano e os queijos artesanais (SEBRAE, 2023). Dentre eles o queijo artesanal é muito difundido, pois é produzido em pequenas

propriedades com condições artesanais de fabricação, resultando em produtos com características únicas (Penna et al., 2021). Segundo a Lei nº 15615/2021, de 13 de maio de 2021, o queijo artesanal é aquele elaborado com leite cru da própria fazenda, com métodos tradicionais, com vinculação de território de origem, conforme Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade estabelecido para cada tipo e variedade, sendo permitida a aquisição de leite de propriedades rurais próximas, desde que atendam a todas as normas sanitárias pertinentes (Rio Grande do Sul, 2021).

Cada tipo de queijo possui um processo de produção específico, tempo de coagulação, ingredientes, tempo de maturação, microbiota natural autóctone, entre outros aspectos que caracterizam o produto final. São essas diferenças entre as variedades de queijos artesanais que mantêm as características únicas do produto e os diferenciam dos produtos industrializados (Margalho et al., 2020; Jesus Filho et al., 2023). Além disso, há uma diversidade de queijos artesanais utilizando leite de diferentes espécies animais, como leite bovino, bubalino, caprino e ovino (EMBRAPA, 2021). Em geral, no estado do Rio Grande do Sul predominam os queijos produzidos com leite bovino. Enquanto isso, queijos produzidos com leite oriundo de outras espécies ficam mais restritos a locais onde há a criação desses rebanhos.

Além disso, é importante frisar que microrganismos autóctones podem ser isolados de produtos como o queijo artesanal. Estes podem ser identificados, caracterizados e estudados como culturas *starters* autóctones, o que possibilita sua aplicação na elaboração de produtos típicos, mantendo características originais e sensoriais desejadas (Mangia et al., 2013). Nesse contexto, encontram-se alguns estudos na literatura envolvendo o isolamento, a avaliação de segurança e a caracterização tecnológica das BAL autóctones, bem como sua aplicação em produtos, como queijo Parmesão (Santos, 2015) e queijo muçarela de búfala em São Paulo (Silva, 2015), queijo coalho em Minas Gerais (Cavalcante et al., 2007), queijo Santo Giorno (Pereira et al., 2017) e queijo regional (Todescato, 2014; Brandielli, 2016), ambos da região Sudoeste do Paraná. Percebe-se uma lacuna a ser investigada em relação aos queijos do estado do Rio Grande do Sul, especialmente no que tange utilizar os microrganismos autóctones para produzir produtos semelhantes às características originais.

3.8.2 Leite fermentado

Produtos lácteos fermentados são considerados os primeiros alimentos funcionais (Abdel-Hamid et al., 2019). Há uma demanda crescente por esses alimentos, com destaque para os laticínios fermentados, em função dos benefícios nutricionais e à saúde (Aguilar-Toalá et al., 2017; How et al., 2022).

Destaca-se que a Instrução Normativa nº 46/2007, de 23 de outubro de 2007, define leite fermentado como “produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos”. A Instrução Normativa ainda traz as denominações dadas aos produtos lácteos fermentados: iogurte, leite fermentado, kefir, leite acidófilo, kumys e coalhada (Brasil, 2007).

Dentre os lácteos fermentados, o leite fermentado é um produto de interesse dos consumidores por ser fácil de consumir. Para a elaboração do leite fermentado, as BAL são usualmente incorporadas ao leite para fermentação (How et al., 2022). O processo de fermentação ocorre com o nível de pH diminuindo gradualmente à medida que o ácido láctico se acumula com a fermentação da lactose. Depois que o pH reduz para atingir o ponto isoelétrico da caseína, a caseína precipita, causando a formação de coágulos. Ao final desse processo, são produzidas moléculas orgânicas como acetaldeído, diacetil, ácido acético e etanol, melhorando o perfil de sabor (Agagündüz et al., 2022; Bintsis; Papademas, 2022).

De acordo com Bintsis e Papademas (2022), os leites fermentados comercializados hoje em dia são fabricados usando leite pasteurizado, práticas mais higiênicas e uma mistura de culturas *starters* definidas, o que visa garantir a segurança do alimento. No entanto, o uso do leite tratado termicamente e de culturas *starters* definidas causam uma redução na diversidade microbiana. Nesse contexto, há estudos que buscam elaborar leites fermentados utilizando culturas adjuntas isoladas da microbiota autóctone, a fim de “devolver” a diversidade perdida e manter características originais do produto. No estudo desenvolvido por Bendimerad et al. (2012), *Lactococcus* e *Leuconostoc* foram isolados de leite cru e leite fermentado e avaliados quanto a suas características tecnológicas para serem usadas na fabricação do leite fermentado Raib, preservando suas características tradicionais. Já no estudo de Sarhir et al. (2023), o leite fermentado tradicional marroquino “Lben” foi fabricado

usando fermentos autóctones de forma isolada e em conjunto (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*). Os autores concluíram que ao utilizar a cultura mista o leite fermentado exibia um perfil volátil satisfatório e aceitável em comparação com o Lben produzido com linhagens únicas.

Além disso, há uma ampla gama de estudos que, além de estudar as características de fermentação e do produto elaborado, também avaliam as atividades biológicas do leite fermentado, como capacidade antioxidante (Liang et al., 2022; Handa et al., 2022; Lee et al., 2023), capacidade anti-hipertensiva (Abdel-Hamid et al., 2019), capacidade antidiabética (Khakhariya et al., 2023), capacidade antimicrobiana (Ashokbhai et al., 2022) e anti-inflamatória (Santiago-López et al., 2019; Khakhariya et al., 2023), demonstrando assim inúmeros benefícios desses produtos à saúde do consumidor.

Ademais, destaca-se que o leite de várias espécies de mamíferos pode ser utilizado para a fabricação de leite fermentado, mas o leite de vaca é a base para a maioria dos produtos lácteos fermentados em todo o mundo (Bintsis; Papademas, 2022). No Brasil, o leite de búfala é o segundo leite mais consumido e, considerando que é um produto que vem crescendo ao longo dos anos, há uma lacuna a ser pesquisada em relação aos produtos lácteos fermentados de origem bubalina.

3.9 Hidrolisados bioativos a partir de proteínas alimentares

A hidrólise das proteínas é um tema que vem sendo amplamente estudado, tendo em vista que os hidrolisados produzidos podem apresentar importantes funções biológicas, que são atribuídas aos peptídeos originados durante a hidrólise (Ahangari et al., 2021). Apesar de alguns peptídeos bioativos existirem naturalmente, a grande maioria dos peptídeos bioativos conhecidos são fragmentos proteicos liberados através da hidrólise de proteínas, ou seja, estes peptídeos não apresentam atividades biológicas enquanto parte da proteína precursora (Sánchez; Vázquez, 2017).

A produção de hidrolisados bioativos a partir de proteínas pode ser realizada por hidrólise enzimática, usando enzimas proteolíticas, ou através de bioprocessos microbianos, onde o microrganismo secreta proteases durante seu crescimento, que atuam na hidrólise do substrato proteico (Samaranayaka; Li-Chan, 2011). No âmbito de bioprocessos microbianos, destacamos as BAL, pois durante a fermentação do leite, estas produzem enzimas proteolíticas através da degradação parcial da caseína

(Rodríguez-Figueroa et al., 2010), o que pode desencadear na hidrólise da proteína em aminoácidos e peptídeos bioativos (Ashokbhai et al., 2022).

Há um crescente interesse científico nos peptídeos bioativos oriundos da hidrólise da proteína do leite, tendo em vista que há evidências que indicam que esses peptídeos podem ser uma ferramenta valiosa contra diferentes doenças humanas (Aguilar-Toalá et al., 2017). Por exemplo, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os peptídeos bioativos possuem atividades biológicas, como atividade antioxidante (Abdel-Hamid et al., 2017; Aguilar-Toalá et al., 2017; Ashokbhai et al., 2022; Cui et al., 2022), anti-hipertensiva (Abdel-Hamid et al., 2017; Solanki et al., 2017; Khakhariya et al., 2023) anti-inflamatória (Aguilar-Toalá et al., 2017), antimicrobiana (Ashokbhai et al., 2022) e atividade antidiabética (Khakhariya et al., 2023).

3.9.1 Capacidade antioxidante

Os radicais livres são produzidos em condições fisiológicas normais, mas quando estes são produzidos em excesso e a capacidade antioxidante do organismo não é capaz de inativá-los, ocorre o estresse oxidativo. Através desse processo geram-se as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que podem causar estresse oxidativo e nitrosativo, respectivamente. O estresse oxidativo contribui para diversas doenças crônicas e degenerativas, como esclerose múltipla, câncer, doenças cardiovasculares, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (Gu; Wu, 2016; Zhu et al., 2022).

Muitas reações de oxidação também envolvem vários componentes alimentares, como carboidratos, proteínas e lipídios. Por exemplo, a oxidação lipídica resulta em ranço e deteriora a qualidade dos alimentos. Além disso, a oxidação lipídica causa o desenvolvimento de cor escura indesejável, sabores e odores desagradáveis, o que resulta em um prazo de validade reduzido de alimentos que contêm gordura (Sah et al., 2016). Nesse contexto, a prevenção da oxidação lipídica é um desafio para a indústria.

Um antioxidante é um composto químico que pode interromper reações em cadeia de radicais, eliminando espécies reativas, incluindo espécies reativas de oxigênio/nitrogênio, evitando a formação de oxidantes reativos e inibindo processos como a peroxidação lipídica em alimentos (Sah et al., 2016). A indústria tem utilizado antioxidantes sintéticos na produção de alimentos, contudo efeitos adversos à saúde

humana têm sido reportados. Aliado a isso, os consumidores têm demonstrado preocupação com a saúde humana, o que tem gerado uma crescente demanda por alimentos e ingredientes naturais, nutritivos e funcionais (Lorenzo et al., 2018).

Portanto, alternativas como hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos são de relevante interesse. Estes exercem sua atividade através da transferência de hidrogênio e da doação de elétrons para moléculas oxidantes (Lorenzo et al., 2018). Experimentos *in vitro* são empregados para avaliar a inativação de radicais livres. Dentre eles, destaca-se a inativação do radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS) e do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

O potencial antioxidante de hidrolisados proteicos e peptídeos também pode ser avaliado através da capacidade em quelar e/ou reduzir íons metálicos (Nwachukwu; Aluko, 2019). O poder redutor está relacionado à habilidade do antioxidante em reduzir compostos intermediários oxidados que podem contribuir para peroxidação lipídica (Liu et al., 2017). Outro ensaio que pode ser utilizado tem a finalidade de mensurar a capacidade do antioxidante em quelar íons ferrosos (Fe^{2+}) (Alam et al., 2013).

Nesse contexto, Aguilar-Toalá et al. (2017) elaboraram leites fermentados com cepas de *Lactobacillus plantarum* e investigaram as bioatividades dos extratos brutos e frações peptídicas obtidas desse produto. Os autores observaram que o extrato bruto dos leites fermentados apresentou maior capacidade antioxidante (variando de ~100 a 270 $\mu\text{mol/L}$ de equivalentes de Trolox pelo ensaio ABTS, e de ~250 a 350 μmol de equivalentes de Trolox pelo ensaio que determina a capacidade de absorção de radicais de oxigênio - ORAC) do que as frações peptídicas. Já no trabalho de Abdel-Hamid et al. (2019), o leite fermentado por *Lactobacillus casei* ATCC 393 apresentou atividade antioxidante (pelo método ABTS e quelante de ferro) para o extrato solúvel em água e seu filtrado. Contudo, o filtrado apresentou maior atividade antioxidante do que o extrato solúvel, sugerindo que pequenos peptídeos têm maior atividade antioxidante (Abdel-Hamid et al., 2019). Há muitos estudos na literatura com leite fermentado por espécies de *Lactobacillus* que demonstraram atividade antioxidante (Abdel-Hamid et al., 2017; Ashokbhai et al., 2022; Cui et al., 2022), contudo estudos que utilizam *Lactococcus lactis* são mais escassos (Liang et al., 2022).

3.9.2 Potencial anti-hipertensivo

Diversas rotas bioquímicas que interagem entre si são responsáveis por controlar a pressão arterial, com destaque para o sistema renina-angiotensina que é fundamental nesta regulação. Durante a regulação normal da pressão arterial, a renina converte o angiotensinogênio em um fragmento de peptídeo inativo chamado angiotensina I. Em seguida, a enzima conversora de angiotensina (do inglês angiotensin converting enzyme - ACE), converte angiotensina I em angiotensina II. A ACE também é capaz de degradar a bradicinina, um vasodilatador (Aluko, 2015). Portanto, fármacos capazes de inibir a ação da ACE são foco de investigação.

Diferentes hidrolisados proteicos e peptídeos foram avaliados quanto à sua potencial aplicação como precursores de peptídeos inibidores da ACE (Gu; Wu, 2016). O potencial anti-hipertensivo é avaliado, geralmente, através da capacidade de inibir a atuação da ACE, *in vitro* (Bechaux et al., 2019).

Inúmeros fármacos que são utilizados como inibidores da ACE para tratar a hipertensão arterial podem ter efeitos adversos no paciente, como angioedema e tosse seca. Logo, biomoléculas que possuem um número reduzido de efeitos colaterais são de crescente interesse. Nesse contexto, os peptídeos obtidos através de hidrólise de proteínas alimentares podem ser de grande interesse (Bechaux et al., 2019).

No estudo de Solanki et al. (2017), foram desenvolvidos leites fermentados de camelo com *Lactobacillus bulgaricus* NCDC (09) e *Lactobacillus fermentum* TDS030603 (LBF), que foram avaliados quanto à sua atividade inibidora da ACE. Os autores observaram que a atividade inibitória da ACE aumentou de 0 a 48 h em ambas as culturas lácticas, sendo que 09 exibiu maior atividade inibitória da ACE (76,75%) do que LBF (73,93%), no período de 48 h. Já Khakhariya et al. (2023) avaliaram a ACE de leite de camelo e de búfala fermentado com *Lacticaseibacillus paracasei* (M11) e *Saccharomyces cerevisiae* (WBS2A). Os autores observaram que o leite fermentado de búfala e de camelo apresentou atividade inibitória da ACE variando de 45,77 – 76,73% e 46,56 – 80,74%, respectivamente, durante 12 – 48 h. Os níveis máximos de atividade inibitória da ACE foram encontrados no leite fermentado de búfala e de camelo às 48 h, 76,73% e 80,74%, respectivamente. Por sua vez, Abdel-Hamid et al. (2017) avaliaram a ACE de peptídeos gerados a partir de proteínas do leite de búfala por hidrólise enzimática utilizando papaína, pepsina ou tripsina. Observou-se que o hidrolisado de papaína apresentou a maior atividade inibitória da

ACE, variando entre 9 a 49 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, observa-se uma lacuna no estudo de leite de búfala fermentado com a espécie de *Lactococcus lactis*.

4. METODOLOGIA

4.1. Leite de búfala

O leite de búfala utilizado neste trabalho foi coletado na Estação Experimental Agronômica (EEA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizada em Eldorado do Sul/RS. A obtenção do leite de búfala seguiu as Boas Práticas Agropecuárias (BPA), através de uma ordenha mecânica (Domenico, Motta, 2022). As amostras foram acondicionadas em recipientes estéreis e em caixas isotérmicas para transporte. O leite de búfala foi encaminhado para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) para produção do soro de leite de búfala e para o Laboratório da Planta de Laticínios do Instituto Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) para produção do queijo colonial de búfala.

4.2. Produção do soro de leite de búfala

Para obter o soro de leite de búfala, 1 litro de leite cru de búfala foi aquecido até 40 °C e foi adicionado coagulante líquido HA-LA (5 mL diluído em 25 mL de água) e cloreto de cálcio (0,5 g). Após 30 min de repouso a massa foi cortada e a coalhada foi coada, obtendo-se aproximadamente 800 mL de soro e 198,33 g de massa coalhada.

4.3. Análises físico-químicas do soro de leite de búfala

O soro de leite de búfala foi liofilizado no ICTA e encaminhado para a empresa Sooro Renner Nutrição S/A que realizou a caracterização físico-química. A gordura, acidez, proteína, lactose, pH, umidade, cinzas, cloretos, sódio e potássio foram determinados de acordo com o Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2019).

4.4. Análises microbiológicas do soro de leite de búfala

Para a caracterização microbiológica do soro de leite de búfala foi empregada a Instrução Normativa nº 30/2018 (Brasil, 2018). Um total de 1 mL da amostra de soro de leite de búfala foi diluída em 9 mL de solução salina estéril (0,85%), e seis diluições seriadas foram realizadas, em triplicata. Para a contagem dos microrganismos mesófilos, cada diluição foi plaqueada em meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA;

Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e incubadas a 37 °C por 48 h. O resultado foi expresso como a média das contagens multiplicada pelo fator de diluição utilizado em UFC/mL. A contagem de coliformes totais e termotolerantes foi realizada em ágar violeta vermelho bile (do inglês *violet red bile agar* (VRBA); Biolog, Belo Horizonte, MG, Brasil), após incubação a 37 °C por 24 h. Para provas confirmativas de coliformes totais, as colônias suspeitas foram inoculadas em caldo verde brilhante bile 2% lactose (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil) e incubadas a 37 °C por 24 a 48 h. Para confirmação da presença de coliformes termotolerantes, foi realizada a inoculação de colônias suspeitas em caldo EC (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil), incubados em 45 °C, em banho-maria, por 24 a 48 h.

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo foi obtida pela técnica de plaqueamento das diluições seriadas em ágar Baird Parker (BP; Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), incubado a 37 °C por 30 a 48 h. Colônias típicas foram selecionadas para a prova da coagulase com plasma de coelho (LaborClin), incubados a 37 °C por 6 h. Foi realizada a Pesquisa de *Listeria monocytogenes*, com enriquecimento seletivo, realizado em duas etapas. A primeira etapa em caldo UVM (BD Difco, Le Pont de Claix, França) e a segunda em caldo Fraser (Merck, Darmstadt, Germany), ambas incubadas a 30 °C por 24 h. O isolamento foi realizado em ágar Oxford (AO; Himedia, Mumbai, Índia), incubado a 30 °C por 24 h. A presença de colônias escuras rodeadas por halo negro indica a presença de *Listeria monocytogenes*. Foi realizada a Pesquisa de *Salmonella* sp. com pré-enriquecimento em solução salina peptonada 1% tamponada a 37 °C por 16 a 20 h. Em seguida, foi realizado o enriquecimento seletivo em caldo Rappaport Vassiliadis (Merck, Darmstadt, Germany) e caldo Selenito-Cistina (Himedia, Mumbai, Índia), incubados em banho-maria a 41 °C por 24 h. O isolamento foi realizado em ágar *Xylose Lysine Desoxycholate* (XLD; Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil), incubado a 37 °C por 24 h. A presença de colônias vermelhas com ou sem centros pretos indica a presença de *Salmonella* sp.

4.5. Contagem, seleção e isolamento de BAL do soro de leite de búfala

Para a contagem e o isolamento de BAL, foi realizado o plaqueamento das diluições seriadas em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS; Merck, Darmstadt, Germany) e ágar M17 (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), incubados em aerobiose a 37 °C por 48 h e em anaerobiose a 30 °C por 48 h. O resultado da contagem das BAL foi expresso em UFC/mL. Colônias com características morfológicas de BAL foram

selecionadas e caracterizadas preliminarmente através da coloração de Gram e teste da catalase. Apenas as culturas Gram-positivas e catalase negativa, características de BAL, foram selecionados e encaminhadas para identificação.

4.6. Identificação de isolados bacterianos por MALDI-TOF/MS

As culturas selecionadas foram identificadas por espectrometria de massa *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight* (MALDI-TOF) através da técnica de transferência direta. Essa técnica consistiu na deposição de uma pequena quantidade de amostra da cultura, previamente isolada em placa com ágar MRS, sobre um *spot* na placa alvo do MALDI-TOF e em seguida, a amostra foi coberta com matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). As análises foram realizadas em MALDI Biotyper 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e após o espectro da amostra ser obtido, o *software* MBT RTC (Real Time Classification) identificou a melhor correspondência comparando com os espectros armazenados no banco de dados do equipamento, gerando assim resultados com diferentes escores de confiabilidade. Escores ≥ 2.000 indicam identificação em nível de espécie, um escore de 1.700 a 1.999 indicam identificação em nível de gênero e um escore < 1.700 foi interpretado como sem identificação.

4.7. Avaliação da atividade enzimática

A verificação das propriedades enzimáticas das BAL foi realizada de acordo com Bogo et al. (2017), com modificações. Para a atividade proteolítica, as culturas bacterianas foram inoculadas em ágar-leite (ágar triptona de soja – TSA (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) + 10 % de leite UHT) e incubadas a 30 °C por 48 h. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usado como controle positivo. O aparecimento de zonas claras ao redor da colônia identificou atividade enzimática e os resultados foram expressos em milímetros (mm). Para a atividade lipolítica, os isolados bacterianos foram inoculados em meio de cultura ágar tributirina [peptona (5 g/L), ágar (15 g/L), extrato de levedura (3 g/L) e tributirina (10 mL/L)] e incubados à temperatura de 30 °C por 48 h. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi usada como controle positivo. O aparecimento de zonas claras ao redor da colônia representou atividade enzimática e os resultados foram expressos em milímetros. Para verificação da produção de lecitinase as bactérias foram inoculadas em ágar BP, suplementado com emulsão de gema de ovo com telurito a 10% (NewProv, Pinhais, PR, Brasil). As

placas foram incubadas a 30 °C por 48 h. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usado como controle positivo. O aparecimento de zonas opacas ao redor das colônias foi indicativo de atividade enzimática e os resultados foram expressos em milímetros (mm). Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.8 Atividade antimicrobiana das BAL

A atividade antimicrobiana das BAL frente a *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi avaliada através do método da picada (Coman et al., 2014). Foi realizada uma suspensão das culturas patogênicas em solução salina estéril (0,85%), conforme a Escala de McFarland de 0.5 (10^8 UFC/ml). Cada suspensão foi espalhada com suabe sobre placas de ágar Muller Hünton (MH; BD, Franklin Lakes, EUA), e em seguida, as BAL foram inoculadas com agulha de platina. A suscetibilidade dos patógenos às BAL foi avaliada medindo-se o diâmetro (mm) da zona de inibição do crescimento bacteriano ao redor das BAL após incubação a 37 °C por 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9 Avaliação da inocuidade das BAL

Para a atividade hemolítica, os isolados foram inoculados em *Columbia Blood Agar* (CBA; Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (New Prov) e incubadas a 37 °C até 48 h. As placas de ágar sangue foram examinadas quanto a sinais de β -hemólise (zonas claras ao redor das colônias), α -hemólise (zonas em tons de verde ao redor das colônias) ou γ -hemólise (sem zonas ao redor das colônias) (Breyer et al., 2021). Para as hidrólises de gelatina, os isolados foram inoculados com agulha de platina em tubos de gelatina e incubados a 37 °C por 24 h, seguido por 20 min a 4 °C; na sequência, a atividade da gelatinase foi avaliada analisando a consistência do meio. Os experimentos foram realizados em triplicata. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usado como controle positivo para ambos os testes (Dias et al., 2019).

4.10 Seleção de um microrganismo

O presente estudo objetivou isolar BAL do soro de leite de búfala e caracterizar estes microrganismos, para posteriormente selecionar o isolado com maior atividade

proteolítica em ágar leite. Nesse contexto, foi selecionado o microrganismo identificado pelo MALDI-TOF como *Lactococcus lactis* 32B4-1.

Na sequência deste estudo, a espécie *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi confirmada através de identificação molecular, caracterizada quanto a sua produção de protease e potencial probiótico. Além disso, *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi aplicada como uma cultura *starter* na produção de um leite fermentado de búfala e, em associação com *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5, na elaboração de um queijo colonial de búfala. A BAL *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 foi isolada do leite bubalino em um estudo anterior, no qual foram analisados sua inocuidade, propriedades tecnológicas e potencial probiótico (Breyer et al., 2021).

4.11 Identificação Molecular de *Lactococcus lactis* 32B4-1

A identificação da BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi confirmada por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA usando Automated Sanger Applied Biosystems AB 3500 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA). O DNA total foi extraído por extração de lise térmica (Dashti et al., 2009), e as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas usando os primers universais 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') e 530R (5'-CCGCGGCTGCTGGCACGTA-3'), em 25 µL de reação usando 1 U Platinum Taq DNA polimerase (Thermo Fischer Scientific), 20 mM dNTP, 50 mM MgCl₂ e 10 pmol de cada primer. As condições da PCR foram as seguintes: 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min30s e 72 °C por 1 min30s; e 72 °C por 4 min. As amplificações foram confirmadas durante eletroforese em gel de agarose 1,0%, após purificação com ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems) e quantificado em espectrofotometria Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Ambas as fitas de cada amplicon foram sequenciados com um AB3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas pela ACTGene Análises Moleculares Ltda (Porto Alegre, RS, Brasil). Os dados das sequências parciais de 16SrDNA foram analisados pelos *softwares* Genious e BLAST-NCBI.

4.12 Produção de protease utilizando *Lactococcus lactis* 32B4-1

Na sequência do estudo, a BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi selecionada para produção de protease por demonstrar a maior atividade proteolítica em ágar leite (22,67 ± 0,58 mm).

A atividade proteolítica do isolado *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi detectada qualitativamente e quantitativamente. Para análise qualitativa foi utilizado o método de hidrólise de ágar leite desnatado (Lim et al., 2019), com modificações. A bactéria foi inoculada em ágar MRS e incubada em aerobiose a 30 °C por 48 h. Posteriormente, a BAL foi inoculada, através do método de picada, em ágar leite preparado em diferentes pH (4, 5, 6, 7 e 8) e incubada em diferentes temperaturas (25, 30, 37 e 45°C). A atividade proteolítica foi indicada pela ocorrência de zona de hidrólise clara ao redor da colônia. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para avaliação quantitativa, a BAL foi inoculada em ágar MRS e incubada em aerobiose a 30 °C por 48 h. Uma colônia da BAL cultivada foi transferida para o caldo MRS. Para a preparação dos inóculos, a cultura bacteriana foi diluída (1:100) em 100 ml de MRS (Mustafa et al., 2020) e incubada em diferentes condições. A influência do tempo de cultivo, pH inicial e temperatura de fermentação na atividade da protease de *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi analisada através da abordagem denominada *one-variable-at-a-time* (OVAT) em fermentação submersa (Rathod; Pathak, 2016). Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer, sem agitação. As condições de fermentação no meio básico MRS foram otimizadas da seguinte forma: pH (5, 6 e 7), temperatura (25, 30, 37 e 45 °C) e tempo de incubação (0, 2, 4, 6, 12, 16, 24, 30, 36, 48, 54, 72 h). Os cultivos foram centrifugados (10.000 × g, 20 min) e os sobrenadantes usados como fonte de protease bruta para determinação da atividade proteolítica.

A atividade proteolítica foi verificada usando azocaseína como substrato enzimático. O meio reacional foi constituído por 100 µL de tampão Tris-HCl (100 mM, pH 6,00), 100 µL de azocaseína (10 g/L preparada no mesmo tampão) e 100 µL da enzima. Após incubação a 37 °C por 30 min, as reações foram finalizadas pela adição de 600 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA; 100 g/L). Subsequentemente à centrifugação (10.000 × g, 5 min), 800 µL do sobrenadante foram misturados a 200 µL de NaOH (1,8 M) e a absorbância desta mistura mensurada a 420 nm em espectrofotômetro (Lim et al., 2019). Uma unidade (U) de atividade proteolítica foi definida arbitrariamente como a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,01 unidade de absorbância nas condições do ensaio (Daroit et al., 2009).

Ao avaliar o tempo de incubação também foi avaliada a densidade óptica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro SP-220 e pH do meio com auxílio de phmetro de bancada (PHS-3E-BI SATRA). Além disso, foi determinado o número de células

viáveis (UFC/mL) ao longo do período de incubação, conforme descrito por Milles et al. (1938).

4.13 Produção de biofilme

Para produção de biofilme, o método descrito por Stepanovic et al. (2004) foi empregado com modificações. A BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi previamente cultivada em ágar M17, incubada a 30 °C por 24 h. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foi cultivado em ágar TSA, incubado a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, os isolados foram ressuspensos individualmente em solução salina estéril (0,85%) e ajustados de acordo com o padrão 0,5 da escala McFarland. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato (96 poços). Para o controle negativo, a primeira coluna da microplaca foi inoculada apenas com 180 µL de caldo soja triptonada (do inglês soy tryptone broth - TSB). Para o controle positivo, na segunda coluna os poços foram preenchidos com 180 µL de caldo TSB e 20 µL de suspensões de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (Moura et al., 2015). Para a bactéria em estudo, na terceira coluna os poços foram preenchidos com 180 µL de caldo MRS e 20 µL de suspensões bacterianas de *Lactococcus lactis* 32B4-1. As placas de microtitulação foram incubadas em temperatura ambiente por 72 h para permitir a adesão celular e formação de biofilme, conforme descrito por Borucki et al. (2003). Após a incubação, os poços foram aspirados e as amostras lavadas três vezes com 200 µL de solução salina estéril (0,85%). A fixação bacteriana foi realizada com 200 µL de metanol 99,8% (PA) por 20 min. O metanol foi então aspirado e as microplacas foram invertidas e deixadas para secar durante a noite à temperatura ambiente. O procedimento de coloração foi realizado com 200 µL de Cristal Violeta 1% por 15 min, seguido de lavagem da placa com água destilada estéril. Após a secagem da placa, as células bacterianas fixadas e coradas no fundo dos poços foram ressuspensas em 200 µL de etanol 95% por 30 min e após isso foi realizada a quantificação dos biofilmes. A densidade óptica (DO) do biofilme bacteriano foi quantificada com o auxílio de um leitor de espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 600 nm (Anthos 2010 Tipo 17550 S. No. 17 550 4894). O isolamento bacteriano foi classificado como: não formador de biofilme ($DO \leq Doc$), fraca formação de biofilme ($DOc < DO \leq 2 \times Doc$), moderada formação de biofilme ($4 \times DO < DO \leq 4 \times Doc$) e forte formador de biofilme (Masebe; Thantsha, 2022).

4.14 Ensaio *in vitro* de tolerância a condições do trato gastrointestinal

A tolerância da BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1 às condições gastrointestinais *in vitro* foram determinadas de acordo com Iraporda et al. (2019). A BAL foi cultivada em caldo MRS a 37 °C por 24 h e depois colhidas por centrifugação de 6000 × g por 15 min. Os *pellets* foram lavados duas vezes com solução de *Phosphate buffered saline* (PBS) 1X (pH 7,0) e depois ressuspensos em ácido gástrico simulado (Simulated Gastric Acid - SGA) (125 mM NaCl, 7 mM KCl, 45 mM NaHCO₃, 3 g/L de pepsina, pH 2,0) e incubados a 37 °C por 90 min. Em seguida, as suspensões foram colhidas por centrifugação de 6000 × g por 15 min. Os *pellets* foram lavados duas vezes com PBS 1X (pH 7,0) e depois ressuspensos em fluido intestinal simulado (Simulated Intestinal Fluid - SIF) (22 mM NaCl, 3,2 mM KCl, 7,6 mM NaHCO₃, 0,1% de pancreatina e 0,15% de sais biliares, pH 8,0) e incubado a 37 °C por 150 min. Em cada estágio da simulação, alíquotas de 100 µL foram coletadas para determinação das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), conforme descrito por Milles et al. (1938). Para tanto, realizaram-se microdiluições seriadas em solução salina estéril (0,85%), após, 20 µL de cada diluição, em duplicata, foram aplicados em placas de PCA. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h.

4.15 Hidrofobicidade

O grau de hidrofobicidade da BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi determinado empregando o método descrito por Thapa et al. (2004), baseado na adesão de células a gotículas de hexadecano. As culturas foram cultivadas em 10 mL de caldo MRS, por 24 h. Após, as culturas foram centrifugadas a 10.900 rpm por 10 min e as células foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS 1X (pH 7,0) e ressuspensas em 5 mL de PBS 1X (pH 7,0). Sua absorvância foi medida a 600 nm e usada como valor de A0 para determinar a hidrofobicidade (%). Em seguida, 2 mL da suspensão foram misturados com 2 mL de n-hexadecano e agitados em vórtex por 5 min. A mistura foi separada em duas fases por 30 min. A absorvância foi medida a 600 nm e usada como o valor de A1. A porcentagem de hidrofobicidade da cepa aderida ao hexadecano foi calculada usando a Equação 01:

$$\text{Hidrofobicidade (\%)} = \left(1 - \frac{A1}{A0}\right) * 100 \quad (01)$$

4.16 Produção de leite fermentado de búfala

Para fermentação do leite de búfala foi utilizado *Lactococcus lactis* 32B4-1. A BAL foi inoculada em caldo MRS, a 30 °C por 24 h, para obtenção de inóculo de concentração equivalente entre 10⁶ a 10⁸ UFC/mL.

Para a fermentação, o leite de búfala foi aquecido por 15 min a 90 °C em banho-maria e resfriado até 40 °C. Após isso, 100 mL de leite de búfala foram distribuídos em Erlenmeyers esteréis. O leite de búfala foi inoculado com 2% (v/v) de *Lactococcus lactis* 32B4-1 e depois incubado a 30 °C, sem agitação. Amostras de fermentação foram coletadas em 0, 12, 24 e 48 h para análises.

4.17 Determinação dos parâmetros de fermentação do leite de búfala

Os parâmetros da fermentação, como pH, acidez titulável, contagem de células viáveis e teste de sinérese, foram avaliados em 0, 12, 24 e 48 h.

O pH foi determinado utilizando um medidor de pH (PHS-3E-BI SATRA). A acidez titulável (AT) foi determinada de acordo com How et al. (2022), com modificações. As amostras de leite fermentado de búfala foram tituladas com NaOH 0,1 mol/mL usando fenolftaleína como indicador. O valor da acidez titulável foi obtido multiplicando o número da acidez titulável por 10. Estas determinações foram realizadas em triplicata.

As contagens de células viáveis de *Lactococcus lactis* 32B4-1 em leite fermentado de búfala foram determinadas usando o método de diluições em série (Liang et al., 2022). Para a contagem das células viáveis, 100 µL de cada amostra foram diluídos em 900 µL de solução salina estéril (0,85%, p/v) e seis diluições seriadas foram realizadas, em triplicata. Para a contagem, cada diluição foi plaqueada em PCA e incubadas a 30 °C por 48 h. O resultado foi expresso como a média das contagens multiplicada pelo fator de diluição utilizado em UFC/mL.

O teste de sinérese/separação de soro do leite fermentado de búfala foi determinado de acordo com Mani-López et al. (2014), com uma ligeira modificação por aceleração centrífuga. O leite fermentado foi centrifugado por 5 minutos a 2.000 x g a 4 °C. Após a centrifugação, o soro foi coletado e pesado. A sinérese foi calculada de acordo com a Equação 02:

$$\text{Syneresis (\%)} = \frac{Ws(g)}{FM(g)} \times 100 \quad (02)$$

onde, WS era o peso do sobrenadante após centrifugação e FM era o peso do leite fermentado de búfala.

4.18 Análises físico-químicas do leite fermentado de búfala

As análises físico-químicas do leite fermentado de búfala, após 48 h de fermentação, foram realizadas no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA). Foi avaliada a acidez através de titulometria (ISO 11869:2012), sólidos totais por micro-ondas (AOAC 2008.06), gordura por ressonância magnética nuclear (AOAC 2008.06) e proteína em base úmida pelo método de Kjeldahl (ISO 8968-1:2014).

4.19 Atividade antioxidante e anti-hipertensiva do leite fermentado de búfala

Amostras do leite fermentado de búfala em 0, 12, 24 e 48 h foram submetidas à centrifugação a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C (centrífuga Hettich ROTINA 420R) para obter os extratos solúveis em água (ESA). Estas amostras foram avaliadas quanto à atividade antioxidante e atividade anti-hipertensiva.

4.19.1 Captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

A eliminação do radical ABTS do leite fermentado de búfala foi medida colorimetricamente (Re et al., 1999). O radical ABTS foi preparado pela reação de 5 mL de ABTS (7 mM) com 88 µL de K₂SO₄ (140 mM). Esta solução permaneceu no escuro, em temperatura ambiente, por aproximadamente 16 horas antes do uso. A solução radical ABTS foi então diluída com solução salina tamponada com fosfato (5 mM, pH 7,4) para atingir 0,700 (± 0,02) de absorbância (Abs) a 734 nm. Para os ensaios, 1 mL da solução ABTS ajustada foi adicionado às amostras de ESA (5 µL) e Abs a 734 nm foi determinado após 6 min. Os controles foram realizados utilizando água destilada em vez da amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como Porcentagem de captura, calculada conforme a Equação 03:

$$\text{Porcentagem de captura (\%)} = \frac{|\text{controle}| - |\text{amostra}|}{|\text{controle}|} \times 100 \quad (03)$$

4.19.2 Captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A capacidade de eliminação de radicais do leite fermentado de búfala também foi avaliada usando o radical DPPH (Brand-Williams et al., 1995). O DPPH foi dissolvido em metanol (60 µM) e 3,9 mL de solução DPPH foram adicionados ao ESA (1 mL). Após 1 h no escuro à temperatura ambiente, a absorvância desta mistura foi medida a 517 nm. Os controles foram realizados utilizando água destilada em vez da amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como Porcentagem de captura, calculada pela Equação 03.

4.19.3 Poder redutor

O poder redutor foi avaliado pela capacidade do leite fermentado de búfala reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} (Zhu et al., 2006). Amostras de ESA (1 mL) foram misturadas com 2,5 mL de solução salina tamponada com fosfato (200 mM, pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio (10 mg/mL). Após a incubação (50 °C, 30 min), foram adicionados 2,5 mL de solução de TCA (100 g/L) e esta mistura foi centrifugada (3000 x g, 10 min). Em seguida, 2,5 mL do sobrenadante foram misturados com 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl_3 (1 g/L). A absorvância foi mensurada a 700 nm após 10 min. Nos controles, foi utilizada água destilada em vez da amostra. Os resultados foram expressos como Abs a 700 nm (Abs 700).

4.19.4 Atividade quelante de ferro

A capacidade quelante de Fe^{2+} do leite fermentado de búfala foi avaliada misturando amostras de ESA (0,1 mL) com 3,7 mL de água destilada, 0,1 mL de FeSO_4 (2 mM) e 0,2 mL de ferrozina [3-(2-piridil)-5mM.5,6-bis(ácido 4-fenil-sulfônico) -1,2,4-triazina] (Chang et al., 2007). Abs a 562 nm foi mensurada após 10 min. Os controles foram realizados adicionando água destilada em vez de leite fermentado. Os resultados foram expressos como:

$$\text{Atividade quelante}(\%) = \frac{|\text{controle}| - |\text{amostra}|}{|\text{controle}|} \times 100 \quad (04)$$

4.19.5 Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina do leite fermentado de búfala

O potencial anti-hipertensivo do leite fermentado de búfala foi avaliado, *in vitro*, através da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Cushman; Cheung; 1971). Alíquotas de ESA (20 µL) foram misturadas a 100 µL de solução tamponada contendo o substrato hipuril-histidil-leucina (8 mM; em tampão HEPES-HCl (50 mM) contendo 300 mM NaCl, pH 8,3, 37 °C). Após a adição de 40 µL da ACE (0,1 U/mL), a mistura foi incubada a 37 °C por 30 min e então a reação foi finalizada pela adição de 150 µL de solução de HCl (1 M). Em seguida, o ácido hipúrico liberado pela ação da ACE foi extraído com 1 mL de acetato de etila e a fase orgânica transferida para frasco de vidro para evaporação. O material residual do frasco foi dissolvido com 800 µL de água destilada e a absorbância da mistura resultante foi mensurada a 228 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade inibitória foi calculada pela Equação 05:

$$Inibição (\%) = \left\{ 1 - \frac{(A-B)}{(C-D)} \right\} \times 100 \quad (05)$$

onde A é a absorbância na presença da enzima, substrato e ESA, B é a absorbância na presença de substrato e ESA, sem enzima (substituída por tampão), C é a absorbância na presença de enzima e substrato, sem ESA (substituído por água destilada), e D é a absorbância com substrato, mas sem enzima (substituída por tampão) e ESA (substituído por água destilada).

4.20 Microrganismos usados como cultura *starter* do queijo colonial de búfala

Os microrganismos utilizados como cultura *starter* do queijo colonial de búfala foram *Lactococcus lactis* 32B4-1, isolado do soro de leite de búfala (Lermen, no prelo) e, *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5, isolado do leite de búfala (Breyer et al., 2021). As culturas foram mantidas a - 20 °C em caldo MRS suplementado com 20% (v/v) de glicerol. As culturas foram ativadas por transferência sucessiva em caldo MRS a 37 °C antes do uso.

4.21 Caracterização tecnológica da cultura *starter* autóctone

Os isolados *Lactococcus lactis* 32B4-1 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 foram avaliados quanto a utilização de citrato, produção de gás sulfídrico (H₂S) em meio SIM, produção de acetoína através do teste de Voges-Proskauer, produção de gás a partir de glicose em caldo MRS contendo tubos Durham invertidos, além da capacidade de fermentar diferentes fontes de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, maltose, manitol e xilose) (Pavunc et al., 2012; Terzic-Vidojevic et al., 2015).

A produção de diacetil foi determinada de acordo com Ribeiro et al. (2013). As BAL (1% v/v) foram inoculadas em 10 ml de leite UHT e incubadas a 30 °C por 24 h. Um mililitro de cada suspensão celular foi combinado com 0,5 ml de uma solução de -naftol (1% p/v) e KOH (16% p/v) e incubado a 30 °C por 10 min. A produção de diacetil é indicada pela formação de um anel vermelho no topo dos tubos.

Para a avaliação da produção de EPS, as bactérias foram cultivadas em ágar vermelho congo (37 g/L de BHI, 50 g/L de sacarose, 10 g/L de ágar e 0,8 g de vermelho congo), a 37 °C, por 72 h. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo. As cepas produtoras de EPS apresentaram colônias de coloração preta, enquanto as não produtoras, apresentaram crescimento de colônias com coloração rosa (Freeman et al., 1989).

A atividade enzimática das BAL foi avaliada de acordo com Bogó et al. (2017), com modificações. A atividade proteolítica foi avaliada através da inoculação dos microrganismos em ágar-leite (TSA + 10 % de leite desnatado bovino) e incubadas a 30 °C por 48 h. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usado como controle positivo. A atividade proteolítica foi indicada por uma zona clara ao redor das colônias. Já para a atividade lipolítica, as BAL foram inoculadas em meio de cultura ágar tributirina [peptona (5 g/L), ágar (15 g/L), extrato de levedura (3 g/L) e tributirina (10 mL/L)] e incubados à temperatura de 30 °C por 48 h. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi usado como controle positivo. A atividade lipolítica foi indicada por uma zona clara ao redor das colônias.

A atividade de acidificação foi medida pela mudança no pH ao longo do tempo. Os isolados foram pré-cultivados em caldo MRS, 30 °C, por 24 h. Após, as culturas foram inoculadas (1% v/v) em 50 mL de leite UHT bovino, 50 mL de leite integral bovino (3% de gordura) e 50 mL de leite bubalino e, incubadas a 30 °C, sem agitação. O pH foi medido em 0, 6, 24 e 48 h de incubação usando um pHmetro PHS-3E (SATRA).

Para avaliar o crescimento em diferentes temperaturas, as BAL foram pré-cultivadas em caldo MRS, 30 °C, por 24 h. Posteriormente, foram inoculadas (1% v/v) em 50 mL de caldo MRS e incubadas a 4, 20, 30, 37 e 45 °C, por 48 h (Ribeiro et al., 2013). De modo similar, para testar a resistência ao NaCl, as BAL foram pré-cultivadas em caldo MRS, 30 °C, por 24 h. Posteriormente, foram inoculadas (1% v/v) em 50 mL de caldo MRS suplementado com 0, 2, 4, 6 e 10% (p/v) de NaCl, incubadas a 30 °C, por 48 h. A capacidade dos microrganismos de crescer em diferentes temperaturas e concentrações de sal foi avaliada através da metodologia descrita por Milles et al. (1938). Para tal, 100 µL foram coletadas e realizaram-se microdiluições seriadas em solução salina estéril (0,85%), após, 20 µL de cada diluição, em duplicata, foram aplicados em placas de PCA. As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem em placas de PCA. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

Todos os experimentos referentes a caracterização tecnológica foram realizados em triplicata.

4.22 Avaliação de inocuidade da cultura *starter* autóctone

Os isolados *Lactococcus lactis* 32B4-1 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 foram avaliados quanto a atividade hemolítica e hidrólise de gelatina, conforme metodologia descrita no item 4.9. Os experimentos foram realizados em triplicata. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usado como controle positivo para ambos os testes (Dias et al., 2019).

Os microrganismos foram avaliados pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer contra os seguintes 10 antimicrobianos em concentrações de disco mostradas entre parênteses: clindamicina (30 µg), ceftriaxona, (2 µg), cloranfenicol (30 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (15 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), ampicilina (10 µg) e penicilina G (10 µg) (LaborClin). Os inóculos da cultura foram preparados por suspensão do isolado em solução salina e ajustados na faixa de 0,5 da Escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). As suspensões foram inoculadas com suabe de algodão estéril sobre a superfície das placas de ágar MH. Os discos de antibiótico foram colocados manualmente na placa superfície e incubados a 37 °C por 18 a 24 h (Bauer et al., 1966). Este experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos com base no diâmetro da zona de

inibição (mm) e classificados como resistência (R), suscetibilidade moderada (SM) ou suscetibilidade (S) (Charteris et al., 1998).

4.23 Produção das culturas *starters* autóctones

Os isolados *Lactococcus lactis* 32B4-1 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 foram pré-cultivados em 10 mL de caldo MRS, a 30 °C, por 24 h. Posteriormente, 2% (v/v) do pré-cultivo foi transferido para erlenmeyers contendo 100 mL de caldo MRS para o cultivo dos microrganismos a 30 °C, por 24 h, em aerobiose, sem agitação. Na sequência, os cultivos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e os *pellets* foram ressuspensos em solução liofilizadora (40 g/L de leite desnatado Molico + 20 g/L de glutamato de sódio). Posteriormente, o material foi liofilizado no Laboratório Planta Laticínio do ICTA. Após, as culturas liofilizadas foram ressuspensas em leite, na proporção 3:1 (*Lactococcus lactis* 32B4-1:*Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5) e utilizadas como culturas *starters*.

4.24 Avaliação do leite de búfala empregado na produção do queijo

Informações acerca do leite de búfala utilizado neste estudo estão descritas no item 4.1. Antes do leite de búfala ser usado na produção de queijo, ele foi avaliado quanto a sua composição centesimal e qualidade higiênico-sanitária.

Para determinar a composição centesimal do leite de búfala, foi utilizado um analisador de leite (Akso Master Pro Touch), onde foram analisados gordura, extrato seco desengordurado, proteína, lactose, densidade, sais, água, ponto de congelamento, temperatura, condutividade e pH.

Para avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite de búfala, foi realizada Contagem Padrão em Placas (CPP) em PCA, incubada à 37 °C por 48 h (ISO 4833-1, 2013).

4.25 Produção de queijo colonial de búfala

Os queijos foram produzidos no mês de março de 2024 no Laboratório Planta Laticínio do ICTA, onde foi utilizado 5 L de leite de búfala para cada batelada de queijo. O leite de búfala foi pasteurizado através do método de pasteurização lenta, sendo aquecido até a temperatura de 63 °C por 30 minutos, e foi resfriado em banho de água até atingir 32 °C. Para cada batelada de 5 L de leite bubalino foram adicionados: 2,5 g de cloreto de cálcio diluído em 40 mL de água destilada, coagulante líquido HA-LA

(4 mL diluído em 40 mL de água destilada), e os fermentos lácteos. Para o queijo controle (Queijo 1) foi utilizado um fermentado lácteo comercial e para o queijo colonial artesanal (Queijo 2) foi utilizado a cultura *starter* autóctone contendo *Lactococcus lactis* 32B4-1 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5. Os ingredientes foram homogeneizados ao leite e aguardou-se o período de 50 minutos para coagulação completa. Após a coagulação, o coalho foi cortado com a lira, e a temperatura foi elevada até 42 °C para favorecer a dessoragem por mais 10 minutos. O coalho foi torcido em voal, moldado e prensado nas formas. Foram produzidos seis queijos de cada, que foram levados à câmara de maturação, à uma temperatura de 13 °C. Os queijos permaneceram enformados por um período de 16 horas, em que foram prensados com um peso de aproximadamente 1,1 kg/queijo. No dia seguinte as peças foram retiradas das formas e foi realizada a salga a seco, com 2% do peso dos queijos em sal. Os queijos foram lavados após 24 horas de salga a seco, e foram observados durante o período de maturação de 10, 30 e 60 dias, sendo virados a cada dois dias.

4.26 Avaliação bromatológica do queijo colonial de búfala

Para determinação das análises bromatológicas foi avaliado a umidade e o teor de gordura. O teor de umidade foi obtido por método gravimétrico em estufa a 102 °C, até peso constante (Brasil, 2006).

Os teores de lipídios totais foram analisados de acordo com a metodologia de Bligh e Dyer (1959). Foram pesados aproximadamente 2 - 2,5 g de cada amostra, e foi adicionado 8 mL de clorofórmio, 16 mL de metanol e 6,4 mL de água destilada. Após a homogeneização, foi adicionado mais 8 mL de clorofórmio e 8 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% a fim de promover separação total do clorofórmio que carrega os lipídeos. Aguardou-se a separação das fases, e então foi retirado 10 mL da fase inferior com pipeta graduada e adicionado em um tubo com tampa contendo aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro. Foi então filtrada a camada contendo o clorofórmio em papel filtro, recebendo o filtrado em um recipiente de vidro com tampa, em que 5 mL do filtrado foi transferido para um béquer previamente seco em estufa por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O solvente foi evaporado em estufa a 100 – 105 °C, esfriado em dessecador e então pesado.

4.27 Avaliação microbiológica do queijo colonial de búfala

As análises microbiológicas dos queijos foram realizadas de acordo com a metodologia indicada pela Instrução Normativa nº 30/2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2018). Essa metodologia está descrita no item 4.4 Análises microbiológicas do soro de leite de búfala.

4.28 Perfil de ácidos graxos

Para a análise do perfil de ácidos graxos livres (AGL) dos queijos produzidos, a quantificação de ácidos graxos foi realizada por meio de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID Modelo GC 2010, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (Rtx-Wax, Restek, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), de acordo com a AOCS (2009). As amostras foram previamente esterificadas para permitir a análise pelo GC-FID. Os ácidos graxos foram identificados por comparação do tempo de retenção dos componentes com uma mistura padrão de referência de ácidos graxos FAME mix (Supelco 37 Component FAME Mix; Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA).

4.29 Análises estatísticas

Os dados obtidos neste trabalho foram organizados em tabelas e gráficos no *excel* e quando necessário, foram expressos como média ± desvio padrão. Para as análises estatísticas foi utilizado o *software* R. Diferenças significativas entre amostras foram testadas por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de avaliação de diferenças pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados e discutidos na forma de quatro artigos científicos e um capítulo de livro, cujos títulos estão abaixo. Os manuscritos estão apresentados nesta seção de acordo com as normas das revistas em que foram publicados ou submetidos. Ainda, os resultados, gráficos e figuras que não foram incluídos nos artigos estão apresentados na subseção 5.6.

O primeiro artigo “Whey: Properties, Health Benefits and its Use in Beverages” foi submetido para a revista *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*.

O segundo artigo “Buffalo whey as a source of lactic acid bacteria of biotechnological interest” foi submetido para *Acta Veterinaria Brasilica*.

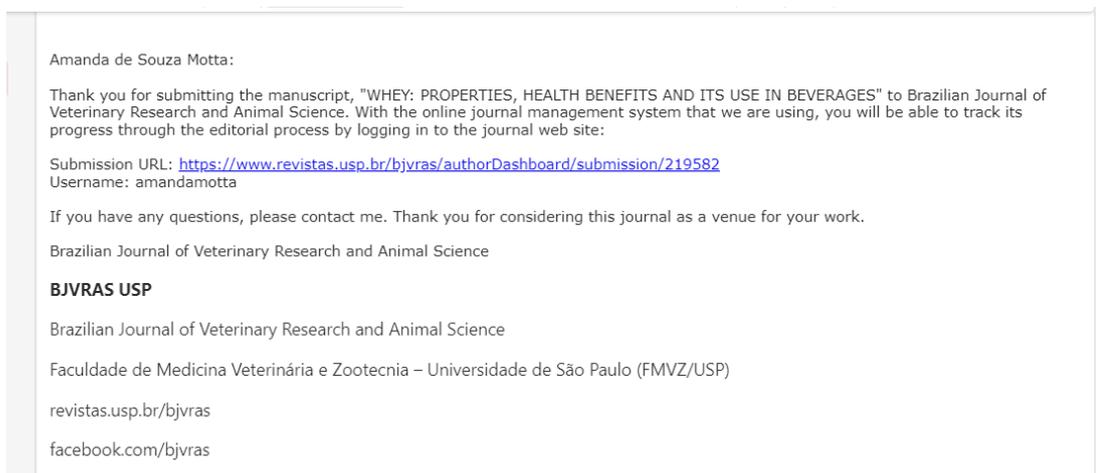
O terceiro artigo intitulado como “Atividades Biológicas do Leite de Búfala Fermentado por *Lactococcus lactis* 32B4-1” será submetido para a revista *Journal of Dairy Science*, após a avaliação pela banca.

O quarto artigo intitulado como “Aplicação de *Lactococcus lactis* 32B4-1 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 como culturas *starters* autóctones para produção de queijo tipo colonial de búfala” será submetido para a revista *Brazilian Journal of Microbiology*, após a avaliação pela banca.

O capítulo de livro, intitulado como “Queijos artesanais no Rio Grande do Sul” vai compor o livro intitulado como “Alimentos funcionais: produtos voltados aos cuidados com a saúde e bem-estar, imunidade e longevidade”, que será publicado em dezembro de 2024.

5.1. Artigo Científico I

Artigo submetido a revista Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, conforme comprovante abaixo:



Whey: Properties, Health Benefits and its Use in Beverages

Andréia Monique Lermen^a, Daniel Joner Daroit^b, Adriano Brandelli^c and Amanda de Souza da Motta^a *

^a*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;* ^b*Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, Brazil;*

^c*Departamento de Ciência dos Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*

*Correspondence:

Amanda de Souza da Motta

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)

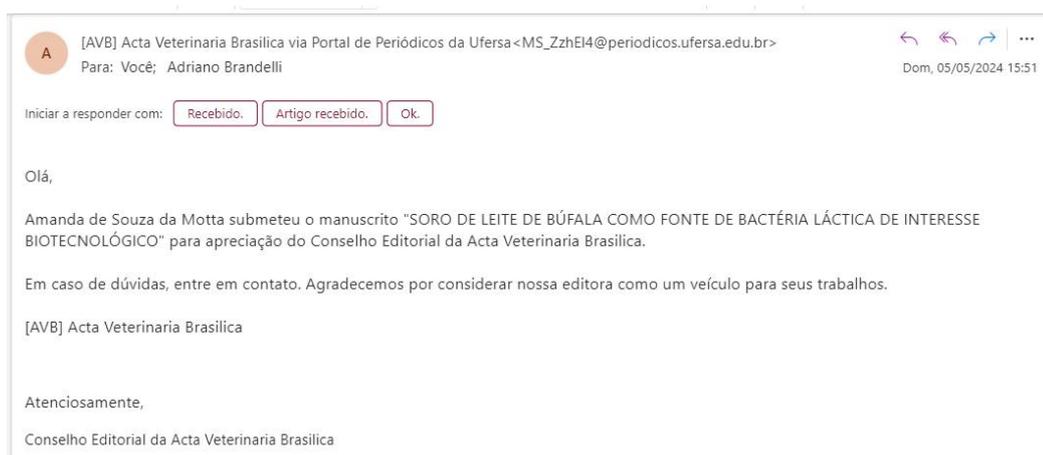
Av. Sarmiento Leite 500, sala 216, Centro 90050-170, Porto Alegre, RS - Brazil

Telephone +55-51-991824898

E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

5.2 Artigo Científico II

Artigo submetido para a revista Acta Veterinaria Brasilica, sob autoria de Andréia Monique Lermen, Adriano Brandelli e Amanda de Souza da Motta. O comprovante de submissão consta abaixo.



SORO DE LEITE DE BÚFALA COMO FONTE DE BACTÉRIA LÁCTICA DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Andréia Monique Lermen^a, Adriano Brandelli^b and Amanda de Souza da Motta^a *

^a*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;*

^b*Departamento de Ciência dos Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*

*Correspondence:

Amanda de Souza da Motta

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)

Av. Sarmiento Leite 500, sala 216, Centro 90050-170, Porto Alegre, RS - Brazil

Telephone +55-51-991824898

E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

5.3 Artigo Científico III

Este artigo será submetido a revista Journal of Dairy Science, após avaliação pela banca.

O artigo é de autoria de Andréia Monique Lermen, Naiara Jacinta Clerici, Adriano Brandelli e Amanda de Souza da Motta.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO LEITE DE BÚFALA FERMENTADO POR *Lactococcus lactis* 32B4-1

Andréia Monique Lermen¹, Naiara Jacinta Clerici², Adriano Brandelli², Amanda de Souza da Motta¹

¹ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Department of Food Science, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

ORCID ANDRÉIA: <https://orcid.org/0000-0002-5038-1660>

ORCID NAIARA: <https://orcid.org/0000-0002-0670-7088>

ORCID ADRIANO: <https://orcid.org/0000-0002-9307-6471>

ORCID AMANDA: <https://orcid.org/0000-0001-8637-3868>

*Correspondence:

Amanda de Souza da Motta

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)

Rua Ramiro Barcelos 2600, sala 538, Santa Cecília 90035-003, Porto Alegre, RS - Brazil

Telephone +55-51-991824898

E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

5.4 Artigo Científico IV

Este artigo será submetido a revista Brazilian Journal of Microbiology, após a avaliação da banca.

O artigo é de autoria de Andréia Monique Lermen, Gabriela Doncato Duarte, Ana Raisal Nunes Paiva, Adriano Brandelli e Amanda de Souza da Motta.

APLICAÇÃO DE *Lactococcus lactis* 32B4-1 E *Leuconostoc mesenteroides* Lb 5.5 COMO CULTURAS STARTERS AUTÓCTONES PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO TIPO COLONIAL DE BÚFALA

Andréia Monique Lermen^a, Gabriela Doncato Duarte^a, Ana Raisal Nunes Paiva^b, Adriano Brandelli^b and Amanda de Souza da Motta^a

^a Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^b Department of Food Science, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

ORCID ANDRÉIA: <https://orcid.org/0000-0002-5038-1660>

ORCID GABRIELA: <https://orcid.org/0009-0009-0975-9789>

ORCID ANA: <https://orcid.org/0000-0002-0751-9628>

ORCID ADRIANO: <https://orcid.org/0000-0002-9307-6471>

ORCID AMANDA: <https://orcid.org/0000-0001-8637-3868>

*Correspondence:

Amanda de Souza da Motta

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)

Rua Ramiro Barcelos 2600, sala 538, Santa Cecília 90035-003, Porto Alegre, RS - Brazil

Telephone +55-51-991824898

E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

5.5 Capítulo de Livro

Este trabalho foi escrito para compor o livro “Alimentos funcionais: produtos voltados aos cuidados com a saúde e bem-estar, imunidade e longevidade”, que será publicado em dezembro de 2024.

O capítulo de livro é de autoria de Andréia Monique Lermen, Gabriela Doncato Duarte e Amanda de Souza da Motta.

CAPÍTULO X

QUEIJO ARTESANAL NO RIO GRANDE DO SUL

Andréia Monique Lermen¹
Gabriela Doncato Duarte²
Amanda de Souza da Motta³

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, email: lermenma@gmail.com, ID Lattes: 7252021598762941.

²Graduanda do Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, email: gabidoncato@gmail.com, ID Lattes: 4352748249405375.

³Professora do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, email: amanda.motta@ufrgs.br, ID Lattes: 3575081199778406.

5.6 Resultados não apresentados na forma de artigo

Os resultados da presente subseção são complementares aos resultados apresentados nesta tese e, por vezes, subsidiaram a tomada de decisão para seguimento de outros estudos.

5.6.1 Identificação molecular

A identificação molecular do microrganismo foi confirmada através do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. Os dados foram analisados pelos softwares Genious e BLAST-NCBI, onde confirmou-se o percentual de identidade (99,81%) da BAL em estudo (*Lactococcus lactis* 32B4-1).

5.6.2 Produção de protease utilizando *Lactococcus lactis* 32B4-1

A capacidade da BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1 de secretar enzimas proteolíticas extracelulares foi determinada qualitativamente usando o ensaio de hidrólise de ágar de leite desnatado. O experimento foi realizado em diferentes pH e temperaturas a fim de encontrar as melhores condições da BAL secretar protease. Houve formação do maior halo de degradação do ágar leite em pH 6 a 30 °C, indicando a produção de enzimas proteolíticas ($p < 0,05$). Já em condições mais ácidas (pH 4 e pH 5) não houve formação de halo (Gráfico 1).

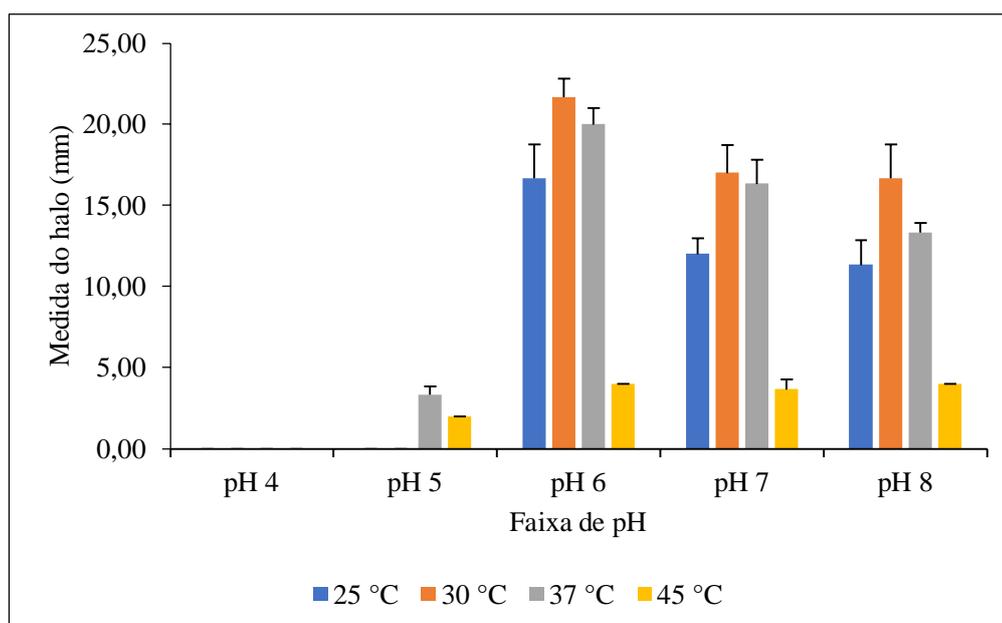


Gráfico 1 -Determinação qualitativa da atividade proteolítica da BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1, utilizando diferentes pH e temperaturas.

Verificou-se de maneira quantitativa, através da incubação da BAL em caldo MRS, a atividade proteolítica em diferentes faixas de pH. Para tal, fixou-se parâmetros de temperatura (30 °C), tempo de incubação (48 h), sem agitação e o pH foi variado. Foi detectado maior atividade proteolítica em pH 6 (245,5 U/mL), seguido de pH 7 (169,00 U/mL) e pH 5 (149,5 U/mL).

Na sequência, o pH 6 foi fixado, juntamente com o tempo de incubação (48 h), sem agitação e verificou-se a atividade proteolítica em diferentes temperaturas. Foi detectado maior atividade proteolítica a 30 °C (240,25 U/mL), seguido de 25 °C (221,50 U/mL), 37 °C (211,75 U/mL) e 45 °C (206,75 U/mL). Portanto, a partir desse resultado foi empregada a temperatura de 30 °C na continuidade do estudo.

Por fim, a atividade proteolítica foi determinada em diferentes tempos de incubação. Com a temperatura fixada em 30 °C, pH 6 e sem agitação. Observa-se no Gráfico 2 que a maior atividade proteolítica ocorre entre 24 h (353,50 U/mL) e 36 h (372,00 U/mL).

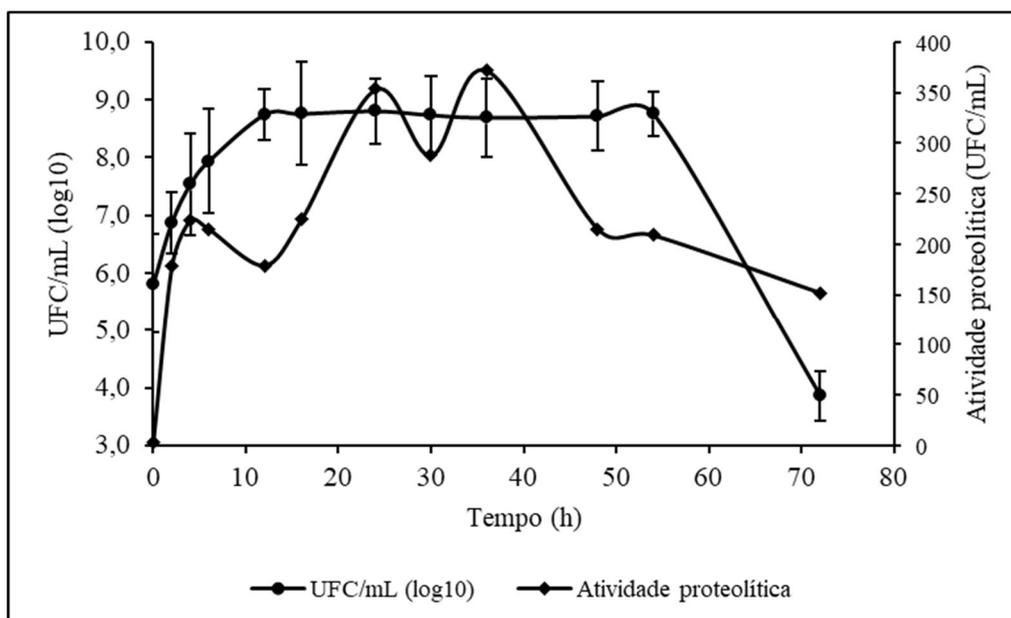


Gráfico 2 - Atividade proteolítica (♦) vs número de células viáveis (UFC/mL) de *Lactococcus lactis* 32B4-1 (●), em diferentes períodos de incubação.

O número de células viáveis (UFC/mL) ao longo do período de incubação foi determinado. Inicialmente havia 5,813 log UFC/mL, crescendo exponencialmente ao passar do tempo e atingindo 8,808 log UFC/mL em 24 h. Após 54 h de incubação houve um decréscimo (Gráfico 2).

Durante o período de incubação de *Lactococcus lactis* 32B4-1 em caldo MRS nas condições ótimas, também foi analisado o pH do meio. O pH inicial era de 6,0 e após 4 h encontrava-se em 4,8. Após 72 h, o pH do meio era de 4,08 (Gráfico 3). As BAL degradam açúcares em ácido láctico, reduzindo assim o pH do meio em que se encontram. Essa característica da BAL pode influenciar nas propriedades organolépticas e tecnológicas do produto (Lunardi et al., 2021). Além disso a DO também foi analisada, sendo 0,153 o valor inicial e após 12 h a DO observada era de 1,322 e após 72 h, a DO observada era de 1,336 (Gráfico 4).

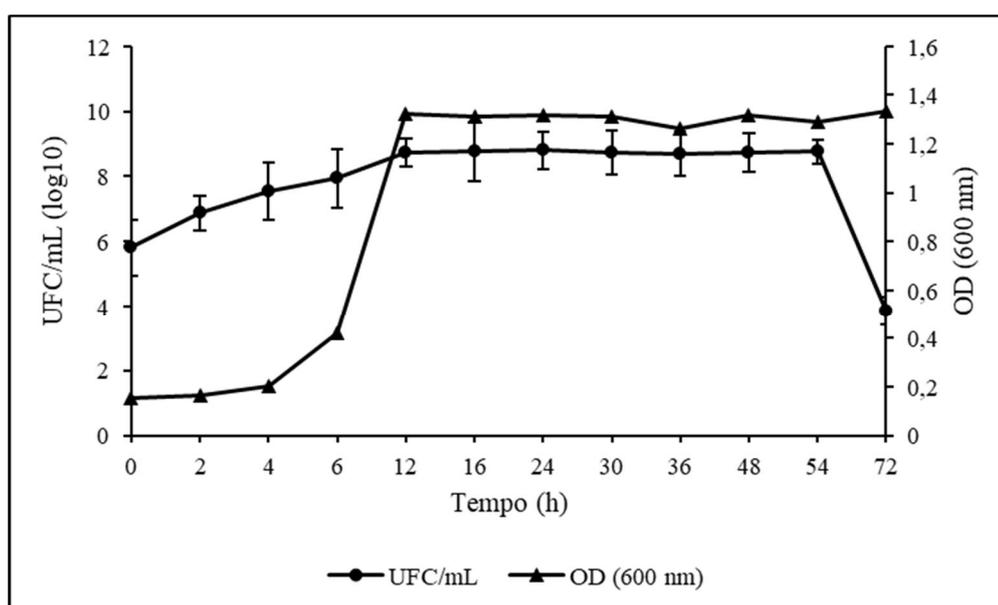


Gráfico 3 - Densidade óptica do meio a 600 nm (▲) vs número de células viáveis (UFC/mL) de *Lactococcus lactis* 32B4-1 (●), em diferentes períodos de incubação.

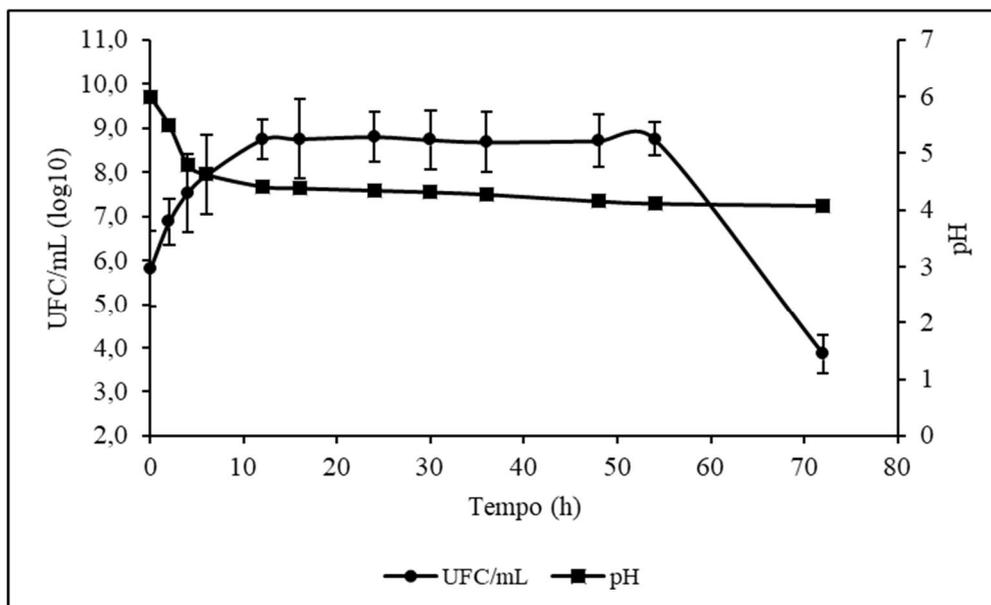


Gráfico 4 - pH do meio (■) vs número de células viáveis (UFC/mL) de *Lactococcus lactis* 32B4-1 (●), em diferentes períodos de incubação.

5.6.3 Produção de biofilme

Na avaliação da formação de biofilme microbiano através do teste da microplaca, observou-se que *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi um fraco formador de biofilme, com densidade óptica média de 0,237, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Absorbância de densidade óptica média (DO) a 600 nm e classificação de biofilmes microbianos.

Microrganismo	Média (DO)	Classificação
Controle negativo	0,145	Não formador de biofilme
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	1,8455	Forte formador de biofilme
<i>Lactococcus lactis</i> 32B4-1	0,237	Fraco formador de biofilme

5.6.4 Ensaio *in vitro* de tolerância a condições do trato gastrointestinal

A tolerância da BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1 às condições gastrointestinais foi determinada *in vitro* para avaliar a viabilidade celular antes e após a passagem pelo ácido gástrico e fluido intestinal. A simulação foi iniciada com aproximadamente $1,03 \times 10^9$ UFC/mL, no entanto a BAL não sobreviveu após exposição ao ácido gástrico e fluido intestinal.

5.6.5 Hidrofobicidade

A hidrofobicidade desempenha um papel importante na adesão que pode conferir uma vantagem competitiva para a colonização bacteriana. A BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1 apresentou valor baixo de hidrofobicidade (4,32%).

5.6.6 Caracterização tecnológica das culturas starters

Nesta subseção serão apresentados alguns resultados que não foram incluídos no artigo IV.

No artigo IV foi apresentado a capacidade das BAL de acidificar o leite de búfala. Além disso, também foi avaliado a capacidade de acidificar o leite bovino UHT desnatado e leite bovino integral com 3% de gordura (Gráfico 5). O pH inicial do leite UHT bovino desnatado estava em 6,68. *Lactococcus lactis* 32B4-1 apresentou capacidade de acidificar o leite, diminuindo o pH abaixo de 4 em 24 h (pH = 4,59) e após 48 h, o pH era de 4,22. Já *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 levou mais tempo para acidificar o leite, pois em 24 h o leite apresentava pH = 5,01 e em 48 h, pH = 4,28. Para o leite bovino integral com 3% de gordura, os resultados foram similares. O pH inicial era de 6,7 e diminuiu em 48 h, para 4,27 com *Lactococcus lactis* 32B4-1 e para 4,37 com *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5.

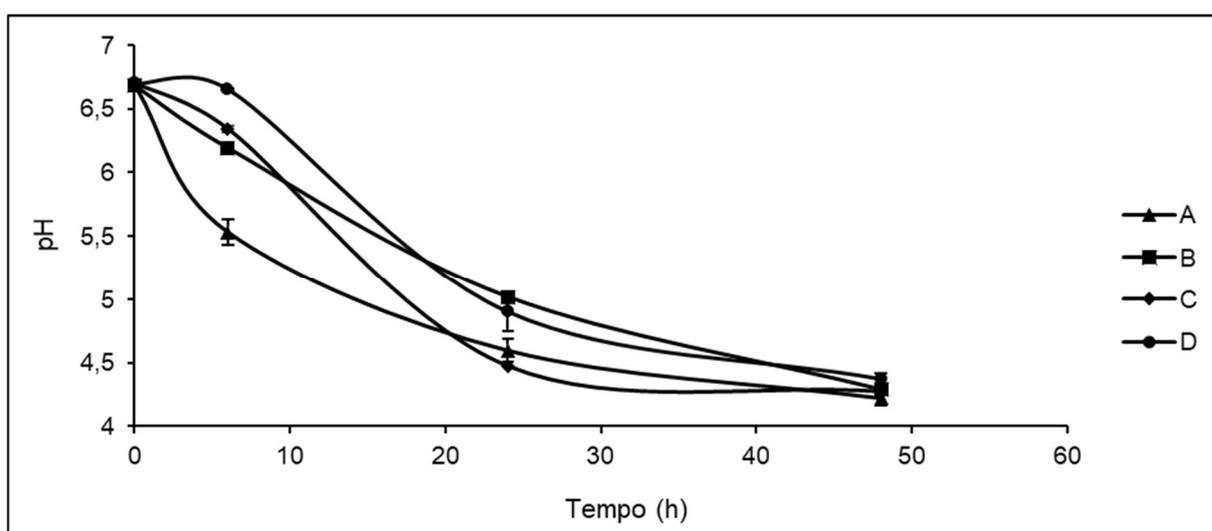


Gráfico 5 – Capacidade de acidificação: A) Leite UHT desnatado com *Lactococcus lactis* 32B4-1 (▲); B) Leite UHT desnatado com *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 (■); C) Leite integral com 3% de gordura com *Lactococcus lactis* 32B4-1 (◆); D) Leite integral com 3% de gordura com *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 (●).

Além disso, verificou-se a capacidade de fermentar diferentes fontes de carboidratos, como glicose, lactose, sacarose, maltose, manitol e xilose. Tanto *Lactococcus lactis* 32B4-1, como *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5, foram capazes de fermentar todos os carboidratos testados. Também foi verificado se as BAL utilizavam o citrato de sódio como única fonte de carbono, no entanto, os resultados foram negativos. Ademais, também se avaliou a produção de gás sulfídrico através do meio SIM, o qual também foi negativo pois o meio de cultura permaneceu inalterado.

Também foi avaliado a autólise das BAL testadas como culturas *starters* (Gráfico 6), onde não foi detectada uma autólise expressiva no período estudado.

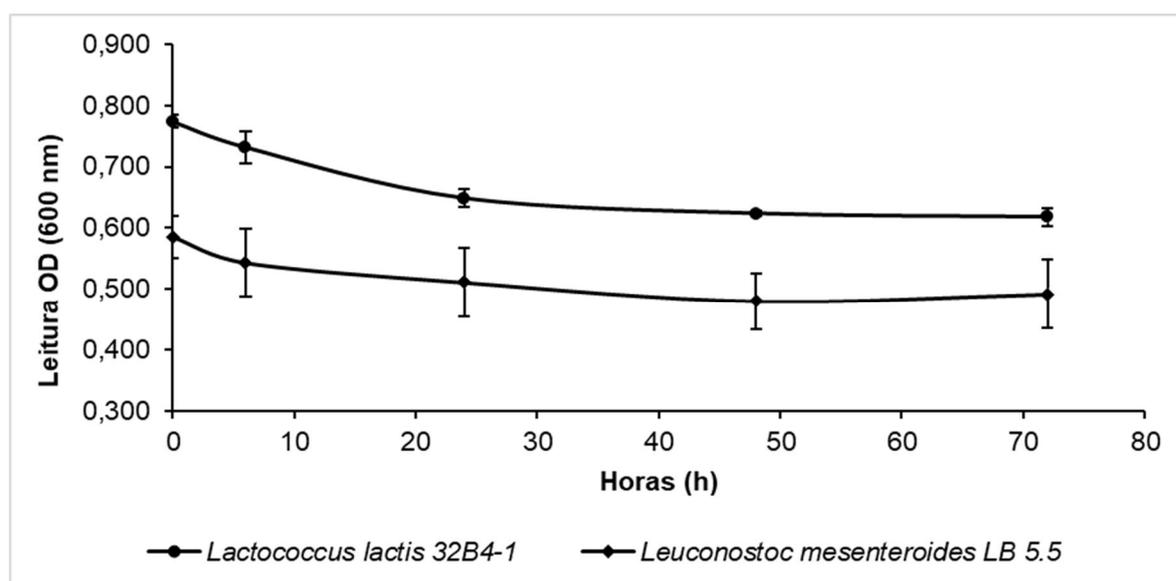


Gráfico 6 – Autólise das culturas *starters*.

6. DISCUSSÃO GERAL

Esta Tese foi organizada na “forma de artigos”, conforme modelo disponibilizado pelo PPGMAA. O estudo foi dividido em etapas, sendo cada uma delas correspondente a um artigo redigido, onde procurou-se responder aos objetivos propostos. Nesta seção de discussão geral estão apresentados os principais resultados e são discutidos os aspectos mais relevantes obtidos de cada um dos artigos.

O primeiro artigo deste estudo refere-se a uma revisão bibliográfica sobre o soro de leite. Essa revisão narrativa foi conduzida para obter um entendimento abrangente das informações presentes na literatura sobre o soro de leite. Observou-se que apesar dos potenciais desafios ambientais ligados ao soro de leite, há um panorama de pesquisas recentes que buscam alternativas para reutilizá-lo, com destaque para a indústria alimentícia. Considerando as propriedades benéficas do soro de leite e/ou seus constituintes, aliadas à grande demanda do consumidor por alimentos naturais, nutritivos e funcionais, o soro de leite passou a ser aplicado em bebidas. O artigo trouxe diversos estudos desenvolvidos que abordam a aplicação conjunta de soro de leite e probióticos em bebidas fermentadas, bebidas lácteas achocolatadas, refrigerantes, bebidas enriquecidas ou suplementadas, além da aplicação de soro de leite em bebidas prebióticas e simbióticas e em sucos de frutas. São produtos que podem complementar a alimentação, aumentando a saúde e reduzindo o risco de doenças. Além disso, a conversão do soro de leite num produto valioso representa um impacto econômico positivo, preservando o ambiente e contribuindo para o desenvolvimento da indústria.

O segundo artigo apresentado nesta tese apresentou as características físico-químicas e microbiológicas do soro de leite de búfala, além de isolar BAL e caracterizá-las. No Brasil, estudos que avaliaram a composição do soro de leite de búfala concentram-se na região Norte e Sudeste, onde há maior concentração de rebanhos bubalinos. Já no estado do Rio Grande do Sul, não foram identificados estudos com essa finalidade. Portanto, este foi o primeiro trabalho nesta região que buscou caracterizar o soro de leite de origem bubalina, bem como isolar, identificar, caracterizar e avaliar o potencial biotecnológico das BAL.

Neste estudo, o soro de leite de búfala foi considerado um soro doce, devido ao pH neutro, semelhante a outros estudos encontrados na literatura (Lira et al., 2009;

Caldeira et al., 2010; Desconsi et al., 2014; Duarte et al., 2020). Os conteúdos de gordura foram inferiores a outros estudos relatados na literatura (Rathour et al. 2016; Argenta et al., 2021). O teor de proteína foi similar ao relatado por Aider et al. (2007) e Merkel et al. (2021) para soro de leite bovino e, semelhante aos dados obtidos por Argenta et al. (2021) para soro de leite bubalino. O teor de lactose também foi similar ao estudo de Merkel et al. (2021) e, superior aos dados encontrados por Argenta et al. (2021) para o soro de leite bubalino. Essa variação na composição do soro depende de alguns fatores, como a origem do leite, o tipo de alimentação dos animais produtores, o estágio de lactação, o armazenamento do leite após a ordenha, o tratamento térmico do leite e o método de precipitação da caseína (Duarte et al., 2020; García-Cano et al., 2019). Ademais, o soro de leite de búfala estudado apresentou teores de proteína, gordura e lactose satisfatórios, o que sugere a necessidade de maior aproveitamento desse subproduto. Na indústria de laticínios, por exemplo, o soro de leite líquido pode ser processado e aplicado na elaboração de alimento e bebidas ou ainda, ser fracionado e concentrado para obtenção de soro de leite em pó, soro de leite concentrado, concentrado de proteína de soro de leite e isolados de proteína de soro de leite (Salama, 2015; Kasapcopur et al., 2021).

Em relação a caracterização microbiológica, o soro de leite de búfala apresentou uma contagem de microrganismos mesófilos acima do permitido pela IN n° 94/2020 (Brasil, 2020) e, ligeiramente superior aos achados de outros estudos (Lira et al., 2009; Desconsi et al., 2014; Mendes; Souza, 2017). A alta contagem de microrganismos mesófilos pode ser explicada devido ao fato do leite de búfala que originou o soro de leite não ter sofrido pasteurização, um processo que diminui sensivelmente a carga microbiana (Duarte et al., 2017; Mendes; Souza, 2017). Além disso, o soro de leite de búfala apresentou contagem de coliformes totais e termotolerantes abaixo do que preconiza a IN n° 94/2020 (Brasil, 2020), similar a outros estudos (Desconsi et al., 2014; Da Silva et al., 2015) e com resultados mais satisfatórios que aqueles encontrados nos estudos de Teixeira et al. (2007) e Mendes e Souza (2017), o que demonstra que as Boas Práticas de Fabricação foram realizadas durante o processamento do soro de leite de búfala. Além disso, para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, o resultado obtido se adequou a IN n° 94/2020 (Brasil, 2020) e resultados semelhantes foram obtidos por Mendes e Souza (2017), mas resultados inferiores foram observados no estudo de Teixeira et al. (2007), tendo em vista que houve presença de *Staphylococcus* coagulase positiva nas

amostras de soro de leite analisadas. A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva indica que houve um manuseio inadequado do produto, bem como condições higiênicas impróprias do manipulador (Mendes; Souza, 2017). Por fim, em relação a presença de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* sp., o soro de leite de búfala atendeu aos padrões exigidos pela IN nº 94/2020 (Brasil, 2020), através da ausência de patógenos, evidenciando a qualidade do soro de leite de búfala, o que é de extremo interesse da indústria de laticínios, pois a presença destes microrganismos gera enorme preocupação (Teixeira et al., 2007; Mendes; Souza, 2017; Duarte et al., 2017).

Neste estudo, além da caracterização físico-química e microbiológica, também foram isoladas BAL do soro de leite de búfala. Em todas as condições analisadas (ágar MRS, ágar M17, aerobiose e anaerobiose) houve crescimento de BAL. Resultados semelhantes foram obtidos por Marasco et al. (2022). Ao total, foram isoladas 62 BAL identificadas como: *Lactococcus lactis* (n=58; 93,55%), *Enterococcus faecium* (n=3; 4,84%) e *Lacticaseibacillus paracasei* (n=1; 1,61%). Outros autores também encontraram a prevalência de *Lactococcus lactis* em soro de leite (Ercolini et al., 2008; Bao et al., 2012; Riquelme et al., 2015; Giello et al., 2017; Silva et al., 2020; Marasco et al., 2022).

As BAL isoladas do soro de leite de búfala tiveram suas propriedades biotecnológicas avaliadas. Os resultados do presente estudo corroboram com diversos estudos da literatura que mostram que a maior parte das BAL analisadas apresentaram atividade proteolítica (Bogo et al. 2017; Araújo-Rodrigues et al., 2021; Breyer et al., 2021). Contudo, García-Cano et al. (2019) e Silva et al. (2020) verificaram resultados inferiores de atividade proteolítica, nos quais 61,3% e 48,65% das BAL analisadas apresentaram tal atividade, respectivamente. Já em relação a atividade lipolítica, os resultados obtidos são superiores a outros achados na literatura (Yalçinkaya; Kılıç, 2019; García-Cano et al., 2019; Câmara et al., 2019; Colombo et al., 2020; Araújo-Rodrigues et al., 2021). As BAL isoladas neste estudo apresentaram atividade antimicrobiana contra Gram-positivas, no entanto não exibiram atividade antimicrobiana contra as Gram-negativas, o que está de acordo com os resultados encontrados por Tulini et al. (2016) e Linares-Morales et al. (2020) que relataram que bactérias Gram-negativas não foram inibidas por BAL, provavelmente devido à proteção da membrana celular pela membrana externa. Os resultados do presente estudo foram superiores ao de outros achados na literatura, onde um número inferior de microrganismos demonstrou atividade antimicrobiana contra *Listeria*

monocytogenes e *Staphylococcus aureus* (Atanasova et al., 2014; Cui et al., 2018; Silva et al., 2020). No entanto, Desniar et al. (2013) obtiveram resultados superiores, pois 90% (n=56) e 66% (n=41) dos isolados de BAL produziram zona de inibição contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Estes ensaios preliminares podem sugerir a presença de metabólitos de BAL com efeitos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio ou bacteriocinas (Cui et al., 2018; Păcularu-Burada et al., 2020). Entretanto, mais ensaios são necessários para averiguar qual metabólito é responsável pela atividade antimicrobiana.

A inocuidade das BAL isoladas do soro de leite de búfala também foi avaliada, tendo em vista que é um pré-requisito de segurança para a seleção de potenciais BAL probióticas e posterior aplicação na indústria de alimentos (Cui et al., 2018; Breyer et al., 2021). Os resultados obtidos para produção de gelatinase diferem de outros estudos onde nenhum isolado apresentou atividade da gelatinase (Colombo et al., 2020; Breyer et al., 2021). Já as BAL analisadas por outros autores não apresentaram β -hemólise ou α -hemólise (Cui et al., 2018; Colombo et al., 2020; Breyer et al., 2021).

Na sequência deste estudo foi selecionada a BAL que demonstrou maior atividade proteolítica, *Lactococcus lactis* 32B4-1. Optou-se por aplicá-la diretamente em um produto, a fim de fermentá-lo e avaliarmos os parâmetros da fermentação, bem como as bioatividades deste produto final. Optamos por fermentar leite de búfala, tendo em vista que não foi encontrado na literatura até o presente momento, nenhum artigo que utilizou *Lactococcus lactis* para fermentar leite bubalino. Nesse contexto, foi proposto o estudo realizado no artigo 3 deste trabalho.

Em relação aos parâmetros de fermentação, foi observado inicialmente um aumento na contagem de células viáveis de *Lactococcus lactis* 32B4-1 no leite de búfala fermentado e após 24 h houve uma redução na contagem. Esse decréscimo de bactérias viáveis durante a fermentação de 24 a 48 h pode ser devido ao consumo de nutrientes do meio resultando na manutenção insuficiente do crescimento microbiano (Liang et al., 2022). O pH e a acidez titulável também foram avaliados, sendo que pH do leite de búfala fermentado diminuiu com o tempo de fermentação e a acidez titulável aumentou. Na literatura, outros autores ao produzirem um produto lácteo fermentado com BAL encontraram resultados semelhantes em relação ao comportamento do pH e acidez titulável (Al-Manhel; Niamah, 2017; How et al., 2022; Sun et al., 2023). Outro parâmetro avaliado foi a sinérese, que foi similar aos

resultados de Peng et al. (2009) e How et al. (2022), pois a sinérese aumentou à medida que o tempo de fermentação aumentou.

Além dos parâmetros de fermentação, as características do produto final também foram avaliadas e constatou-se que ele atendeu aos requisitos da Instrução Normativa nº 46/2007, que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (Brasil, 2007). O teor de gordura do leite fermentado do presente estudo foi similar ao obtido no iogurte de leite de búfala preparado por Lima et al. (2020), enquanto outros autores encontraram teores de gordura superiores (Caldeira et al., 2010; Terzioglu et al., 2023). Já para os teores de proteína, valores inferiores foram relatados em outros estudos da literatura (Caldeira et al., 2010; Lima et al., 2020; Rosa et al., 2023), enquanto Terzioglu et al. (2023) obtiveram teores ligeiramente superiores (5,31 g/100 g) para o iogurte de leite de búfala. Essa variação encontrada nos estudos pode estar relacionada com a composição da matéria-prima usada na elaboração dos produtos lácteos. Além disso, os teores de acidez também foram avaliados e alguns estudos obtiveram valores semelhantes para o iogurte de leite de búfala (Akgun et al., 2016; Lima et al., 2020; Terzioglu et al., 2023), enquanto outros autores obtiveram resultados inferiores para os produtos lácteos de búfala (Caldeira et al., 2010; Rosa et al., 2023). Caldeira et al. (2010) aponta que essa variação nos valores de acidez em diferentes produtos lácteos pode estar relacionada ao tipo e à concentração de cultura láctea utilizada, à atividade desta cultura, aos ingredientes usados na elaboração, considerando que alguns produtos levam soro de leite na formulação, assim como o tempo de armazenamento do produto pode influenciar nesse parâmetro.

A atividade antioxidante do leite de búfala fermentado também foi avaliada através de diferentes metodologias, tendo em vista que os antioxidantes possuem diferentes modos de ação. Os resultados da atividade antioxidante através da captura do radical ABTS e radical DPPH apresentaram o mesmo comportamento que outros estudos na literatura, pois o leite fermentado apresentou eliminação dos radicais superior ao leite não fermentado. Contudo, os resultados do presente estudo para eliminação do radical ABTS foram inferiores em comparação com o leite de camelo e leite bovino fermentado por *Lactococcus lactis* KX881782 (Ayyash et al., 2018), leite de soja fermentado por *Lactiplantibacillus plantarum* P101 (Zhang et al., 2023), leite de ovelha fermentado por *Lactobacillus plantarum* KGL3A (Ashokbhai et al., 2022) e leite de cabra fermentado por *Lactobacillus fermentum* (M4) (Panchal et al., 2020). Já

para a eliminação do radical DPPH, os resultados do presente estudo foram semelhantes aos obtidos para o iogurte de leite de búfala (Mohsin et al. 2022), para o leite de soja fermentado por *Lactiplantibacillus plantarum* P101 (Zhang et al., 2023) e para o leite de camelo fermentado por *Lactococcus lactis* KX881782 (Ayyash et al., 2018) e superiores ao leite de feijão mungo fermentado por *Lactococcus lactis* RQ1066 (Liang et al., 2022). Além disso, também foi avaliada a capacidade do leite de búfala fermentado quelar Fe^{2+} . Os resultados do presente estudo foram similares ao de Corrêa et al. (2014), pois os hidrolisados de soro de queijo de ovelha também mostraram uma tendência decrescente após apresentaram atividade quelante máxima. Esse declínio observado na capacidade quelante após 24 h, pode indicar que os peptídeos responsáveis pela atividade observada foram mais clivados, e os produtos foram menos capazes de quelar ferro. Por fim, o poder redutor foi outra metodologia utilizada, a fim de avaliar a capacidade do leite de búfala fermentado reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Semelhante a literatura, a fermentação do leite provocou aumentos no poder redutor, em relação ao leite não fermentado. No entanto, resultados superiores foram obtidos por Liang et al. (2022), ao fermentar leite de feijão mungo com *Lactococcus lactis* RQ1066 e, por Handa et al. (2022), ao fermentar leite de grão de bico com *Lactiplantibacillus pentosus* Himuka-SU5 e com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Amami-SU1. Essas variações na atividade antioxidante podem estar relacionadas ao fato de que esses ensaios são baseados em várias reações que podem ser impactadas de forma diferente por sistemas moleculares únicos envolvidos na defesa do estresse oxidativo.

Além da atividade antioxidante, a atividade anti-hipertensiva do leite de búfala fermentado também foi avaliada através da capacidade em inibir a atividade da ACE. Os resultados obtidos foram semelhantes ao de outros autores que também reportaram aumento na atividade inibitória da ACE dos produtos lácteos ao longo do tempo de fermentação (Abdel-Hamid et al., 2017; Khakhariya et al., 2023, Solanki et al., 2017). Entretanto, os resultados obtidos para o leite de búfala fermentado por *Lactococcus lactis* 32B4-1 foram superiores ao leite de búfala e de camelo fermentado por *Lacticaseibacillus paracasei* M11 e *Saccharomyces cerevisiae* WBS2A (Khakhariya et al., 2023), leite bovino e de camelo fermentado por *Lactococcus lactis* KX881782 (Ayyash et al., 2018) e leite de camelo fermentado por *Lactobacillus bulgaricus* NCDC (09) e *Lactobacillus fermentum* TDS030603 (LBF) (Solanki et al., 2017). A partir dessas bioatividades *in vitro*, e considerando a relevância de tais

atividades biológicas das perspectivas de nutrição e saúde humana, sugere-se avaliar o leite de búfala fermentado quanto ao seu perfil peptídico.

Na sequência deste estudo, a BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi utilizada em conjunto com *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 como uma cultura *starter* autóctone para elaboração de um queijo tipo colonial de búfala.

Inicialmente, *Lactococcus lactis* 32B4-1 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5 foram caracterizados quanto a suas propriedades tecnológicas, demonstrando atividade proteolítica e lipolítica, características desejáveis para culturas *starters*, pois contribuem para o sabor e aroma do produto final (García-Cano et al., 2019). Há diversos estudos que investigaram e também encontraram essas propriedades nas BAL (Franciosi et al., 2009; Ribeiro et al., 2013; Terzic-Vidojevic et al., 2015; Cabral et al., 2016; Câmara et al., 2019; Araújo-Rodrigues et al., 2021). Além disso, as BAL foram produtoras de EPS, característica relevante para modificar a textura e as propriedades reológicas dos produtos lácteos (Ribeiro et al., 2013). Embora seja uma característica importante para uma cultura *starter*, ao estudar as BAL para esta finalidade, Franciosi et al. (2009), Ribeiro et al. (2013) e Câmara et al. (2019) não encontraram microrganismos produtores de EPS. Os resultados encontrados para a acidificação do leite corroboram com a literatura, pois diversos estudos já demonstraram a capacidade de *Lactococcus lactis* acidificar rapidamente o leite (Franciosi et al., 2009; Terzic-Vidojevic et al., 2015; Bayili et al., 2020), enquanto *Leuconostoc* apresenta essa característica mais lenta (Badis et al., 2004; Cabral et al., 2016). Em relação a capacidade dos microrganismos de crescer em diferentes temperaturas, os resultados do presente estudo foram semelhantes ao de Terzic-Vidojevic et al. (2015), que também observaram a capacidade de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGAL1-4 e *Lactococcus lactis* ZGBP5-9 crescer em 15, 30 e 37 °C, enquanto em 45 °C não houve crescimento., enquanto Ribeiro et al. (2013) verificaram que *Lactococcus lactis* foi capaz de crescer em 15 °C e 30 °C, enquanto em 4 °C e 45 °C a atividade do microrganismo foi afetada. Ademais, os resultados para capacidade de tolerância ao NaCl sugerem que estes microrganismos possuem a capacidade de tolerar condições adversas que podem ser encontradas durante o processo de fabricação de queijo (Ribeiro et al., 2013). Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Araújo-Rodrigues et al. 2021), onde as BAL avaliadas para o desenvolvimento de uma cultura *starter* autóctone, também se mostraram bem adaptadas a diferentes concentrações de NaCl (2%, 5% e 10%). Já no estudo de

Ribeiro et al. (2013), *Lactococcus lactis* somente cresceu na presença de 2% de NaCl, enquanto em concentrações maiores (6% e 10% de NaCl), a bactéria não se desenvolveu. Além da avaliação das propriedades tecnológicas, as BAL também foram consideradas inócuas, resultados similares foram reportados na literatura (Ribeiro et al., 2013; Dias et al., 2019; Harmoko et al., 2022).

Após a caracterização, as BAL foram utilizadas como cultura *starter* de um queijo colonial de búfala. Contudo, devido aos resultados de umidade e gordura não se enquadrarem com o RTIQ de Queijo Colonial Artesanal da IN nº 002/2023 (Rio Grande do Sul, 2023), os queijos elaborados neste estudo foram denominados de queijo tipo colonial artesanal.

Os queijos foram analisados quanto aos parâmetros microbiológicos e para a contagem de microrganismos mesófilos, os resultados obtidos foram inferiores a outros estudos que avaliaram este parâmetro no queijo colonial no Rio Grande do Sul (Schmitt et al., 2011; Funck et al., 2015; Benincá et al., 2022), porém superior ao reportado para queijos coloniais na região Sudoeste do Paraná (Casaril et al., 2017). Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, resultados similares foram obtidos por Casaril et al. (2017), pois não detectaram a presença deste microrganismo nas amostras de queijo colonial em seu estudo. Em contraste, resultados inferiores foram encontrados por outros autores na literatura, pois foi detectado *Staphylococcus* coagulase positivo, acima do permitido pela legislação, em amostras de queijos coloniais (Schmitt et al., 2011; Tavares et al., 2019; Ausani et al., 2019; Carvalho et al., 2019). Para a contagem de coliformes, especialmente para o Queijo elaborado com a cultura *starter* autóctone, os resultados corroboram com o estudo de Armachuk et al. (2019), pois conforme aumentou o período de maturação, a contagem de coliformes termotolerantes e totais reduziu, atendendo a legislação. Entretanto, em estudos desenvolvidos com queijos coloniais artesanais que estavam sendo comercializados, diferentes autores reportaram valores acima do permitido pela legislação brasileira (Zaffari et al., 2007; Schmitt et al., 2011; Funck et al., 2015; Carvalho et al., 2019). Além disso, a ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* também foi reportada à literatura por outros autores que avaliaram o queijo colonial (Funck et al., 2015; Armachuk et al., 2019; Carvalho et al., 2019; Ruschel et al., 2019; Tavares et al., 2019). Entretanto, outros estudos detectaram a presença de *Salmonella* spp. em 17,85% (Antonello et al., 2012) e 10% (Casaril et al., 2017) das amostras de queijo colonial. Ao avaliar a qualidade microbiológica do queijo

colonial gaúcho, Roldan et al. (2022) também observaram a ausência de *Salmonella* spp., no entanto os autores verificaram presença de *Listeria monocytogenes* em 18 amostras de queijo colonial, de um total de 293 amostras. Já no estudo desenvolvido por Zaffari et al. (2007), também foi detectada a presença deste patógeno em 13 amostras de queijos artesanais comercializados na região litorânea norte do Estado do Rio Grande do Sul. Ausani et al. (2019) também reportaram a presença de *Listeria monocytogenes* em 6 amostras de queijo colonial comercializados em Porto Alegre.

Além disso, foi avaliado o perfil de ácidos graxos dos queijos, onde foi observada a predominância dos ácidos graxos saturados, o que já era esperado, tendo em vista que produtos originários de ruminantes, contém por natureza, maior quantidade desses ácidos em sua composição em virtude do processo de biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados no rúmen (Antunes et al., 2018). Além disso, os resultados obtidos neste estudo corroboram com a literatura, pois outros autores também encontraram predominância dos ácidos graxos palmítico, esteárico e mirístico (Oliveira et al., 2009; Pellegrini et al., 2013; Carafa et al., 2019). Em relação aos ácidos graxos monoinsaturados, os resultados foram semelhantes ao de Martins et al. (2012), que também observaram a presença de ácido oleico, seguido de ácido palmitoleico no queijo minas frescal produzido com leite de vaca que eram alimentadas com dietas contendo cana-de-açúcar, silagem de sorgo, silagem de girassol e capim-tanzânia. Já Oliveira et al. (2009) também observaram a predominância do ácido oleico no queijo muçarela de búfala, sendo que este ácido aumentou significativamente quando as búfalas recebiam diferentes fontes de lipídeos na dieta, como grãos de soja e óleo de soja. Além disso, os ácidos graxos poliinsaturados foram encontrados em menor quantidade, corroborando com a literatura, sendo que ácido α -linolênico (C18:3 (n3)) e o ácido linoleico (C18:2 – cis (n6)) foram os mais predominantes. Oliveira et al. (2009) reportaram um teor de ácidos graxos poliinsaturados (2,90%) no queijo muçarela de búfala próximo ao do presente estudo, no entanto, o valor de ácidos graxos poliinsaturados aumentou quando os animais recebiam grãos de soja (3,97%) e óleo de soja (3,25%). Os autores também observaram a predominância de ácido linoleico (C18:2 – cis (n6)), seguido por ácido linoleico conjugado (C18:2 (9c,11t)) (Oliveira et al., 2009). Já no estudo de Olivo et al. (2021), queijos elaborados com *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus* apresentaram teores superiores de ácido linoleico, em comparação aos queijos produzidos somente com *Lactobacillus helveticus*. Em contrapartida, os teores de

ácido α -linolênico foram superiores para os queijos elaborados com a cultura *starter Lactobacillus helveticus* (Olivo et al., 2021).

Ao elaborar um queijo colonial de búfala houve uma curiosidade maior acerca dos queijos artesanais produzidos no Rio Grande do Sul, tendo em vista que essa é uma produção tradicional no estado. Aliado a oportunidade de publicar no livro "Alimentos funcionais: produtos voltados aos cuidados com a saúde e bem-estar, imunidade e longevidade", foi desenvolvido um capítulo de livro intitulado como "Queijo artesanal no Rio Grande do Sul".

O capítulo de livro mostra uma ampla legislação vigente que norteia os produtores acerca das normas a serem seguidas, a exemplo cita-se o RTIQ dos Produtos Lácteos, publicado pela Portaria nº 146/1996 do MAPA, que tem como objetivo fixar a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverão possuir os queijos e outros derivados (Brasil, 1996). Ainda, o MAPA também normatiza as boas práticas agropecuárias na produção de leite destinado à produção de derivados lácteos de forma artesanal, através da Instrução Normativa nº 73/2019 (Brasil, 2019). Especificamente no estado do Rio Grande do Sul, a Lei nº 15615/2021 dispõe sobre a produção e a comercialização de queijos artesanais de leite cru (Rio Grande do Sul, 2021). Ademais, o estado também possui uma legislação específica para o queijo artesanal tipo serrano, a Lei nº 14973/2016 (Rio Grande do Sul, 2016), tendo em vista que é um queijo tradicional no estado. E recentemente também foi aprovado o RTIQ do Queijo Colonial Artesanal, através da Instrução Normativa Nº 002/2023 (Rio Grande do Sul, 2023).

Apesar de uma legislação vigente, constatou-se que há muitos queijos produzidos que não atendem a qualidade higiênico-sanitária, conforme constatado nos estudos (Pereira et al., 2016; Tavares et al., 2019; Erhardt et al., 2023; Santos et al., 2023). O que demonstra a importância de adotar as boas práticas de fabricação e boas práticas de higiene, a fim de evitar contaminações no produto (Forsythe, 2013).

Contudo, os queijos artesanais são considerados uma herança cultural da colonização alemã e italiana no estado do Rio Grande do Sul, sendo uma atividade que foi passada de geração em geração. Produzidos inicialmente para consumo familiar, os queijos passaram a ser uma fonte de renda extra e hoje são comercializados em todo estado. Trata-se de um produto muito apreciado pelos consumidores, que o escolhem baseados em critérios que compreendem o valor patrimonial, cultural e social do produto (Ambrosini et al., 2020; Braccini et al., 2020).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo foi o primeiro realizado no estado do Rio Grande do Sul, com a finalidade de avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e prospectar BAL do soro de leite de búfala. O soro de leite apresentou características físico-químicas e microbiológicas satisfatórias, atendendo as exigências mínimas da IN n° 94/2020, e de acordo com a literatura revisada.

Neste estudo foi possível isolar 62 BAL do soro de leite de búfala, sendo 93,55% (n=58) *Lactococcus lactis*, 4,84% (n=3) *Enterococcus faecium* e 1,61% (n=1) *Lactocaseibacillus paracasei*. Foi avaliado a inocuidade destes microrganismos e observou-se que 46,77% das BAL foram consideradas inócuas, pois não demonstraram atividade hemolítica e atividade da gelatinase. Além disso, foram avaliadas as propriedades tecnológicas das BAL isoladas do soro de leite de búfala, as quais apresentaram características tecnológicas de interesse industrial, como propriedades proteolíticas (98,38%), lipolíticas (83,87%) e atividade antimicrobiana (69,35%), demonstrando potencial para estudos em bioprocessos e prospecção do potencial funcional.

Além disso, neste estudo a BAL *Lactococcus lactis* 32B4-1 foi selecionada e aplicada como uma cultura *starter* para produzir um produto lácteo bubalino, o que se mostrou como uma opção viável, tendo em vista que a BAL foi capaz de fermentar o leite de búfala, reduzindo o pH, aumentando a contagem de células viáveis, a acidez titulável e a sinérese, resultando em um produto que atende a IN n° 46/2007. Aliado a isso, o leite de búfala fermentado apresentou atividades biológicas, como atividade antioxidante e anti-hipertensiva.

Neste estudo também foi elaborado um queijo tipo colonial artesanal de búfala, que foi produzido com a cultura *starter* autóctone *Lactococcus lactis* 32B4-1 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5. As BAL utilizadas foram consideradas inócuas e demonstraram atividade proteolítica, lipolítica, produção de EPS, capacidade de acidificar o leite, além de crescer em diferentes temperaturas e concentrações de sal, características desejáveis para uma cultura *starter*. Os queijos elaborados com esta cultura *starter* foram denominados de queijo tipo colonial artesanal, pois não atenderam aos parâmetros de gordura e umidade da Instrução Normativa n° 002/2023, para Queijo Colonial Artesanal. Já os parâmetros microbiológicos foram atendidos após 60 dias de maturação. Além disso, foram identificados 24 ácidos

graxos nos queijos, dos quais 13 eram saturados, 6 monoinsaturados e 5 poliinsaturados. Portanto, *Lactococcus lactis* 32B4-1 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 5.5. possuem potencial para serem empregadas como culturas *starters*, contribuindo para a qualidade e características desejáveis do queijo tipo colonial de búfala.

Ademais, esse estudo contribui para a inovação e expansão do mercado de produtos de origem bubalina. Considerando que foi utilizado o leite de búfala na elaboração de novos produtos, abre-se espaço para uma nova área que pode ser explorada pelos produtores e pela indústria de laticínios, tendo em vista que a produção de leite bubalino é um mercado em crescimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarquero D, Bodelón R, Flórez AB, Fresno JM, Renes E, Mayo B, Tornadijo ME. 2023. Technological and safety assessment of selected lactic acid bacteria for cheese starter cultures design: Enzymatic and antimicrobial activity, antibiotic resistance and biogenic amine production. *LWT – Food Sci. Technol.* 180:114709.
- Abdel-Hamid M, Otte J, Gobba CD, Osman A, Hamad E. 2017. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidante capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *Int. Dairy J.* 66:91-98.
- Abdel-Hamid M, Romeih E, Gamba RR, Nagai E, Suzuki T, Koyanagi T, Enomoto T. 2019. The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. *Int. Dairy J.* 91:1-8.
- Agagündüz D, Sahin TO, Ayten S, Yılmaz B, Günesliol BE, Russo P, Spano G, Özogul F. 2022. Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry. *Food Biosci.* 47:101617.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa - IN nº 76, de 5 de novembro de 2020. Diário Oficial da União: ed. 215, seção 1, pg. 75.
- Aguilar-Toalá JE, Santiago-López L, Peres CM, Peres C, Garcia HS, Vallejo-Cordoba B, González-Córdova AF, Hernández-Mendoza A. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *L. Dairy Sci.* 100:65-75.
- Ahangari H, Yazdani P, Ebrahimi V, Soofiyan SR, Azargun R, Tarhriz V, Eyvazi S. 2021. An Updated review on production of food derived bioactive peptides; focus on the psychrotrophic bacterial proteases. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 35:102051.
- Ahmad T, Aadil RM, Ahmed H, Rahman UU, Soares BCV, Souza SLQ, Pimentel TC, Scudino H, Guimarães JT, Esmerino EA, Freitas MQ, Almada RB, Vendramel SMR, Silva MC, Cruz AG. 2019. Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 88:361-372.
- Aider M, Halleux D, Akbache A. 2007. Whey cryoconcentration and impact on its composition. *J. Food Eng.* 82(1):92-102.
- Akgun A, Yazici F, Gulec HA. 2016. Effect of reduced fat content on the physicochemical and microbiological properties of buffalo milk yoghurt. *LWT - Food Sci. Technol.* 74:521-527.
- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. 2013. Review on in vivo and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmac. J.* 21:143-152.
- Al-Manhel AJ, Niamah AK. 2017. Mannan extract from *Saccharomyces cerevisiae* used as prebiotic in bioyogurt production from buffalo milk. *International Food Res. J.* 24(5):2259-2264.
- Aluko RE. 2015. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Curr. Opin. Food Sci.* 4:44-50.
- Ambrosini LB, Kroeff DR, Matte A, Cruz FT, Waquil PD. 2020. Sabor, história e economia local: percepções dos consumidores gaúchos sobre o Queijo Colonial. *Pesq. Agropec. Gaúcha.* 26(1):201-221.
- Antonello L, Kupkovski A, Bravo CC. 2012. Qualidade microbiológica de queijos coloniais comercializados em Francisco Beltrão, Paraná. *Rev. Thema.* 9(1):1-6.

- Antunes CR, Rocha VR, Caldeira LA, Reis ST, Menezes JC, Silva DP. 2018. Perfil lipídico do queijo e do leite de vacas alimentadas com casca de banana. *Rev. Bras. Ciênc. Agrár.* 13(1):1-9.
- AOAC International. 2008. Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 2008.06-2008: Moisture and fat in meats microwave and nuclear magnetic resonance analysis.
- AOCS. 2009. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.
- Araújo JPA, Camargo AC, Carvalho AF, Nero LA. 2020. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 72(5):1845-1860.
- Araújo-Rodrigues H, Santos MTPG, Ruiz-Moyano S, Tavaría FK, Martins APL, Alvarenga N, Pintado ME. 2021. Technological and protective performance of LAB isolated from Serpa PDO cheese: Towards selection and development of an autochthonous starter culture. *LWT - Food Sci. Technol.* 150:112079.
- Argenta AB, De Lima JJ, Nogueira A, Scheer AP. 2021. Evaluation of concentration process of bovine, goat and buffalo whey proteins by ultrafiltration. *J. Food Sci. Technol.* 58(5):1663-1672.
- Argenta AB, Scheer ADP. 2019. Membrane separation processes applied to whey: A review. *Food Ver. Int.* 36(5):499-528.
- Armachuk MA, Mello EZ, Ruschel J, Castro-Cislaghi FP, Badaró ACL. 2019. Microbiological and physicochemical modifications during ripening of artisanal colonial cheese made from raw milk. *Rev. Higien. Aliment.* 33:1938-1942.
- Ashokbhai JK, Basaiawmoit B, Sakure A, Das S, Patil GB, Mankad M, Hati S. 2022. Purification and characterization of antioxidative and antimicrobial peptides from lactic-fermented sheep milk. *J. Food Sci. Technol.* 59(11):4262-4272.
- Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. **O búfalo**. 2023. Disponível em: <<https://bufalo.com.br/>>. Acesso em: 17 fev. 2023.
- Atanasova J, Moncheva P, Ivanova I. 2014. Proteolytic and antimicrobial activity of lactic acid bacteria grown in goat milk. *Biotechnol. Equip.* 28(6):1073-1078.
- Ausani TC, Lopes GV, Costa EF, Corbellini LG, Cardoso M. 2019. Microbiological quality of colonial cheese sold in Porto Alegre-RS. *Semina: Ciênc. Agrár.* 40(2):639-650.
- Ayyash M, Al-Dhaheiri AS, Mahadin SA, Kizhakkayil J, Abushelaibi A. 2018. *In vitro* investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *J. Dairy Sci.* 101:900-911.
- Badely M, Sepandi M, Samadi M, Parastouei K, Taghdir M. 2019. The effect of whey protein on the components of metabolic syndrome in overweight and obese individuals; a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab. Syndr.: Clin. Res. Rev.* 13: 3121-3131.
- Badis A, Guetarni D, Moussa-Boudjemâa B, Hennic DE, Tornadijod ME, Kihal M. 2004. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.* 21(3):343-349.
- Badpa A, Ahmad S. 2014. Effect of Incorporation of whey Protein Concentrate on Quality. *J. Buffalo Sci.* 3:48-54.

- Bald JA, Vincenzi A, Gennari A, Lehn DN, Souza CFV. 2014. Características Físico-Químicas de Soros de Queijo e Ricota Produzidos no Vale do Taquari, RS. *Rev. Jovens Pesqui.* 4(1):90-99.
- Bao Q, Liu W, Yu J, Wang W, Qing M, Chen X, Wang F, Zhang J, Zhang W, Qiao J, Sun T, Zhang H. 2012. Isolation and identification of cultivable lactic acid bacteria in traditional yak milk products of Gansu Province in China. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58:95–105.
- Bartkiene E, Lele V, Ruzauskas M, Domig KJ, Starkute V, Zavistanaviciute P, Bartkevics V, Pugajeva I, Klupsaite D, Juodeikiene G, Mickiene R, Rocha JM. 2020. Lactic Acid Bacteria Isolation from Spontaneous Sourdough and Their Characterization Including Antimicrobial and Antifungal Properties Evaluation. *Microorganisms.* 8(64):1-20.
- Basciani S, Camajani E, Contini S, Persichetti A, Risi R, Bertoldi L, Strigari L, Prossomariti G, Watanabe M, Mariani S. 2020. Very-low-calorie ketogenic diets with whey, vegetable, or animal protein in patients with obesity: A randomized pilot study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 105(9):2939-2949.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
- Bayili GR, Johansen PG, Hougaard AB, Diawara B, Ouedraogo GA, Jespersen L, Sawadogo-Lingani H. 2020. Technological properties of indigenous *Lactococcus lactis* strains isolated from Lait caillé, a spontaneous fermented milk from Burkina Faso. *J. Dairy Res.* 87:110–116.
- Bechaux J, Gatellier P, Page JPL, Drillet Y, Sante-Lhoutellier V. 2019. A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications. *The Royal Soc. Chem.* 10:6244–6266.
- Beganovic J, Kos B, Pavunc AL, Uroic K, Jokic M, Suskovic J. 2014. Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. *Microbiol. Res.* 169:623-632.
- Bendimerad N, Kihal M, Berthier F. 2012. Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy Sci. & Technol.* 92:249-264.
- Benincá T, Santos VZ, Sant'Anna V, Berreta MSR. 2022. Correlação entre dados microbiológicos e físico-químicos com as boas práticas de fabricação de queijos coloniais produzidos no Sul do Brasil. *Cadernos Ciênc. Tecnol.* 39(3):e27176.
- Bernardes O. 2007. Buffaloes breeding in Brasil. *Ital J Anim Sci.* 6:162-167.
- Bintsis T. 2018. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *Microbiol.* 4(4):665-684.
- Bintsis T, Papademas P. 2022. The Evolution of Fermented Milks, from Artisanal to Industrial Products: A Critical Review. *Fermentation.* 8:679.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Bioch.* 37:911-17.
- Bogo M, Cruz KL, Revello AG, Frazzon APG, Motta AS. 2017. An Investigation of Proteolytic, Lipolytic Activity and Biofilm Formation by Psychrotrophic Bacteria Isolated from Buffalo Milk. *J. Buffalo Sci.* 6:54-60.
- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Douglas RC. 2003. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Am. Soc. Microbiol.* 69(12):7336-7342.
- Braccini VP, Piovesan RT, Brandão JB, Richards NSPS. 2020. De onde vem o seu queijo? O cenário da comercialização do queijo tipo colonial em feiras do

- município de Santa Maria, RS, Brasil. In.: *Produtos Lácteos: Desenvolvimento & Tecnologia*. Mérida Publishers.
- Brandielli MC. 2016. **Queijo regional do sudoeste do Paraná durante a maturação: caracterização microbiológica, química e física**. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci. Technol.* 28:25-30.
- Brasil. 2006. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físicoquímicos, para controle de leite e produtos lácteos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, p. 8.
- Brasil. 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 146, de 07 de março de 1996.
- Brasil. 2007. Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. Diário Oficial da União: seção 1, p. 4
- Brasil. 2018. Instrução Normativa nº 30, de 13 de julho de 2018. Diário Oficial da União: Ed. 134, Seção 1, p. 9.
- Brasil. 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 73, de 23 de dezembro de 2019.
- Brasil. 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal. Brasília: MAPA.
- Brasil. 2020. Instrução Normativa nº 80 de 13 de agosto de 2020. Diário Oficial da União: ed. 157, seção 1, p. 2.
- Breyer GM, Arechavaleta NN, Siqueira FM, Motta AS. 2021. Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stress. *Probiotics Antimicro. Prot.* 13:468–483.
- Bruno LM, Carvalho JDG. 2009. *Microbiota Láctica de Queijos Artesanais*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 30 p.
- Cabral MLB, Lima MSF, Fernandes GAA, Costa EF, Porto ALF, Cavalcanti MTH. 2016. Artisan cheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures. *J. Bioen. Food Sci.* 3(4):207-215.
- Caldeira LA, Ferrão SPB, Fernandes SAA, Magnavita APA, Santos TDR. 2010. Development of strawberry-flavored milk drink using different yoghurt levels and whey obtained from buffalo's milk. *Ciênc Rural.* 40(10):2193-2198.
- Câmara SC, Dapkevicius A, Riquelme C, Elias RB, Silva CCG, Malcata FX, Dapkevicius MLNE. 2019. Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. *Food Sci. Technol. Int.* 25(4):303-317.
- Carafa I, Stocco G, Franceschi P, Summer A, Tuohy KM, Bittante G, Franciosi E. 2019. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter and non-starter cultures for the production of Traditional Mountain cheese. *Food Res. Int.* 115:209–218.
- Carpiné D, Dagostin JLA, Santa HSD, Alvarez DC, Terra NN, Santa ORD. 2010. Proteolytic and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal sausages. *Ambiência.* 6(1):125-132.
- Carvalho MM, Fariña LO, Strongin D, Ferreira CLL, Lindner JDD. 2019. Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. *J. Dairy Sci.* 102:9711-9720.

- Casaril KBPB, Bento CBP, Henning K, Pereira M, Dias VA. 2017. Qualidade microbiológica de salames e queijos coloniais produzidos e comercializados na região sudoeste do Paraná. Ver. Bras. Agropec. Sustent. 7(2):75-85.
- Cavalcante JFM, Andrade NJ, Furtado MM, Ferreira CLLF, Pinto CLO, Elard E. 2007. Manufacture of regional coalho type cheese by using pasteurized and standardized cow milk added with endogenous lactic acid culture. Ciênc. Tecnol. Aliment. 27(1):205-214.
- Cavali J, Pereira RGA. 2020. **Produção leiteira de búfalos**. In: Salman AKD, Pfeifer LFM. Pecuária leiteira na Amazônia. Brasília, DF: Embrapa, p. 391-399.
- Chang CY, Wu KC, Chiang SH. 2007. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. Food Chem. 100:1537-1543.
- Charteris W, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. 1998. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. J. Food Protect. 16(12):1636-1643.
- Chittora D, Meena BR, Jain T, Sharma K. 2022. Biopreservation: bacteriocins and lactic acid bacteria. J. Postharvest Technol. 10(2):1-15.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2020. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Colombo M, Nero LA, Todorov SD. 2020. Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. Braz. J. Microbiol. 51:787-795.
- Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, Cresci A. 2014. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYN BIO® against pathogens. J. Appl. Microbiol. 117(2):518-27.
- Comino E, Riggio VA, Rosso M. 2012. Biogas production by anaerobic co-digestion of cattle slurry and cheese whey. Bioresour. Technol. 114:46-53.
- Corrêa APF, Daroit DJ, Fontoura R, Meira SMM, Segalin J, Brandelli A. 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. Peptides. 61:48-55.
- Costa ALP, Silva Júnior ACS. 2017. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. Estaç. Cient. 7(2):45-57.
- Costa HHS, Souza MR, Acúrcio LB, Cunha AF, Resende MFS, Nunes AC. 2013. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese from Serra da Canastra, MG. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 65(6):1858-1866.
- Courvalin P. 2006. Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. Dig. Liver Dis. 38 Suppl 2:S261-5.
- Cui L, Yang G, Lu S, Zeng X, He J, Guo Y, Pan D, Wu Z. 2022. Antioxidant peptides derived from hydrolyzed milk proteins by *Lactobacillus* strains: A BIOPEP-UWM database-based analysis. Food Res. Int. 156:111339.
- Cui X, Shi Y, Gu S, Yan X, Chen H, Ge J. 2018. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China Against Enteropathogenic Bacteria. Probiotics and Antimicrob. Proteins. 10:601-610.
- Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol. 20:1637-1648.

- Daroit DJ, Corrêa APF, Brandelli A. 2009. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. Int. Biodeter. Biodeg. 63:358-363.
- Dashti AA, Jadaon MM, Dashti H. 2009. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. Kuwait Med. J. 41(2):117-122.
- Da Silva B, Vinhal GLRRB, Barcia MT, Pertuzatti PB. 2015. Influence of acerola (*Malpighia* ssp.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) addition on the content of bioactive compounds, proximate and sensory composition of whey beverages. J. Food Process. Preserv. 40(4):688-696.
- Desconsi AC, Izário Filho HJ, Salazar RFS. 2014. Avaliação físico-química e microbiológica do soro de leite concentrado obtido por osmose inversa. Amb. Água - An Interdiscip. J. Applied Sci. 9:325-335.
- Desniar, Rusmana I, Suwanto A, Mubarak NR. 2013. Characterization of lactic acid bacteria isolated from an Indonesian fermented fish (bekasam) and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. Emir. J. Food Agric. 25(6):489-494.
- Dias MRS, Fusieger A, Motta AS. 2019. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from sheep milk for potential use as non-starter cultures. Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes.74:13-24.
- Divisekera DMWD, Samarasekera JKRR, Hettiarachchi C, Gooneratne J, Choudhary MI, Gopalakrishnan S. 2019. Isolation and identification of lactic acid bacteria with probiotic potential from fermented flour of selected banana varieties grown in Sri Lanka. J. Natl. Sci. Found Sri Lanka. 47:3–16.
- Dlamini ZC, Langa RLS, Aiyegoro OA, Okoh AI. 2019. Safety Evaluation and Colonisation Abilities of Four Lactic Acid Bacteria as Future Probiotics. Probiotics Antimicrob. Proteins. 11:397–402.
- Domenico VL, Motta AS. 2022. **Manual de boas práticas agropecuárias na ordenha: bubalinocultura**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 30 p.
- Duarte VS, Carlot M, Pakroo S, Tarrah A, Lombardi A, Santiago H, Corich V, Giacomini A. 2020. Comparative evaluation of cheese whey microbial composition from four Italian cheese factories by viable counts and 16S rRNA gene amplicon sequencing. Int. Dairy J. 104:104656.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). 2021. **Queijos artesanais brasileiros**. Brasília, DF, 16 p.
- Ercolini D, Frisso G, Mauriello G, Salvatore F, Coppola S. 2008. Microbial diversity in Natural Whey Cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. Int. J. Food Microbiol. 124:164-170.
- Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S. 2001. The Potential of a Polyphasic PCR-DGGE Approach in Evaluating Microbial Diversity of Natural Whey Cultures for Water-Buffered Mozzarella Cheese Production: Bias of Culture-Dependent and Culture-Independent Analyses. System. Appl. Microbiol. 24:610–617.
- Erhardt MM, Fröder H, Oliveira WC, Richards NSPS. 2023. Microbial diversity in artisanal cheese produced and commercialized in Vale do Taquari in southern Brazil. Brazilian J. Biol. 83:e270737.
- Esteban-Torres M, Mancheño JM, De Las Rivas B, Muñoz R. Production and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* suitable for cheese lipolysis. J. Dairy Sci. 97:6737–6744.

- Falardeau J, Keeney K, Trmčić, A, Kitts D, Wang S. 2019. Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. *Food Microbiol.* 83:48-58.
- Fara A, Sabater C, Palacios J, Requena T, Montilla A, Zárata G, 2020. Prebiotic galactooligosaccharides production from lactose and lactulose by: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450. *Food Funct.* 11:5875–5886.
- Farahani Z, Rassoli I, Owlia P. 2017. Isolation identification and characterization of indigenous lactic acid bacteria for flavour improvement. *Int. Food Res. J.* 24(1):428-436.
- Farid W, Masud T, Sohail A, Ahmad N, Naqvi SM, Khan S, Ali A, Khalifa SA, Hussain A, Ali S, Saghir M, Siddeeg A, Manzoor FM. 2021. Gastrointestinal transit tolerance, cell surface hydrophobicity, and functional attributes of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from Indigenous Dahi. *Food Sci. Nutr.* 9:5092–5102.
- Feng C, Tian L, Hong H, Wang Q, Zhan X, Luo Y, Tan Y. 2022. *In vitro* gut fermentation of whey protein hydrolysate: An evaluation of its potential modulation on infant gut microbiome. *Nutrients.* 14:1374.
- Ferreira LO, Pimenta CJ, Santos G, Ramos TM, Pereira PAP, Pinheiro ACM. 2012. Addition of whey and coffee in the quality of dulce de leche paste. *Ciênc. Rural.* 42(7):1314-1319.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). 2002. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2023.
- Forsythe, S. J. *Microbiologia da segurança dos alimentos*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- Franciosi E, Settanni L, Cavazza A, Poznanski E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *Int. Dairy J.* 19:3-11.
- Freeman D, Falkiner FR, Keane CT. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42(8):872-874.
- Fröhlich-Wyder MT, Guggisberg D, Badertscher R, Wechsler D, Wittwer A, Irmeler S. 2013. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus parabuchneri* on the eye formation of semi-hard cheese. *Int. Dairy J.* 33:120-128.
- Funck GD, Hermanns G, Vicenzi R, Schmidt JT, Richards NSPS, Silva WP, Fiorentini AM. 2015. Microbiological and physicochemical characterization of the raw milk and the colonial type cheese from the Northwestern Frontier region of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 74(3):247-57.
- Gao J, Gong H, Mao X. 2020. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity and related molecular mechanism of bovine α -lactalbumin-derived peptides. *Mol.* 25:3009.
- Garay PA, Villalva FJ, Paz NF, Oliveira EG, Ibarguren C, Alcocer JC, Curti CA, Ramón AN. 2021. Formulation of a protein fortified drink based on goat milk whey for athletes. *Small Rumin. Res.* 201:106418.
- García-Cano I, Rocha-Mendoza D, Ortega-Anaya J, Wang K, Kosmerl E, Jiménez-Flores R. 2019. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103:5243-5257.

- Ghahremani E, Mardani M, Rezapour S. 2015. Phenotypic and Genotypic Characterization of Lactic Acid Bacteria from Traditional Cheese in Khorramabad City of Iran with Probiotic Potential. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175:2516-2527.
- Ghimire A, Luongo V, Frunzo L, Pirozzi F, Lens PNL, Esposito G. 2017. Continuous biohydrogen production by thermophilic dark fermentation of cheese whey: Use of buffalo manure as buffering agente. *Int. J. Hydrog. Energy.* 42:4861-4869.
- Giello M, La Storia A, Masucci F, Di Francia A, Ercolini D, Villani F. 2017. Dynamics of bacterial communities during manufacture and ripening of traditional Caciocavallo of Castelfranco cheese in relation to cows' feeding. *Food Microbiol.* 63:170-177.
- Godinho FMS, Krug M, Figueiredo RP, Müller A, Jank L, Tomaszewski CA, Hillesheim DR, Kinast EJ, Frazzon APG, Motta AS. 2020. Microbiological and physicochemical characteristics of buffalo milk used for Dairy products in southern Brazil. *J Dairy Res.* 87(4):463-468.
- González-González F, Delgado S, Ruiz L, Margolles A, Ruas-Madiedo P. 2022. Functional bacterial cultures for dairy applications: Towards improving safety, quality, nutritional and health benefit aspects. *J. Appl. Microbiol.* 133:212–229.
- Guedes AFLM, Machado ECL, Fonseca MC, Andrade SAC, Stanford TLM. 2013. The use of whey in the formulation of beverages with fruits and vegetables. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65(4):1231-1238.
- Gu Y, Wu J. 2016. The potential of antioxidative and anti-inflammatory peptides in reducing the risk of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Food Sci.* 8:25-32.
- Handa N, Kuda T, Yamamoto M, Takahashi H, Kimura B. 2022. *In vitro* antioxidant, anti-glycation, and bile acid-lowering capacity of chickpea milk fermented with *Lactiplantibacillus pentosus* Himuka-SU5 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Amami-SU1. *Process Biochem.* 120:15-21.
- Harmoko D, Ardyati T, Jatmiko YD. 2022. Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria from Sumbawa Buffalo Milk (*Bubalus bubalis*) as Potential Starter Cultures. *J. Experim. Life Sci.* 12(3):88-97.
- How YH, Teo MYM, In LLA, Yeo SK, Pui LP. 2022. Development of fermented milk using food-grade recombinant *Lactococcus lactis* NZ3900. *NFS J.* 28:1-14.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Censo Agropecuário**. 2017. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 17 fev. 2023.
- International Organization For Standardization (ISO). 2013. ISO 4833-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization For Standardization (ISO). 2014. ISO 8968-1:2014. Milk and milk products. 2° ed., 18 p.
- International Organization For Standardization (ISO). 2012. ISO/TS 11869: Fermented milks. 1° ed., 7 p.
- Iraporda C, Rubel IA, Manrique GD, Abraham AG. 2019. Influence in inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers on probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *LWT- Food Sci. Technol.* 101:738–746.
- Jakubowicz D, Froy O. 2013. Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and type 2 diabetes. *J. Nutr. Biochem.* 24:1–5.

- Jesus Filho M, Klein B, Teixeira LJQ, Silva JGS, Pallone JAL, Wagner R, Godoy HT. 2023. The influence of production units and seasons on the physicochemical characteristics, mineral and fatty acid content, and texture profile of the artisanal cheeses from Serra da Canastra, Brazil. *J. Food Compos. Anal.* 123:105589.
- Jia C, Hussain N, Ujiroghene OJ, Pang X, Zhang S, Lu J, Liu L, Lv J. 2020. Generation and characterization of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from trypsin-hydrolyzed α -lactalbumin-rich whey proteins. *Food Chem.* 318:126333.
- Jose NM, Bunt CR, Hussain MA. 2015. Implications of Antibiotic Resistance in Probiotics. *Food Rev. Int.* 31(1):52-62.
- Kaktcham PM, Zambou NF, Tchouanguép FM, El-Soda M, Choudhary MI. 2012. Antimicrobial and safety properties of *Lactobacilli* isolated from two Cameroonian traditional fermented foods. *Sci. Pharm.* 80(1):189–203.
- Kamiloğlu A. 2022. Functional and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry-fermented sausage (sucuk). *Braz. J. Microbiol.* 53:959-968.
- Kang L, Gao Y, Liu X, Liang Y, Chen Y, Liang Y, Zhang L, Chen W, Pang H, Peng L. 2019. Effects of whey protein nutritional supplement on muscle function among community-dwelling frail older people: A multicenter study in China. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 83:7-12.
- Kasapcopur E, Mohammed AM, Colakoglu AS. 2021. Effects of differences in whey composition on the physicochemical properties of whey butter. *Int. J. Dairy Technol.* 74(3):535-546.
- Kaur N, Sharma P, Jaimni S, Kehinde BA, Kaur S. 2019. Recent developments in purification techniques and industrial applications for whey valorization: A review. *Chem. Eng. Commun.* 207(1):123-138.
- Khakhariya R, Sakure AA, Maurya R, Bishnoi M, Kondepudi KK, Padhi S, Rai AK, Liu Z, Patil GB, Mankad M, Hati S. 2023. A comparative study of fermented buffalo and camel milk with anti-inflammatory, ACE-inhibitory and anti-diabetic properties and release of bio active peptides with molecular interactions: *In vitro*, *in silico* and molecular study. *Food Biosci.* 52:102373.
- Kieliszek M, Pobiega K, Piwowarek K, Kot AM. 2021. Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules.* 26:1858.
- Klingberg TD, Axelsson L, Naterstad K, Elsser D, Budde BB. 2005. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 105:419-431.
- Królczyk JB, Dawidziuk T, Janiszewska-Turak E, Sołowiej B. 2016. Use of whey and whey preparations in the food industry - A review. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 66(3):157-165.
- Kononiuk AD, Karwowska M. 2019. Comparison of the effect of freeze-dried acid whey on physicochemical properties of organic fermented sausages made from beef and fallow deer meat. *J Food Sci Technol.* 57:1753–1762.
- Landeta G, Curiel JA, Carrascosa AV, Muñoz R, De Las Rivas B. 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Sci.* 95:272-280.
- Lando V, Valduga NZ, Moroni LS. 2023. Functional characterization of *Lactobacilli* strains with antimicrobial activity against *Salmonella* spp. and cell viability in fermented dairy product. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 47:102605.

- Lee S, Choi S, Jeong H, Yu WK, Kim SW, Park Y. The Radical Scavenging Activities and Anti-Wrinkle Effects of Soymilk Fractions Fermented with *Lactocaseibacillus paracasei* MK1 and Their Derived Peptides. *Antioxidants*. 12:1392.
- Lee SY, Lee DY, Kang JH, Kim JH, Jeong JW, Kim HW, Oh DH, Yoon SH, Hur SJ. 2022. Relationship between gut microbiota and colorectal cancer: Probiotics as a potential strategy for prevention. *Food Res. Int.* 156:111327.
- Lermen AM, Brandelli A, Motta AS. Soro de leite de búfala como fonte de bactéria láctica de interesse biotecnológico. No prelo.
- Levin MA, Burrington KJ, Hartel RW. 2016. Whey protein phospholipid concentrate and delactosed permeate: Applications in caramel, ice cream, and cake. *J. Dairy Sci.* 99:6948–6960.
- Liang Z, Sun J, Yang S, Wen R, Liu L, Du P, Li C, Zhang G. 2022. Fermentation of mung bean milk by *Lactococcus lactis*: Focus on the physicochemical properties, antioxidant capacities and sensory evaluation. 48:101798.
- Lievore P, Simões DRS, Silva KM, Drunkler NL, Barana AC, Nogueira A, Demiate IM. 2015. Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *J. Food Sci. Technol.* 52(4):2083–2092.
- Lima CHGS, Carbonera N, Helbig E. 2022. Antimicrobial and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes.* 77(1):21-31.
- Lima NP, Melo NMV, Nascimento LCS, Moura Filho JM. 2020. Physical-chemical and sensorial analysis of yogurts produced with buffalo milk, goat and cow. *Braz. J. Develop.* 6(1):5184-5192.
- Lima TCC, Rangel AHN, Macêdo CS, Araújo TPM, Araújo VM, Lima Júnior DM, Murmann L, Novaes LP. 2014. Composition and quality of milk and whey buffalo in Rio Grande do Norte state. *Acta Vet. Bras.* 8(1):25-30.
- Lim YH, Foo HL, Loh TC, Mohamad R, Abdullah N. 2019. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 10:15.
- Linares-Morales JR, Cuellar-Nevárez GE, Rivera-Chavira BE, Gutiérrez-Méndez N, Pérez-Veja SB, Nevárez-Moorillón GV. 2020. Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fresh Fruits and Vegetables Based on Their Antimicrobial and Enzymatic Activities. *Foods.* 9:1399.
- Lira HL, Silva MCD, Vasconcelos MRS, Lira HL, Lopez AMQ. 2009. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. *Ci. Tecnol. Aliment.* 29(1): 33-37.
- Liu F, Chen Z, Shao J, Wang C, Zhan C. 2017. Effect of Fermentation on the Peptide Content, Phenolics and Antioxidant Activity of Defatted Wheat Germ. *Food Biosc.* 20:141-148.
- Liu P, Zheng Z, Xu Q, Qian Z, Liu J, Ouyang J. 2018. Valorization of dairy waste for enhanced D-lactic acid production at low cost. *Process Biochem.* 71:18–22.
- Liu T, Li Y, Yang Y, Yi H, Zhang L, He G. 2020. The influence of different lactic acid bacteria on sourdough flavor and a deep insight into sourdough fermentation through RNA sequencing. *Food Chem.* 307:125529.
- Liu W, Sun Z, Zhang J, Gao W, Wang W, Wu L, Sun T, Chen W, Liu X, Zhang H. 2009. Analysis of Microbial Composition in Acid Whey for Dairy Fan Making in

- Yunnan by Conventional Method and 16S rRNA Sequencing. *Curr Microbiol.* 59:199–205.
- Lorenzo JM, Munekata PES, Gómez B, Barba FJ, Mora L, Pérez-Santaescolástica C, Toldrá F. 2018. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends Food Sci. Technol.* 79:136–147.
- Maciel KS, Santos LS, Bonomo RCF, Verissimo LAA, Minim VPR, Minim LA. 2020. Purification of lactoferrin from sweet whey using ultrafiltration followed by expanded bed chromatography. *Sep. Purif. Technol.* 251:117324.
- Mangia NP, Murgia MA, Garau G, Fancello F, Deiana P. 2013. Suitability of selected autochthonous lactic acid bacteria cultures for Pecorino Sardo Dolce cheese manufacturing: influence on microbial composition, nutritional value and sensory attributes. *Int. J. Dairy Technol.* 66(4):543-551.
- Mani-López E, Palou E, López-Malo A. 2014. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 97:2578-2590.
- Mansor ES, Ali EA, Shaban AM. 2021. Tight ultrafiltration polyethersulfone membrane for cheese whey wastewater treatment. *Chem. Eng. J.* 407:127175.
- Marasco R, Gazzillo M, Campolattano N, Sacco M, Muscariello L. 2022. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Natural Whey Cultures of Buffalo and Cow Milk. *Foods.* 11:233.
- Margalho LP, Feliciano MD, Silva CE, Abreu JS, Piran MVF, Sant’Ana AS. 2020. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis. *J. Dairy Sci.* 103:7908-7926.
- Marques GA, São José JFB, Silva DA, Silva EMM. 2016. Whey protein as a substitute for wheat in the development of no added sugar cookies. *LWT - Food Sci. Technol.* 67:118-126.
- Martins CPC, Ferreira MVS, Esmerino EA, Moraes J, Pimentel TC, Rocha RS, Freitas MQ, Santos JS, Ranadheera CS, Rosa LS, Teodoro AJ, Mathias SP, Silva MC, Raices RSL, Couto SRM, Granato D, Cruz AG. 2018. Chemical, sensory, and functional properties of whey-based popsicles manufactured with watermelon juice concentrated at different temperatures. *Food Chem.* 255:58–66.
- Martins SCSG, Rocha Júnior VR, Caldeira LA, Barros IC, Oliveira JÁ, Santos JF, Silva GWV. 2012. Rendimento, composição e análise sensorial do queijo minas frescal fabricado com leite de vacas mestiças alimentadas com diferentes volumosos. *Rev. Zootec.* 41(4):993-1003.
- Masebe RD, Thantsha M. 2022. Anti-biofilm activity of cell free supernatants of select lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* isolated from avocado and cucumber fruits and from avocado processing plant. *Foods.* 11:2872.
- Mayo B, Rodríguez J, Vázquez L, Flórez B. 2021. Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety. *Foods.* 10:602.
- Mendes FS, Souza CFV. 2017. Qualidade microbiológica de soro de queijo e soro de ricota de laticínios do vale do Taquari, Rio Grande do Sul. *R. Bras. Tecnol. Agroindustr.* 11(2):2437-2450.

- Merabti R, Madec MN, Chuat V, Becila FZ, Boussekine R, Bekhouche F, Valence F. First Insight into the Technological Features of Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Fermented Wheat Lemzeiet. *Curr. Microbiol.* 76:1095-1104.
- Merkel A, Voropaeva D, Ondrusek M. 2021. The impact of integrated nanofiltration and electro-dialytic processes on the chemical composition of sweet and acid whey streams. *J. Food Eng.* 298:110500.
- Milani G, Tabanelli G, Barbieri F, Montanari C, Gardini, F, Daza MVB, Castellone V, Bozzetti M, Cocconcelli PS, Bassi D. Technological traits and mitigation activity of autochthonous lactic acid bacteria from mediterranean fermented meat-products. *LWT – Food Sci. Technol.* 196:115861.
- Miles AA, Mirsa SS, Irwin JO. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg. (Lond).* 38(6):732-49.
- Miranda R. **Laticínios de leite de búfala conquistam espaço no Brasil.** 2021. Disponível em: <<https://uaiagro.com.br/>>. Acesso em: 08 jun. 2023.
- Mohammed S, Çon AH. Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from traditional cheese. *LWT – Food Sci. Technol.* 152:112319.
- Mohsin AZ, Marzlan AA, Muhialdin BJ, Wai LK, Mohammed NK, Hussin ASM. 2022. Physicochemical characteristics, GABA content, antimicrobial and antioxidant capacities of yogurt from Murrah buffalo milk with different fat contents. *Food Biosc.* 49:101949.
- Motta AS, Gomes MSM. 2015. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes.* 70(3):172-184.
- Moura TM, Campos FS, Caierão J, Franco AC, Roehe PM, D'azevedo PA, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Influence of a subinhibitory concentration of vancomycin on the in vitro expression of virulence-related genes in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48:617-621.
- Müller T, Maciel MJ, Rempel C. 2022. Physicochemical and microbiological quality of bovine milk from Vale do Taquari in Rio Grande do Sul, Brazil. *Cien. Anim. Bras.* 23:e72986.
- Murari CS, Machado. WRC, Schuina GL, Bianchi VLD. 2019. Optimization of bioethanol production from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* URM 7404. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 20:101182.
- Mustafa MH, Soleimanian-Zad S, Sheikh-Zeinoddin M. 2020. Characterization of a trypsin-like protease 1 produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* PTCC 1896 from skimmed milk based médium. *LWT - Food Sci. Technol.* 119:108818.
- Nwachukwu ID, Aluko RE. 2019. Structural and functional properties of food protein - derived antioxidant peptides. *J. Food Biochem.* 43(1):1-13.
- Obioha PI, Ouoba LII, Anyogu A, Awamaria B, Atchia S, Ojmelukwe PC, Sutherland JP, Ghoddusi HB. 2021. Identification and characterisation of the lactic acid bacteria associated with the traditional fermentation of dairy fermented product. *Braz. J. Microbiol.* 52:869-881.
- Oliveira RL, Ladeira MM, Barbosa MAAF, Matsushita M, Santos GT, Bagaldo AR, Oliveira RL. 2009. Chemical composition and fatty acids profile in milk and mozzarella cheese of water buffalo fed different lipid sources. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(3):736-744.

- Olivo PM, Santos GT, Rodrigues BM, Osmari MP, Marchi FE, Madrona GS, Agostinho BC, Pozza MSS. 2021. Starter bacteria as producers of CLA in ripened cheese. *Annals Braz. Academ. Scienc.* 93(3):e20190677.
- Omolulu EF, Afolake AO. 2020. Accelerating the sustainable development goals through microbiology: some efforts and opportunities. *Access Microbiol.* 2:1-11.
- Ouoba LII, Lei V, Jensen LB. 2008. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 121(2):217-224.
- Păcularu-Burada B, Georgescu LA, Vasile MA, Rocha JM, Bahrim G. 2020. Selection of Wild Lactic Acid Bacteria Strains as Promoters of Postbiotics in Gluten-Free Sourdoughs. *Microorganisms.* 8:643.
- Panchal G, Hati S, Sakure A. 2020. Characterization and production of novel antioxidative peptides derived from fermented goat milk by *L. fermentum*. *LWT - Food Sci. Technol.* 119:108887.
- Pasquale ID, Cagno RD, Buchin S, Angelis MD, GobbettiM. 2019. Use of autochthonous mesophilic lactic acid bacteria as starter cultures for making Pecorino Crotonese cheese: effect on compositional, microbiological and biochemical attributes. *Food Res. Int.* 116:1344-1356.
- Patel AK, Vaisnav N, Mathur A, Gupta R, Tuli DK. 2016. Whey waste as potential feedstock for biohydrogen production. *Renew. Energ.* 98:221-225.
- Paul C, Mishu ID, Miah MI, Bari ML, Rahman SR, Malek MA. 2023. Isolation, identification and probiotic potential of lactic acid bacteria and yeasts from commercial yogurt and homemade non-dairy fermented food “KANJI”. *Int. J. Gastron. Food Sci.* 34:100787.
- Pavunc AL, Beganovic J, Kos B, Uroic K, Blazic M, Suskovic J. 2012. Characterization and Application of Autochthonous Starter Cultures for Fresh Cheese Production. *Food Technol. Biotechnol.* 50(2):141–151.
- Pedersen TB, Ristagno D, McSweeney PLH, Vogensen FK, Ardö Y. 2013. Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. *Int. Dairy J.* 33:112-119.
- Pellegrini LG, Gusso AP, Cassanego DB, Mattanna P, Richards NSPS. 2013. Physical and chemical characterization and lipid profile of sheep milk cheese. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.* 68(394):11-18.
- Peng Y, Horne DS, Lucey J. A. 2009. Impact of preacidification of milk and fermentation time on the properties of yogurt. *J. Dairy Sci.* 92:2977–2990.
- Penna ALB, Gigante ML, Todorov SD. 2021. Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. *Foods.* 10(7):1562.
- Penna ALB, Paula AT, Casarotti SN, Diamantino VR, Silva LF. 2015. Overview of the functional lactic acid bacteria in the fermented milk products. *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods.* 1:100-154.
- Pereira BP, Schneider RN, Pinto AT, Schmidt V. 2016. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano. *Higiene Aliment.* 30(260/261):130-134.
- Pereira EA, Roncatti R, Todescatto C, Beux S, Marchi JF, Daltoé MLM. 2017. Acceptance of Santo Giorno cheese typical of the Southwestern region of Paraná, Brazil. *Ciênc. Rural.* 47(4):e20160418.

- Piecha R, Zanini MCC. 2023. "We learned from the older": Peasant knowledge and female work in colonial cheese production in Jaguari-RS. *Rev. Antropolítica*. 55(1):e56136.
- Porcellato D, Johnson ME, Houck K, Skeie SB, Mills DA, Kalanetra KM. 2015. Potential of *Lactobacillus curvatus* LFC1 to produce slits in Cheddar cheese. *Food Microbiol*. 49:65-73.
- Rama GR, Kuhn D, Beux S, Maciel MJ, Souza CFV. 2019. Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *Int. Dairy J*. 98:25-37.
- Rao R, Basak N. 2021. Fermentative molecular biohydrogen production from cheese whey: present prospects and future strategy. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 193:2297–2330.
- Rastogi YR, Thakur R, Thakur P, Mittal A, Chakrabarti S, Siwal SS, Thakur VK, Saini RV, Saini AK. 2022. Food fermentation – Significance to public health and sustainability challenges of modern diet and food systems. *Int. J. Food Microbiol*. 371:109666.
- Rathod MG, Pathak AP. 2016. Optimized production, characterization and application of alkaline proteases from taxonomically assessed microbial isolates from Lonar soda lake, India. *Biocatal. Agric. Biotechnol*. 7:164–173.
- Rathour AKR, Rathore V, Mehta BM, Patel SM, Chauhan A, Aparnathi KD. 2016. Standardization and Storage Study of Whey Protein Concentrate (WPC-70) Prepared from Buffalo Milk using Ultrafiltration M. embrane Technology. *J. Food Process. Preserv*. 41:12882.
- Reale A, Renzo TD, Rossi F, Zotta T, Iacumin L, Preziuso M, Parente E, Sorrentino E, Coppola R. 2015. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT – Food Sci. Technol*. 60:721-728.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med*. 26:1231–1237.
- Reuben RC, Roy PC, Sarkar SL, Alam ASMR, Jahid IK. 2020. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *J. Dairy Sci*. 103:1223-1237.
- Rezac S, Kok CR, Heermann M, Hutkins R. 2018. Fermented food as a dietary source of live organisms. *Front. Microbiol*. 9:1785.
- Ribeiro SC, Coelho MC, Todorov SD, Franco BDGM, Dapkevicius MLE, Silva CCG. 2013. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *J. Appl. Microbiol*. 116:573-585.
- Ricci GD, Domingues PF. O leite de búfala. 2012. *Rev. Educ. Cont. Medic. Vet. Zootec. CRMV-SP*. 10(1):14–19.
- Rio Grande do Sul. Lei nº 14.973, de 29 de dezembro de 2016. Dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano no Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS: Assembleia Legislativa do Estado do Rio Grande do Sul.
- Rio Grande do Sul. Lei nº 15.615, de 13 de maio de 2021. Dispõe sobre a produção e a comercialização de queijos artesanais de leite cru e dá outras providências. Porto Alegre, RS: Assembleia Legislativa do Estado do Rio Grande do Sul.

- Rio Grande do Sul. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação (SEAPI). Instrução Normativa nº 2, de 31 de março de 2023. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do queijo colonial artesanal. Porto Alegre, RS: SEAPI.
- Riquelme C, Câmara S, Dapkevicius MLNE, Vinuesa P, Silva CCG, Malcata FX, Rego OA. 2015. Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *Int. J. Food Microbiol.* 192:86–94.
- Rocha-Mendoza D, Kosmerl E, Krentz A, Zhang L, Badiger S, Miyagusuku-Cruzado G, Mayta-Apaza A, Giusti M, Jiménez-Flores R. 2021. Invited review: Acid whey trends and health benefits. *J. Dairy Sci.* 104:1262–1275.
- Rodrigues NPA, Garcia EF, Souza EL. 2021. Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. *Braz. J. Microb.* 52:2257-2269.
- Rodríguez-Figueroa JC, Reyes-Díaz R, González-Córdova AF, Troncoso-Rojas R, Vargas-Arispuro I, Vallejo-Cordoba B. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *J. Dairy Sci.* 93:5032–5038.
- Roldan BB, Grecellé CZ, Guedes FF, Ambrosini LB. 2022. Physicochemical and microbiological evaluation of Gaúcho Colonial cheese. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.* 77:(4)187-195.
- Roobab U, Batool Z, Manzoor MF, Shabbir MA, Khan MR, Aadil RM. 2020. Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. *Curr. Opin. Food Sci.* 32:17-28.
- Rosa LS, Santos ML, Abreu JP, Rocha RS, Esmerino EA, Freitas MQ, Mársico ET, Campelo PH, Pimentel TC, Silva MC, Souza AA, Nogueira FCS, Cruz AG, Teodoro AJ. 2023. Probiotic fermented whey-milk beverages: Effect of different probiotic strains on the physicochemical characteristics, biological activity, and bioactive peptides. *Food Res. Int.* 164:112396.
- Rotta IS, Matta MF, Santos CTB, Paiva AD, Machado ABF. 2020. Potentially probiotic lactic acid bacteria isolated from unpasteurized milk. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes.* 75(3):178-189.
- Ruschel J, Macedo GHC, Martins R, Castro-Cislaghi FP, Badaró ACL. 2019. Microbiological quality of artisanal colonial cheese from south-west Paraná. *Rev. Higien. Aliment.* 33:2051-2055.
- Ryan MP, Walsh G. 2016. The biotechnological potential of whey. *Rev. Environ. Science Bio/Technol.* 15:479-498.
- Rzepakowska A, Zielinska D, Ołdak A, Kołozyn-Krajewska D. 2017. Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties. *Int. J. Food Sci. Technol.* 52:1983–1994.
- Sabo SS, Vitolo M, González JDM, Oliveira RPS. 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research Int.* 64:527-36.
- Sáez GD, Saavedra L, Hebert EM, Zárate G. 2018. Identification and biotechnological characterization of lactic acid bacteria isolated from chickpea sourdough in northwestern Argentina. *LWT – Food Sci. Technol.* 93:249-256.
- Sah BNP, Vasiljevic T, McKechnie S, Donkor ON. 2016. Antioxidative and Antibacterial Peptides Derived from Bovine Milk Proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 58(5):726-740.

- Sahoo A, Mahanty B, Daverey A, Dutta K. 2020. Nattokinase production from *Bacillus subtilis* using cheese whey: Effect of nitrogen supplementation and dynamic modelling. *J. Water Process Eng.* 38:101533.
- Saidi Y, Del Rio B, Senouci DE, Redruello B, Martinez B, Ladero V, Kihal M, Alvarez MA. 2019. Polyphasic Characterisation of Non-Starter Lactic Acid Bacteria from Algerian Raw Camel's Milk and Their Technological Aptitudes. *Food Technol. Biotechnol.* 58(3):260-272.
- Salama WM. 2015. Influence whey proteins on the characteristics of buffalo mozzarella cheese. *Int. J. Dairy Sci.* 10(1):12-23.
- Salvucci E, LeBlanc JG, Pérez G. 2016. Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT – Food Sci. Technol.* 70:185-191.
- Samaranayaka AGP, Li-Chan ECY. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J. Funct. Foods.* 3:229–254.
- Sánchez A, Vázquez A. 2017. Bioactive peptides: A review. *Food Quality Safety.* 1:29–46.
- Santiago-López L, Hernández-Mendoza A, Vallejo-Cordoba B, Mata-Haro V, Wall-Medrano A, González-Córdova AF. 2019. Milk Fermented with *Lactobacillus fermentum* Ameliorates Indomethacin-Induced Intestinal Inflammation: An Exploratory Study. *Nutrients.* 11:1610.
- Santos CLA. 2015. **Caracterização de segurança e tecnológica de bactérias acidoláticas termofílicas autóctones e aplicação em queijo Parmesão.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- Santos ED, Nuncio ASP, Zanella R, Dickel EL, Ritterbusch GA, Pilotto F, Rodrigues LB, Freitas CP, Santos LR. 2023. Bacterial communities in artisanal raw bovine milk cheeses from the southern region of Brazil. *Ciênc. Rural.* 53(9):e20220306.
- Sarhir ST, Belkhou R, Bouseta A, Hayaloglu AA. 2023. Evaluation of techno-functional and biochemical characteristics of selected lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) used for the production of Moroccan fermented milk: Lben. *Int. Dairy J.* 140:105592.
- Schmitt CI, Cereser NB, Bohrz DAS, Noskoski L. 2011. Contaminação do Queijo Colonial de Produção Artesanal Comercializado em Mercados Varejistas do Rio Grande do Sul. *Vet. Notícias.* 17(2):111-116.
- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). 2023. **Conheça os melhores queijos e doces de leite artesanais do RS.** Disponível em: <<https://digital.sebraers.com.br/blog/mercado/os-melhores-queijos-e-doces-de-leite-artesanais-do-rs-mkt/>>. Acesso em 14 de janeiro de 2024.
- Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR). 2022. **Queijos artesanais do Brasil.** 1 ed.
- Shi Y, Cui X, Gu S, Yan X, Li R, Xia S, Chen H, Ge J. 2019. Antioxidative and Probiotic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 11:1086–1099.

- Silva EOO, Nespolo CR, Sehn CP, Pinheiro FC, Stefani LM. 2020. Lactic acid bacteria with antimicrobial, proteolytic and lipolytic activities isolated from ovine dairy products. *Food Sci. Technol.* 40:293-299.
- Silva LF. 2015. **Diversidade e evolução da microbiota láctica autóctone em queijo Muçarela de búfala e aplicação tecnológica dos isolados.** Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- Smithers GW. 2008. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *Int. Dairy J.* 18:695–704.
- Soares JP, Marques GA, Magalhães CS, Santos AB, José JFBS, Silva DA, Silva EM. 2018. The effect of the addition of whey protein as a substitute for wheat in the development of cakes with no added sugar. *Brazilian J. Food Technol.* 21:e2016190.
- Solanki D, Hati S, Sakure A. 2017. *In Silico* and *In vitro* Analysis of Novel Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) inhibitory Bioactive Peptides Derived from Fermented Camel Milk (*Camelus dromedarius*). *Int. J. Pept. Res. Ther.* 23:441–459.
- Sousa MA, Muller MP, Berghahn E, Souza CFV, Granada CE. 2020. New enterococci isolated from cheese whey derived from different animal sources: High biotechnological potential as starter cultures. *LWT - Food Sci. Technol.* 131:109808.
- Souza JVS, Dias DS. 2017. Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. *Curr. Opin. Food Sci.* 13:1-9.
- Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:428-432.
- Stefanovic E, Fitzgerald G, McAuliffe O. 2017. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiol.* 61:33-49.
- Sun Y, Guo S, Wu T, Yang Y, Shen T, Ma X, Kwok L, Wang J, Sun Z, Zhang H. 2023. *Bifidobacterium adolescentis* B8589- and *Lacticaseibacillus paracasei* PC-01-co-fermented milk has more γ -aminobutyric acid and short-chain fatty acids than *Lacticaseibacillus paracasei* PC-01-fermented milk. *LWT - Food Sci. Technol.* 179:114645.
- Syngai GG, Gopi R, Bharali R, Dey S, Lakshmanan GMA, Ahmed G. 2016. Probiotics - the versatile functional food ingredients. *J. Food Sci. Technol.* 53(2):921–933.
- Tallapragada P, Rayavarapu B, Rao PP, Ranganath NN, Veerabhadrapa PP. 2018. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 16:357-362.
- Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. 2016. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front. Microbiol.* 7:377.
- Tanasupawat S, Phoottosavako M, Keeratipibul S. 2015. Characterization and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat. *J. Appl. Pharm. Sci.* 5(3):006-012.

- Tavares AB, Cavalcanti EANLD, Timm CD, Lima HG, Cereser ND. 2019. Artisanal cheese produced in the south of Rio Grande do Sul: physical-chemical, microbiological assessment and susceptibility of antimicrobials from *Staphylococcus coagulase positive* isolates. *Ciênc. Anim. Bras.* 20:1-10.
- Teixeira LV, Fonseca LM, Menezes LDM. 2007. Physical-chemical profile of the whey of minas-padrão and mozzarella cheeses produced in some regions of Minas Gerais state. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60(1):243-250.
- Terzic-Vidojevic A, Tonkovic K, Pavunc AL, Beganovic J, Strahinic I, Kojic M, Veljovic K, Golic N, Kos B, Cadez N, Gregurek L, Suskovic J, Raspor P, Topisirovic L. 2015. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. *LWT - Food Sci. Technol.* 63:298-306.
- Terzioglu ME, Bakirci I, Oz E, Brennan CS, Huppertz T, Amarowicz R, Khan MR, Elobeid T, Aadil RM, Oz F. 2023. Comparison of camel, buffalo, cow, goat, and sheep yoghurts in terms of various physicochemical, biochemical, textural and rheological properties. *Int. Dairy J.* 146:105749.
- Thapa N, Pal J, Pal J, Tamang JP. 2004. Microbial diversity in Ngari, Hentak and Tungtap, fermented fish products of North-East India. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20:599–607.
- Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD, Hancock LE. 2010. Gelatinase Contributes to the Pathogenesis of Endocarditis Caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 78(11):4936-43.
- Todescato C. 2014. **Obtenção de fermento láctico endógeno para produção de queijo típico da mesorregião sudoeste do Paraná.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco.
- Tsuda H, Kodama K. 2021. Evaluating the technological properties of lactic acid bacteria in Wagyu cattle milk. *J. Dairy Res.* 17:16-47.
- Tulini FL, Hymery N, Haertlé T, Le Blay G, Martinis ECP. 2016. 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. *J. Dairy Res.* 83:115–124.
- Turkmen N, Akal C, Özer B. 2019. Probiotic dairy-based beverages: A review. *J. Funct. Foods.* 53:62–75.
- Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility Test Methods: General Considerations. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (Ed). *Manual of clinical microbiology.* 10 ed. Washington: ASM Press, 2011, cap. 67, p. 1115-1121.
- Veskoukis AS, Kerasioti E, Skaperda Z, Papapostolou PA, Nekpa C, Spandidos DA, Asproдини E, Taitzoglou I, Kouretas D. 2020. Whey protein boosts the antioxidant profile of rats by enhancing the activities of crucial antioxidant enzymes in a tissue-specific manner. *Food Chem. Toxicol.* 142:111508.
- Vincenzi A, Maciel MJ, Burlani EL, Oliveira EC, Volpato G, Lehn DN, Souza CFV. 2014. Ethanol bio-production from ricota cheese whey by several strains of the yeast *Kluyveromyces*. *American J. Food Technol.* 9(6):281-291.
- Wang Y, Guo J, Huang A. 2017. Study on bacterial diversity in traditional sour whey of Yunnan province. *J. Food Process. Preserv.* 42:e13553.
- Wirawati CU, Widodo YR. 2021. Assessment of Antimicrobial and Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dadih: Naturally Fermented

- Buffalo Milk From West Sumatra, Indonesia. *J. Ilmiah Peternakan Terpadu*. 9(3):346-361.
- World Health Organization (WHO). 2005. Containing Antimicrobial Resistance—WHO Policy Perspectives on Medicines; World Health Organization: Geneva, pp 1–6.
- Wójciak KM, Dolatowski ZJ, Kołozyn-Krajewska D. 2015. Use of acid whey and probiotic strains to improve microbiological quality and sensory acceptance of organic fermented sausage. *J. Food Process. Preserv.* 39:539-547.
- Xia Y, Yu J, Xu W, Shuang Q. 2020. Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from whey proteins of milk fermented with *Lactobacillus plantarum* QS670. *J. Dairy Sci.* 103:4919-4928.
- Yalçınkaya S, Kilic GB. 2019. Isolation, identification and determination of technological properties of the halophilic lactic acid bacteria isolated from table olives. *J. Food Sci. Technol.* 56(4):2027–2037.
- Zaffari CB, Mello JF, Costa M. 2007. Bacteriological quality of homemade cheeses commercialized in roads of the northern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciênc. Rural.* 37(3):862-867.
- Zandona E, Blažić M, Jambrak AR. 2021. Whey Utilisation: Sustainable Uses and Environmental Approach. *Food Technol. Biotechnol.* 59(2):147-161.
- Zhang J, Xiong T, Wang X, Xu H. 2023. Fermented soy milk with cholesterol-lowering potential: Probiotics screening, physicochemical properties, antioxidant activity and volatile composition. *Food Biosc.* 56:103421.
- Zhao C, Chen N, Ashaolu TJ, 2022. Whey proteins and peptides in health-promoting functions - A review. *Int. Dairy J.* 126:105269.
- Zhu K, Zhou H, Qian H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochem.* 41:1296-1302.
- Zhu Z, Bassey AP, Cao Y, Ma Y, Huang M, Yang H. 2022. Food protein aggregation and its application. *Food Res. Int.* 160:111725.
- Zotta T, Ricciardi A, Condelli N, Parente E. 2021. Metataxonomic and metagenomic approaches for the study of undefined strain starters for cheese Manufacture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62(14):3898-3912.
- Zuo F, Appaswamy A, Gebremariam HG, Jonsson AB. 2019. Role of Sortase A in *Lactobacillus gasser* KX110A1 adhesion to gastric epithelial cells and competitive exclusion of *Helicobacter pylori*. *Front. Microbiol.* 10:2770.