

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E TECNOLOGIA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



LEONARDO FERREIRA SARAIVA

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS
ÁCIDAS LÁTICAS (BAL) ISOLADAS DE LEITE DE BÚFALA (*BUBALUS
BUBALIS*)**

BELÉM-PA

2024

LEONARDO FERREIRA SARAIVA

Caracterização do potencial tecnológico de bactérias ácidas lácticas (BAL) isoladas de leite de búfala (*bubalus bubalis*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de Tecnólogo de Alimentos, Universidade do Estado do Pará.

Orientador(a): Profa. Dra. Elaine Lopes Figueiredo.

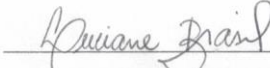
Data de Aprovação: ___/___/2024

Banca examinadora:

 Orientador(a)

Profa. Dra. Elaine Lopes Figueiredo

Universidade do Estado do Pará – UEPA

 Membro da banca examinadora

Profa. Dra. Luciane do Socorro Nunes Brasil

Universidade do Estado do Pará – UEPA

 Membro da banca examinadora

Profa. Dra. Maricely Janette Úria Toro

Universidade do Estado do Pará – UEPA

BELÉM-PA

2024

À minha família, em especial minha avó (Maria Heliana Costa Ferreira), aos meus amigos e professores que fizeram essa jornada ser menos pesada e mais gratificante, cativando-me e me enchendo os olhos com o curso de Tecnologia em Alimentos, o qual finalizo feliz.

Dedico

Leonardo Ferreira Saraiva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família que, em todos os momentos de dúvidas, tristeza, aflição e desistência, sempre estiveram ao meu lado me dando a força necessária para seguir em frente e continuar a jornada da vida; imperiosamente minha vó, a maior fonte de inspiração e luz que possuo em minha vida. Vou continuar seguindo em frente, da forma como me ensinaram, espero dar orgulho a vocês.

Agradeço aos meus amigos, aqueles que dividiram sorrisos e lágrimas comigo, aqueles que me ajudaram em trabalhos, contas, dúvidas, tristezas e afins; sem nunca me exigir nada em troca. Àqueles que buscaram me compreender e aceitar meu jeito de ser (sei que não sou dos mais fáceis) dedico a vocês este trabalho, que marca o começo de tudo, o primeiro e mais importante trabalho da minha vida.

Em agradecimento especial à algumas pessoas: Maria Clara Cardoso Pontes; Vitória Alcantara; Naomi Silva Rodrigues Araújo; Lorena Gabriela Santiago Rodrigues; Gessyca Quadros Moura, Marcos Gabriel Santiago da Silva e Thamiris Ramos da Silva. Vocês, meus amigos, que dividiram comigo a mesa do bar, a cerveja gelada e o pão que o diabo amassou, estão tão marcados na minha existência e na minha essência ao ponto que seria impossível alguém me conhecer totalmente sem ouvir seus nomes. Agradeço pelos momentos que dividimos e espero que venham muitos mais.

Agradeço imperiosamente à minha orientadora, Professora Doutora Elaine Lopes Figueiredo, que não saiu do meu lado durante toda a concepção deste trabalho, sempre elevando o astral e organização impecável. Ademais, agradeço às equipes dos laboratórios que me ensinaram e me ajudaram sempre que necessitei.

RESUMO

SARAIVA, Leonardo Ferreira. **CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) ISOLADAS DE LEITE DE BÚFALA (*bubalus bubalis*)**. 2024. 38 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) – Universidade do Estado do Pará, Belém, 2024.

O leite de búfala e seus derivados tem sido alvo de diversos estudos. As bactérias ácido lácticas (BAL) fazem parte da microbiota láctica e contribuem para o desenvolvimento de propriedades funcionais e sensoriais em muitos alimentos. Este trabalho objetivou realizar a caracterização do potencial tecnológico de BAL isoladas de leite de búfala produzido na Ilha do Marajó. No isolamento foram obtidos quarenta (40) isolados de BAL, e realizados testes de Coloração de Gram, Catalase, Atividade Proteolítica, Teste de Produção de Gás, Produção de Diacetil, Teste de Lactofermentação e Capacidade Acidificante. Os resultados fenotípicos e morfológicas mostraram que as BAL são gram-positivos, com 31 isolados apresentando a forma de cocos e 9 a forma de bacilos. No que se refere aos resultados da caracterização bioquímica, 34 isolados apresentaram-se como catalase negativos; 29 isolados caracterizando-se como homofermentativos e 11 como heterofermentativos; 17 isolados apresentaram atividade proteolítica; 9 isolados se mostraram produtores de diacetil; e 7 isolados apresentaram a formação do coágulo gelatinoso e uniforme, proveniente da fermentação láctica. Para a atividade acidificante, todos os isolados foram considerados como uma cultura láctica com rápida produção de ácido. Ao comparar todos os isolados estudados, pode-se dizer que os que apresentaram os melhores resultados foram: I₃₂, I₃₃, I₃₅ E I₄₀. Pesquisas sobre a identificação e caracterização de BAL do leite de búfala são de grande importância, pois auxilia na produção de fermentos lácticos a partir de leite de búfala, e contribui para a melhoria da qualidade de derivados.

Palavras-chave: microbiota láctica, Ilha do Marajó, búfala.

ABSTRACT

SARAIVA, Leonardo Ferreira. CHARACTERIZATION OF THE TECHNOLOGICAL POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB) ISOLATED FROM BUFFALO MILK (*bubalus bubalis*). 2024. 38 pages. Course Completion Work (Food Technology) – State University of Pará, Belém, 2024.

Buffalo milk and its derivatives have been the subject of several studies. Lactic acid bacteria (BAL) are part of the lactic acid microbiota and contribute to the development of functional and sensory properties in many foods. This work aimed to characterize the technological potential of BAL isolated from buffalo milk produced on Marajó Island. During isolation, forty (40) BAL isolates were obtained, and Gram Staining, Catalase, Proteolytic Activity, Gas Production Test, Diacetyl Production, Lactofermentation Test and Acidifying Capacity tests were carried out. The phenotypic and morphological results showed that the BAL are gram-positive, with 31 isolates presenting the form of cocci and 9 the form of bacilli. Regarding the results of biochemical characterization, 34 isolates were catalase negative; 29 isolates characterized as homofermentative and 11 as heterofermentative; 17 isolates showed proteolytic activity; 9 isolates were found to produce diacetyl; and 7 isolates showed the formation of a uniform, gelatinous clot, resulting from lactic fermentation. For acidifying activity, all isolates were considered as a lactic culture with rapid acid production. When comparing all the isolates studied, it can be said that those that presented the best results were: I₃₂, I₃₃, I₃₅ and I₄₀. Research on the identification and characterization of BAL from buffalo milk is of great importance, as it helps in the production of lactic ferments from buffalo milk, and contributes to improving the quality of derivatives.

Keywords: lactic acid microbiota, Marajo Island, buffalo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo Geral	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1	Leite De Búfala	12
3.2	Microbiota do Leite de Búfala	13
3.3	Bactérias Ácido Láticas - BAL	14
3.3.1	<i>Lactococcus</i>	15
3.3.2	<i>Enterococcus</i>	16
3.3.3	<i>Streptococcus</i>	17
3.3.4	<i>Leuconostoc</i>	18
3.3.5	<i>Lactobacillus</i>	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Coleta das Amostras de Leite de Búfalas	21
4.2	Isolamento de Bactérias Ácido Láticas (BAL) de Leite de Búfala	21
4.3	Avaliação Morfológica, Bioquímica e Estudo do Potencial Tecnológico dos Isolados de Bactérias Ácido Láticas de Leite de Búfala	22
4.3.1	Coloração de Gram.....	22
4.3.2	Teste de Catalase.....	23
4.3.3	Teste de Produção de Gás.....	23
4.3.4	Atividade Proteolítica.....	23
4.3.5	Produção de Diacetil.....	23
4.3.6	Teste de Lactofermentação.....	24
4.3.7	Capacidade de Acidificação.....	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5.1	Resultado da Avaliação Morfológica, Bioquímica e Estudo do Potencial Tecnológico dos Isolados de Bactérias Ácido Láticas de Leite de Búfala	25
5.1.1	Coloração de Gram.....	25
5.1.2	Teste de Catalase.....	26
5.1.3	Teste de Produção de Gás.....	26

5.1.4 Atividade Proteolítica	27
5.1.5 Produção de Diacetil.....	27
5.1.6 Teste de Lactofermentação	28
5.1.7 Capacidade Acidificante	30
6 CONCLUSÃO	33
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

O leite de búfala possui grande relevância e influência no Brasil, pois é evidenciado como a principal fonte de renda para pequenas e médias propriedades rurais, levando alimentação e produtividade sustentável para o trabalhador da zona rural. Junto a isso, a produção de leite é enfatizada como uma das principais maestrias das búfalas, sendo considerado muito importante não apenas em território nacional, mas também no exterior (Figueiredo, 2014).

Nesse mesmo prisma, há grande interesse na diversificação do uso do leite bubalino, visando a sua utilização tecnológica na produção de derivados. Para isso, leva-se em consideração a composição intrínseca superior em qualidade quando se compara ao tradicional leite bovino, sendo imperioso destacar seu teor de 25,55 % em proteínas e elevado teor de aminoácidos. Contudo, mesmo com a diferença no valor nutricional que superam outros tipos de leite de vaca, ainda há carência de regulamentos e normas para o padrão de qualidade e identidade desse leite (Cabral et al., 2016).

Ademais da composição físico-química, na qual apresenta nutrientes imperiosos para a dieta humana, a flora microbiana natural desse alimento o torna excelente para o crescimento e desenvolvimento microbiológico de diversas espécies, o que contribuem para a variedade de produtos lácteos (Figueiredo et al., 2010; Figueiredo, 2014).

As bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo de micro-organismos gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que geralmente se multiplicam sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbias. Correspondem de 20 a 30 % do total de bactérias presentes no leite *in natura* (Cabral et al., 2016). São conhecidos os seguintes gêneros de BAL: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Entretanto, os gêneros mais importantes são: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Weissella* (Giazzi, 2017).

São bactérias que contribuem para o desenvolvimento das propriedades sensoriais de uma grande variedade de produtos fermentados e curados, por produzirem um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas. Exercem um papel de grande importância na indústria de alimentos, conferindo características tecnológicas, e promovendo conservação

devido sua ação antagonista frente aos micro-organismos deterioradores e patogênicos, sendo consideradas conservadores naturais dos alimentos (Lima et al. 2014).

As BAL são as principais responsáveis pela inibição e destruição de microrganismos patogênicos e deteriorantes, reduzindo assim os riscos de desenvolvimento de doenças transmitidas por alimentos. Vários metabólitos das BAL, como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, atuam como agentes de preservação biológica, melhoram a segurança dos alimentos e prolongam o período de armazenagem do produto final (Figueiredo et al., 2018; Özogul & Hamed, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização do potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de leite de búfala produzido na Ilha do Marajó

2.2 Objetivos Específicos

- Isolamento e purificação de bactérias ácido lácticas (BAL) de leite de búfala, obtidos em duas propriedades localizadas em Soure e Salvaterra, na Ilha do Marajó;
- Caracterização morfológica dos isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) de leite de búfala; (Coloração de Gram)
- E caracterização bioquímica dos isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) de leite de búfala, a fim de avaliar o potencial tecnológico dos isolados de BAL. (Catalase; Formação de gás; Diacetil; Atividade proteolítica; Capacidade de acidificação; e Lactofermentação)

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leite de Búfala

Segundo a Instrução Normativa (IN) 62, de 29 de dezembro 2011, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), compreende-se por leite, sem outra especificação “o produto oriundo de ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas em estado adequado de saúde, alimentadas adequadamente e descansadas” (Brasil, 2011). O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie que proceda. Também, define-se como uma “emulsão de coloração branca, opaco, duas vezes mais viscoso que a água, de sabor levemente adocicado e odor pouco acentuado; sendo uma secreção nutritiva produzida pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos” (Vidal, 2018).

A criação de bubalinos e a produção de leite desta espécie têm aumentado nas últimas décadas. De acordo com IBGE, em 2022, o rebanho nacional de bubalinos era de 1.598,268 milhões de animais. A região Norte, com 922.638 animais, é a que possui o maior quantitativo. O Pará é o Estado em que se encontra o maior efetivo de bubalinos, com 644,672 mil animais. A Ilha do Marajó representa 69,9 % do efetivo bubalino do Estado (IBGE, 2022).

O leite de búfala demonstra características únicas, assim, se diferenciando do leite de vaca. Sendo considerado de tipo A2, por isso, é mais rico em vitaminas e proteínas que o leite bovino; a beta-caseína representa cerca de 25% a 30% do total de proteínas do leite. Contendo apenas a beta-caseína A2, tal composição faz com que seja mais digerível comparado ao leite convencional (Silva & Ribeiro, 2021).

A utilização do leite de búfala na elaboração de derivados tem sido pesquisada em diferentes regiões do mundo, destacando-se alguns tipos de queijos, iogurte e outros leites fermentados (Lima et al., 2014). A importância do leite bubalino está na sua transformação em derivados, uma vez que sua rica composição nutricional, e principalmente seus níveis de lipídeos, possibilita alto rendimento industrial. Pode ser utilizado tanto para consumo *in natura* ou como matéria prima para elaboração de diversos derivados (Figueiredo, 2014; Silva & Ribeiro, 2021).

A gordura é o componente do leite que maior representa valor econômico, sendo usada na produção de derivados. Atribui ao produto: sabor característico e melhora a textura. Nutricionalmente, os lipídeos apresentam níveis consideráveis de ácidos graxos essenciais ao

organismo. Tratando-se do leite bubalino, o teor se mantém sempre acima de 5,50%, sendo característico da espécie (Andrade, 2015).

3.2 Microbiota do Leite de Búfala

Na composição química do leite estão presentes muitos nutrientes essenciais para os organismos vivos. Além de sua riqueza nutricional e pH favorável, fatores extrínsecos como a falta de higienização nas etapas de produção de leite e elaboração de derivados, aumenta a população microbiana desta matéria-prima (Carvalho, 2007).

O leite, mesmo o que procede de animais saudáveis, sempre contém uma grande quantidade e variedade de micro-organismos, cuja taxa é muito variável (10^3 - 10^6 UFC/mL), dependendo da condição de saúde do animal, das medidas higiênicas adotadas durante a ordenha e das condições de armazenamento, produção e comercialização da matéria prima, como já foi mencionado anteriormente (Simões et al., 2014).

Um fator de relevância é o hábito que os búfalos têm de ficar mergulhados em águas e se revolver na lama para a dissipação do calor e proteção contra pragas e parasitas. Este comportamento, que é observado com mais frequência em períodos de maior quantidade de chuvas e quentes, pode além de dificultar a higienização do úbere da búfala, pode aumentar o número de micro-organismos na matéria-prima (Neres et al., 2014).

Cunha Neto & Oliveira (2003) ao avaliarem a presença de bactérias mesofílicas no leite de búfala *in natura*, encontrando valores entre $5,0 \times 10^3$ a $1,3 \times 10^4$ UFC/mL no inverno, e $1,5 \times 10^5$ a $3,2 \times 10^7$ UFC/mL no verão. Figueiredo (2014) verificou que na Ilha do Marajó, na época chuvosa houve maior quantidade ($5,6 \times 10^5$ UFC/mL) de bactérias aeróbias mesófilas em amostras de leite de búfala, do que na época seca ($1,4 \times 10^4$ UFC/mL). O mesmo foi observado por Simões et al. (2014), com níveis de $2,3 \times 10^5$ UFC/mL no período chuvoso, e níveis de $1,4 \times 10^5$ UFC/mL no período seco.

De acordo com Carvalho (2007) a biodiversidade microbiana do leite sem tratamento térmico apresenta grande importância, uma vez que contribui para determinar as características sensoriais dos produtos lácteos. Inúmeras pesquisas detectaram uma vasta microbiota presente no leite de búfala produzido na Ilha do Marajó, e a falta de higienização nas etapas de produção de leite e elaboração de derivados, aumentaram essa população microbiana (Figueiredo et al., 2010; Simões et al., 2014; Neres et al., 2014; Figueiredo et al., 2018). Dentre essa microbiota, tem-se microrganismos deterioradores, patogênicos e as bactérias ácido lácticas.

3.3 Bactérias Ácido Lácticas - BAL

De maneira geral, a microbiota do leite pode ser dividida em dois grupos: bactérias ácido lácticas denominadas de *Starters* - *SLAB* e micro-organismos secundários, denominados de *Non Starter Lactic Acid Bacteria* - *NSLAB*. As bactérias *SLAB* estão envolvidas na produção de ácido durante a fabricação do queijo e contribuem no processo de maturação. As bactérias *NSLAB* não contribuem para a produção de ácido, mas em geral, desempenham um papel significativo durante a maturação, multiplicando-se internamente em uma grande variedade de queijos (Beresford et al., 2001).

As *SLAB* são as principais responsáveis pela inibição de microrganismos patogênicos. De acordo com sua espécie, são utilizadas como culturas iniciadoras em alimentos fermentados, e produzem várias substâncias antimicrobianas utilizadas para a bioconservação de alimentos (Araújo et al., 2008).

Outro aspecto importante é a sua contribuição no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos alimentos fermentados, pela capacidade de produzir um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, com modificação gradativa da estrutura e do aroma dos alimentos fermentados. A degradação da caseína, por exemplo, por proteinases e peptidases contribui para a formação da textura e características sensoriais dos queijos, redução do pH e retenção de água na massa pelos aminoácidos e peptídeos livres. Os aminoácidos formados podem ainda ser degradados em aminas, ésteres, e ácidos, os quais contribuem para a produção de aromas (Silva, 2010).

Bactérias ácido lácticas (BAL) pertencem ao grupo de microrganismos gram-positivos, catalase negativos, embora algumas espécies possam produzir uma pseudo-catalase quando multiplicadas em meio com baixa concentração de açúcar, não formadores de esporos e que geralmente se multiplicam sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas. Os mais importantes gêneros de BAL são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* e *Tetragenococcus* (Beresford et al., 2001).

Podem ser agrupadas em homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com os produtos de fermentação. As homofermentativas produzem ácido láctico a partir da glucose enquanto as heterofermentativas produzem dióxido de carbono, ácido acético, etanol, dentre outras, além de ácido láctico. Ressalta-se que, no caso específico das BAL heterofermentativas, sua utilização em alimentos é, sobretudo, pela sua capacidade de produzir compostos

flavorizantes, muito mais do que pela sua habilidade acidificante. Isto ocorre porque esses micro-organismos utilizam na fermentação de hexoses a via pentose monofosfato, com produção durante o processo de conversão de hexose em pentose, substâncias aromáticas, como aldeído e diacetil (Macedo et al., 2004).

Estes microrganismos podem ser divididos, ainda, de acordo com a temperatura de multiplicação, em termofílicos, caracterizados por possuírem temperatura ideal de crescimento na faixa de 42 °C, e mesofílicos, que crescem na temperatura média de 30 °C (Lima et al. 2014). Entre as culturas mesofílicas encontram-se *Lactococcus lactis* sp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, sendo utilizados para os queijos processados em temperaturas moderadas, ou seja, inferiores a 40 °C, como queijo tipo Gouda e Edam. Para queijos que requerem altas temperaturas durante o processamento, são utilizadas culturas termofílicas como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. (Heller et al., 2008).

3.3.1 *Lactococcus*

O gênero *Lactococcus* são os principais micro-organismos mesófilos utilizados para produção de ácido em fermentações de leite. São homofermentativos e quando cultivados em leite, cerca de 95 % do seu produto final é o ácido láctico. A principal espécie é o *L. lactis*, que é muito utilizado em produtos lácteos (Beresford, et al., 2001).

Bactérias do gênero *Lactococcus* são conhecidos, principalmente, por fermentar, os açúcares em ácido láctico; sendo consideradas homoláticas. Na tecnologia do leite, essa capacidade acidificante é fundamental, uma vez que, devido a essa fermentação, ocorre a promoção da coagulação necessária para a produção de elaborações derivadas do leite, além de oportunizar a preservação dos mesmos. Junto a isso, tratando-se de *Lactococcus lactis*, existe a produção e liberação de derivados compostos bioativos, destacando-se as bacteriocinas; peptídeos antimicrobianos, e exopolissacarídeos; que não apenas corroboram na conservação dos alimentos, mas também trazem benefícios ao organismo (Song, 2017).

A bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* possui grande tolerância ao calor e ao sal, desenvolvendo-se sob temperatura de 40 °C em presença de até 4 % de cloreto de sódio - NaCl. O *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, desenvolve-se com até 2 % de NaCl, o qual é indicado como o que oferece um melhor sabor no queijo do que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Fox et al, 2000).

A espécie *L. lactis*, se demonstra um microrganismo essencial e multivalente em sua aplicação tecnológica na indústria alimentícia; além de potencial para com as inovações biotecnológicas e funcionais. Para isso, destaca-se suas características fermentativas, capacidade de fornecer bioativos e sua segurança para consumo. Portanto, pode-se afirmar que este gênero é um dos mais valiosos para a indústria alimentícia moderna (Kondrotiene, 2023).

3.3.2 *Enterococcus*

Este gênero, anteriormente, era classificado como um grupo pertencente ao gênero *Streptococcus*, do grupo D de Lancefield, também conhecido como grupo dos “estreptococos fecais”. Porém, técnicas modernas de classificação como o sequenciamento do 16s rDNA resultaram na transferência de alguns membros do gênero *Streptococcus* do grupo D de Lancefield ao novo gênero *Enterococcus*, que pertencem à família *Enterococcaceae*, composto pelos gêneros *Atopobacter*, *Catelicoccus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (Fox et al, 2000).

Inclui-se neste gênero mais de 20 espécies, sendo *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans* as espécies mais frequentes em produtos lácteos. São encontrados no trato gastrointestinal de mamíferos, no solo, superfície das águas e plantas. Entre outras características, podem ocorrer sob a forma de cocos isolados, em pares, ou em cadeias curtas, são homofermentativos, não esporulados, gram-positivos, catalase negativo, e anaeróbios facultativos (Heller et al., 2008).

É considerado o gênero mais controverso, não sendo considerado GRAS (Geralmente Reconhecido Como Seguro), pois algumas pesquisas o apontam como patógeno para humanos. A preocupação para a saúde pública com a presença de *Enterococcus* em alimentos está relacionada ao seu habitat entérico, seu uso como indicadores de segurança dos alimentos e seu possível envolvimento com doenças transmitidas por alimentos. No entanto, por muito tempo estes microrganismos foram considerados de baixa capacidade patogênica, devido a falta de fatores potenciais de virulência quando comparados com patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (Carvalho, 2007).

Entre as muitas características das bactérias do gênero *Enterococcus*, sua mais acentuada atividade é sua capacidade de causar graves infecções, com destaque em ambientes hospitalares. Dentro do gênero, algumas espécies têm destaque com causadores de infecções difíceis de tratar devido à sua resistência antimicrobiana; assim como *E. fecalis*, causadora severa de bacteremia e endocardite. Devido à sua resistência citada anteriormente, para o

tratamento, exige-se o uso de diferentes e combinados tipos de tratamento e, no pior dos casos, faz-se necessária uma intervenção cirúrgica (Bin-Asif, 2019).

As evidências supracitadas se demonstram preocupantes, isso devido às capacidades de causarem enfermidades e complicações à saúde. A capacidade de formar biofilmes torna a resolução desses problemas cada vez mais desafiador, essa presença dos biofilmes evidencia-se como fator crítico no surgimento de endocardite, que, no fim, levam às dificuldades na saúde pública (Bin-Asif, 2019).

Algumas pesquisas defendem o seu papel de promover características sensoriais desejáveis em derivados lácteos. Sua influência positiva em queijos é devido ao desenvolvimento de características sensoriais, por reações bioquímicas como a proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis. Produzem substâncias que atuam no *flavor* como diacetil e acetoína, e enzimas, que durante a maturação, podem contribuir para a textura dos produtos (Araújo et al., 2008).

Mas, também, o gênero *Enterococcus* pode ser encontrado constantemente em produtos como queijos e vegetais que passaram por processo de fermentação. Como exemplo, alguns queijos artesanais brasileiros evidenciam a presença de cepas de *Enterococcus faecium*; essas cepas podem trazer benefícios aos produtos fermentados e à saúde, uma vez que, podem inibir patógenos e microrganismos deteriorantes ao produzir substâncias bacteriocínicas, assim, contribuindo para fermentações e efeitos probióticos (Dos Santos, 2014).

3.3.3 *Streptococcus*

Dentre as espécies de *Streptococcus*, bactéria gram-positiva, as de maior relevância são *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*. Isso pois, são espécies capazes de causar graves doenças relacionadas às vias respiratórias e inflamações na pele. Devido a introdução de vacinas pneumocócicas, as incidências de doenças com meningite e pneumonia foram drasticamente reduzidas, mas, a resistência à medicações antimicrobianas ainda se demonstra um grande desafio para a saúde, onde no Brasil, observou-se, em cepas invasivas, a alta taxa de resistência à penicilina (Almeida, 2024).

O único tipo de *Streptococcus* sp utilizado em fermentações de leite é o *Streptococcus thermophilus* sendo diferenciado de outros *Streptococcus* e *Lactococcus*, pela resistência ao calor, a capacidade de crescer a 52 °C e de fermentar um limitado número de carboidratos. A maioria dos produtos lácteos submetidos a altas temperaturas durante a fermentação, sob

temperatura acima de 40 °C, é acidificado pelo crescimento combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus* spp (Araújo et al., 2008).

O gênero *Streptococcus thermophilus* é amplamente conhecido por seus benefícios tecnológicos na indústria do leite e queijo, o motivo para isso se dá pela sua capacidade de produzir compostos aromáticos fundamentais, acetaldeído e diacetil, para conferir sabor e aroma característico desses produtos como, por exemplo, o iogurte. Junto a isso, essa bactéria é conhecida por produzir polissacarídeos extracelulares, estes por sua vez, aumentam a viscosidade e estabilidade dos produtos fermentados (Cui, 2016).

Junto ao que foi supracitado, o *Streptococcus thermophilus* apresenta grande capacidade proteolítica, ou seja, é capaz de decompor as proteínas do leite com eficiência vigorosa, além disso, é capaz de adaptar o ambiente para favorecer seu crescimento; para isso, ao quebrar as proteínas do leite, essa bactéria libera peptídeos e aminoácidos essenciais para o crescimento bacteriano e, também, corrobora para a captura do nitrogênio necessário para os processos metabólicos do microrganismo. Junto a isso, esse sistema também confere sabor aos produtos lácteos fermentados (Cui, 2016).

Partindo para um ponto de vista probiótico, o *Streptococcus thermophilus* demonstra grande eficiência em atenuar os sintomas de intolerância à lactose, uma vez que efetua a fermentação da mesma transformando-a em ácido lático, atua na inibição de patógenos e modula a carga microbiana intestinal; sendo valioso não apenas nas tecnologias do leite, mas, também na viabilização da saúde (Huang, 2024).

3.3.4 *Leuconostoc*

São bactérias mesófilas, com crescimento ótimo em temperaturas que variam 18 °C a 25 °C. Algumas espécies são capazes de crescer em temperaturas abaixo de 10 °C. Possuem forma de cocos e são heterofermentativas (Araújo et al., 2008).

Apesar de sua pequena habilidade acidificante e proteolítica, o *Leuconostoc* spp. é usado nos produtos lácteos, junto aos lactococos, como micro-organismo aromatizante. A produção de diacetil e acetoína a partir do citrato é responsável pela qualidade sensorial, consistência, textura e formação de olhaduras em queijos como o Manchego, Danbo, Gouda e outros (Carvalho, 2007).

O gênero *Leuconostoc* tem sido amplamente estudada e utilizada na fermentação de alimentos, além de serem foco de estudos devido ao seu potencial probiótico, portanto, são encontradas diversas vezes em queijos e vegetais em conserva, atuando e melhorando a

textura e conservação desses alimentos. Algumas espécies, como a *Leuconostoc masenteroides*, possuem grande fator probiótico, e isso se dá pela sua capacidade de se aderir nas células do intestino e agregação em microrganismos indesejados no trato intestinal, assim, ajudando na exclusão competitiva. Tratando-se de alimentos, bactérias do gênero *Leuconostoc* possuem a habilidade de produzir dextranas, e mais substâncias, capazes de atuar na viscosidade e textura de alimentos fermentados (De Paula, 2015).

Ademais, tratando-se de indústria, essa bactéria possui grande facilidade de cultivo, sendo assim, torna-se um importante microrganismo para uma cultura starter; sendo de imenso interesse para pequenas e médias empresas produtoras de alimentos tradicionais brasileiros que buscam elevada qualidade de seus produtos e características sensoriais acima da média (Barreto, 2024).

3.3.5 *Lactobacillus*

Este gênero *Lactobacillus* é considerado o maior dos gêneros de BAL's. Possui grande variedade de propriedades fisiológicas, fenotípicas e bioquímicas devido à sua forma bacilar. Pode ser dividido em três grupos de acordo com a sua fermentação: homofermentativos, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos (Fox et al., 2000; Beresford et al., 2001).

No grupo de *Lactobacillus* homofermentativas, tem-se todos os *Lactobacillus* termófilos encontrados em fermentos (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*). Crescem em temperaturas acima de 45 °C, que são mais altas do que nos outros grupos de lactobacilos além de serem termodúricos. O grupo de *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos fermentam homofermentativamente hexoses a lactato, e heterofermentativamente pentoses e gluconato a lactato e acetato. Este grupo inclui vários dos lactobacilos encontrados em culturas artesanais e queijos maturados, como *Lb. cavalete*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, e *Lb. curvatus* (Fox et al, 2000).

Lactobacillus heterofermentativos fermentam açúcares heterofermentativamente para concentrações equimolares de lactato, etanol e CO₂. Os únicos relatados na literatura em queijo são *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*, que são considerados bactérias não *starters*. Este grupo de BAL pode causar sabor indesejável e formação de gás durante a maturação do queijo (Carvalho, 2007).

Grande parte da importância do reconhecimento de bactérias do gênero *Lactobacillus* se dá pelo seu papel crucial na fermentação de alimentos e como probiótico, isso pois possuem grande capacidade de converter carboidratos, açúcares, presentes no leite em ácido láctico, sendo assim, possuindo papel imperioso na produção de queijos e iogurte. Junto a isso, algumas cepas de *Lactobacillus*, como o *L. plantarium*, são constantemente estudados tanto pela indústria alimentícia quanto pela indústria médica, uma vez que, cepas como essa possuem propriedades probióticas importantes evidenciando sua aptidão terapêutica para melhorar a saúde intestinal, haja vista que, possui a capacidade de prevenir doenças e inflamações intestinais (Coelho-Rocha, 2023).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com amostras de leite de búfalas, obtidas em propriedades leiteiras de búfalas, em Soure e Salvaterra, na Ilha do Marajó, no Pará.

Os responsáveis pelas fazendas, foram contatados por meio de carta convite, onde foi apresentado os objetivos do trabalho e, em seguida, feita a solicitação da permissão para a coleta do leite de búfala.

4.1 Coleta das Amostras de Leite de Búfalas

As amostras de leite de búfala foram obtidas das propriedades leiteiras, coletando-se em média 100 mL, codificadas e transportadas em material isotérmico, sob a temperatura média de 7 °C, para o Laboratório de Microbiologia, do Centro de Ciências Naturais e Tecnologia – CCNT, da Universidade do Estado do Pará - UEPA, em Belém do Pará.

4.2 Isolamento de Bactérias Ácido Láticas (BAL) de Leite de Búfala

Para a realização do isolamento, foram retiradas assepticamente 25 mL da amostra de leite de búfala e adicionou-se a 225 mL de água peptonada 0,1 %, procedendo-se a homogeneização e as diluições seriadas até 10^{-8} . Após o preparo das diluições, foi inoculado no centro de placas de Petri estéreis, 1 mL de cada diluição e em seguida foi adicionado Ágar MRS (Marca Acumedia). Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica, sob temperatura de 35 °C, por 48 horas.

Após a incubação, as colônias identificadas com características de Bactérias Ácido Láticas (pequenas, arredondadas e opacas) foram selecionadas aleatoriamente das placas contendo entre 25 e 250 Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Cada colônia foi então transferida para outras placas de Petri, contendo ágar MRS (Marca Acumedia), utilizando-se a técnica de estriamento, seguido da incubação a 35 °C, por 24 horas, em estufa bacteriológica.

Após o tempo de incubação, foi retirada uma alçada com a alça de platina de cada estria formada, e feita a repicagem em tubos de ensaio contendo 5 mL de Caldo MRS (Marca Acumedia), seguido da incubação em estufa bacteriológica, sob temperatura de 35 °C, por 24 horas. Quando necessário, foi realizada a purificação das colônias através de estriamento da cepa em ágar MRS, a 35 °C por 48 horas.

Os isolados de bactérias ácido lácticas – BAL obtidos, foram codificados e congelados em *Eppendorf* contendo Caldo MRS, com 5 % de lactose, adicionados de 20 % de glicerol, e armazenados a temperatura de -10 °C, até realização das análises, e para serem reativados quando necessário.

Para a codificação das BAL e melhor identificação, compreensão e interpretação dos resultados, atribuiu-se a cada isolado a vogal I, seguida de um número, ficando assim os isolados codificados de I₁ a I₄₀.

4.3 Avaliação Morfológica, Bioquímica e Estudo do Potencial Tecnológico dos Isolados de Bactérias Ácido Lácticas de Leite de Búfala

Foram estudadas as características fenotípicas e bioquímicas de quarenta (40) isolados de bactérias ácidos lácticas de leite de búfala. Realizou-se análises de Coloração de Gram, Teste de Catalase, Teste de Produção de Gás, Atividade Proteolítica, Produção de Diacetil, Teste de Lactofermentação, e Atividade Acidificante em cada isolado. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia, no Centro de Ciências Naturais e Tecnologia – CCNT, da Universidade do Estado do Pará - UEPA.

4.3.1 Coloração de Gram

Para a caracterização morfológica realizou-se a Técnica de Coloração de Gram, na qual visa identificar a parede celular das bactérias e assim diferenciá-las em Gram Positivas e Gram Negativas. Então, avaliada a pureza dos isolados por microscopia, as colônias Gram Negativas foram descartadas (Tortora et al., 2005).

Para este teste, utilizou-se cristal-violeta, solução de lugol, álcool e safranina em lâminas contendo o esfregaço das BAL isolados. A cor azul púrpura indica bactéria Gram positiva, e a cor vermelha indica bactéria Gram negativa. Este teste permite ainda a visualização da morfologia bacteriana, diferenciando a forma de cocos da forma de bastão (bacilos) (Tortora et al., 2005).

4.3.2 Teste de Catalase

Para o Teste de Catalase, os isolados foram inoculados em Ágar MRS, com 5% de lactose, seguido de incubação a 30 °C por 24 horas. Então, adicionou-se três gotas de peróxido de hidrogênio (Vetec) (3%) sobre as colônias e, por fim, foi observado a formação de bolhas. As bactérias ácido lácticas são conhecidas como catalase negativa, ou seja, não são produtoras de catalase (Tortora et al., 2005).

4.3.3 Teste de Produção de Gás

O teste tem como objetivo fazer a diferenciação de BAL com características homofermentativas e heterofermentativas a partir da produção de gás carbônico (CO₂). Para isso, as amostras foram incubadas em Caldo MRS com tubos de Durham invertidos, por 5 dias, a 30 °C. A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a produção de CO₂ a partir de glicose (Bulut, 2003).

4.3.4 Atividade Proteolítica

Na verificação da atividade proteolítica, as culturas isoladas foram reativadas em meio líquido e cultivadas em Ágar MRS, a 5% de glicose, nas mesmas condições que foram isoladas. Para a verificação do halo indicativo de proteólise, uma alíquota de 2,0 µL da cultura foi plaqueada em ágar leite no centro da placa. O ágar leite foi elaborado com 5% de peptona de caseína, 3% de extrato de levedura, 1,2% de ágar bacteriológico e 50% de leite desnatado UHT. Após o plaqueamento em ágar leite, as culturas foram incubadas a 30°C, por 4 dias. Então, foi feita a verificação do aparecimento do halo proteolítico (Nornberg et al., 2009).

4.3.5 Produção de Diacetil

Para a avaliação da produção de Diacetil, 1mL da cultura foi adicionada em tubos de ensaio com 10 mL de leite UHT. Os tubos foram incubados sob temperatura de 30 °C, por 24 horas. Então, foram preparados tubos de ensaio com 0,5 mL de Hidróxido de Potássio (KOH) e 0,5 mL de α – naftol 1%. Logo após, retirou-se 1mL de cada tubo com leite UHT + cultura ativa e adicionou-se aos tubos com a mistura Hidróxido + α–naftol. Por fim, foram incubados

a 30 °C, por 30 min, e verificou-se o aparecimento da coloração rósea na superfície do tubo, o que indica a presença de diacetil (Furtado, 1990).

4.3.6 Teste de Lactofermentação

Para testar os isolados quanto ao seu perfil de lactofermentação, foi seguida a metodologia adaptada de Behmer (1985). Tubos rosqueados com volume de 10 mL de leite em pó desnatado reconstituído (LDR) a 10% (m/v), esterilizados em autoclave a 121 °C, por 15 minutos, foram inoculados com 20 µL das culturas de BAL, e então incubados sob 30 °C, por 24 horas.

Os resultados foram interpretados observando-se o tipo de coágulo formado. Seguindo os seguintes padrões:

- Coágulo gelatinoso e uniforme: proveniente da fermentação láctica;
- Coágulo esfacelado e esponjoso: com produção de ácido e gás, com soro claro e abundante, proveniente da fermentação pseudoláctica;
- Coágulo caseoso, que se contrai de um lado ou de outro ou em todo o contorno, com soro claro ou leitoso: proveniente da ação proteolítica;
- Coágulo mole, mas não líquido: proveniente da fermentação de origem inespecífica;
- Sem coágulo: indica impossibilidade de multiplicação de microrganismos.

4.3.7 Capacidade de Acidificação

A capacidade de acidificação foi verificada com a inoculação de 1% de cada cultura ativa em 10 mL de leite em pó desnatado reconstituído (LDR) a 10 %. O pH foi mensurado utilizando o pHmetro nos tempos de 0 h, 6 h e 16 h de incubação, a 30 °C (Estepar et al., 1999).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Resultado da Avaliação Morfológica, Bioquímica e Estudo do Potencial Tecnológico dos Isolados de Bactérias Ácido Láticas de Leite de Búfala

5.1.1 Coloração de Gram

Os resultados obtidos no Teste de Coloração de Gram apontaram que todos os quarenta (40) isolados avaliados são Gram-positivos, indicado pela coloração violeta, obtida após a finalização do Teste de Coloração de Gram, como mostrado nas figuras abaixo (Figuras 1 e 2).

De acordo com sua característica morfológica, dos 40 isolados, nove (9) apresentaram forma de bacilos (Figura 1) e trinta e um (31) apresentaram forma de cocos (Figura 2), como pode ser observado na Tabela 1.

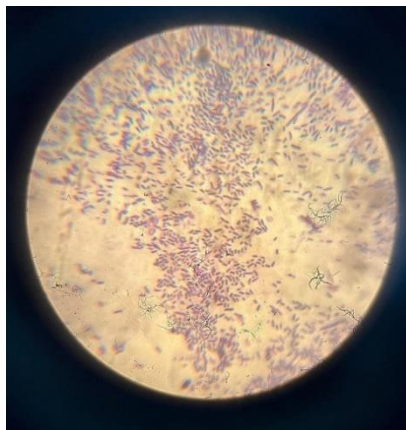


Figura 1 – Bactéria Gram-Positiva
Forma de bacilos

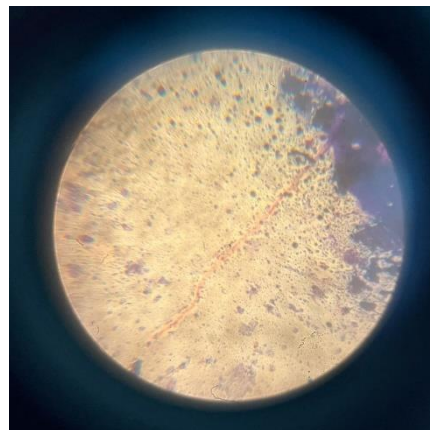


Figura 2 – Bactéria Gram-Positiva
Forma de cocos

As pesquisas indicam que a forma de cocos predomina na microbiota láctica de leite e queijos. De forma similar à esta pesquisa, Feio & Lima (2020) estudaram morfológicamente isolados de leite de búfala, na Ilha do Marajó e verificaram que 50 % dos isolados eram cocos e 50 % bacilos. Fortina et al. (2003); Carvalho (2007), e Aquino (2011) ao avaliarem a caracterização fenotípica de isolados de produtos lácteos em outros Estados, também visualizaram em sua maioria a forma de cocos, com predominância de *Enterococcus* e *Lactococcus*.

Figueiredo et al. (2016) ao avaliar isolados de BAL de Queijo do Marajó, elaborado com leite de búfala, verificaram que 100 % dos isolados apresentaram-se como gram-positivas, como todas as bactérias lácticas e apresentaram a forma de cocos. Guimarães (2011) verificou que de 283 isolados do Queijo do Marajó, elaborado com o mesmo tipo de leite, 246 foram gram-positivos, todos possuindo forma de cocos, em arranjos de cadeia.

5.1.2 Teste de Catalase

Dos 40 isolados submetidos ao Teste de Catalase, trinta e quatro (34) apresentaram-se como catalase negativos, enquanto seis (6) isolados (I₃, I₅, I₆, I₈, I₉ e I₂₄) apresentaram atividade de catalase positiva, como mostra a Tabela 1.

É característica de bactérias ácido lácticas a não produção de catalase, sendo as mesmas conhecidas como catalase negativas. A catalase é uma enzima produzida por todos os microrganismos, responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A importância desta função consiste no fato do peróxido de hidrogênio ser tóxicos para as células (Figueiredo, 2014).

Resultado similares ao deste trabalho foram observados por Guimarães (2011) e Figueiredo et al. (2016), em que 64,63 % e 100 %, respectivamente, do total de isolados de Queijo do Marajó apresentaram-se como catalase negativa.

Ao avaliar os isolados de leite de búfala, na Ilha do Marajó, Feio & Lima (2020) detectaram que 85 % desses isolados apresentaram-se como catalase negativa. Ao avaliar a microbiota láctica de Requeijão do Sertão, na Bahia, Aquino (2011) observou que 88,5 % também apresentaram atividade de catalase negativa.

5.1.3 Teste de Produção de Gás

Vinte e nove (29) isolados não produziram gás, o que demonstra que são homofermentativos, enquanto onze (11) isolados (I₅, I₆, I₇, I₈, I₉, I₂₂, I₂₃, I₂₄, I₃₀, I₃₁ e I₃₂) apresentaram produção de gás, caracterizando-os como heterofermentativos (Tabela 1). Figueiredo (2014) e Guimarães (2011) ao avaliarem isolados de BAL em Queijo do Marajó, verificaram que 100 % e 80 %, respectivamente, dos isolados não produziram gás.

As bactérias ácido lácticas homofermentativas pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* e as heterofermentativas aos gêneros *Leuconostoc* e algumas espécies de *Lactobacillus*, como o *paracasei*.

5.1.4 Atividade Proteolítica

Dos 40 isolados de BAL avaliados, dezessete (17) isolados (I₁, I₅, I₆, I₇, I₈, I₉, I₁₀, I₁₁, I₁₈, I₂₁, I₃₀, I₃₁, I₃₂, I₃₃, I₃₄, I₃₅ e I₃₆) apresentaram atividade proteolítica (Tabela 1). Figueiredo (2014) e Silva (2010), detectaram isolados com atividade proteolítica no Queijo Marajó, na Ilha do Marajó, e no Mussarela de búfala, em São Paulo.

A capacidade de produzir proteases extracelulares é uma característica muito importante de BAL. Estas proteases catalisam a hidrólise das proteínas do leite, fornecendo os aminoácidos essenciais para o seu crescimento e, conseqüentemente, altera a textura, sabor e aromas dos produtos (El-Ghaish et al., 2010).

A proteólise é um processo químico de grande relevância no processo de elaboração e maturação de queijos. Durante este processo, ocorre a ação de enzimas microbianas originadas pelas bactérias ácido lácticas inseridas nele, no qual ocorre a degradação da caseína e a liberação de peptídeos e aminoácidos, os quais sofrem catabolismo, que interfere no sabor e aroma específico dos queijos.

5.1.5 Produção de Diacetil

Somente nove (9) isolados avaliados se mostraram produtores de diacetil, sendo que dos nove, seis (6) isolados (I₃, I₇, I₉, I₂₃, I₂₄ e I₂₇) foram considerados com produção de diacetil alta, devido a coloração rosa ser mais forte nos tubos de ensaio, enquanto que três (3) isolados (I₆, I₈ e I₃₄) foram considerados como produtores fracos de diacetil, devido a coloração rosa clara ser formada após 30 minutos de incubação (Tabela 1).

Feio & Lima (2020), estudaram BAL isoladas de leite de búfala, na Ilha do Marajó. E verificaram que todos os isolados se mostraram produtores de diacetil. Ao avaliar BAL de Queijo do Marajó, Figueiredo et al. (2016) constataram que 33 isolados apresentaram alta produção de diacetil e 7 apresentaram produção moderada.

A utilização do citrato é uma das características importantes das BAL's, pois quando essa substância é metabolizada pelas BAL's ocorre a produção de diversos compostos orgânicos, como diacetil, acetato e acetaldeído, tendo destaque o diacetil, o qual é o principal responsável pela produção de sabor e aroma característicos de manteiga nos queijos (FOX et al., 2000). A capacidade de metabolizar o citrato ocorre principalmente entre as bactérias lácticas: *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *E. faecalis*, *E. faecium*, e *Streptococcus lactis* subsp. *Diacetylactis* (SILVA, 2010).

5.1.6 Teste de Lactofermentação

Do total de 40 isolados estudados, sete (7) apresentaram como padrão de lactofermentação a formação do coágulo gelatinoso e uniforme, proveniente da fermentação láctica (I₂₁, I₂₈, I₂₉, I₃₀, I₃₃, I₃₅ e I₄₀); dez (10) apresentaram coágulo esfacelado e esponjoso, com produção de ácido e gás, com soro claro e abundante, proveniente da fermentação pseudoláctica (I₁, I₂, I₃, I₇, I₉, I₁₀, I₁₆, I₁₉, I₂₂ e I₂₃); nove (9) apresentaram coágulo caseoso, que se contrai de um lado ou de outro ou em todo o contorno, com soro claro ou leitoso, proveniente da ação proteolítica (I₄, I₅, I₆, I₈, I₁₂, I₁₇, I₂₄, I₃₁ e I₃₂); e quatorze (14) apresentaram coágulo mole, mas não líquido, proveniente da fermentação de origem inespecífica (I₁₁, I₁₃, I₁₄, I₁₅, I₁₈, I₂₀, I₂₅, I₂₆, I₂₇, I₃₄, I₃₆, I₃₇, I₃₈ e I₃₉).

Segundo Figueiredo et al. (2016), a formação de coágulo gelatinoso e uniforme indica a boa qualidade bacteriológica das amostras analisadas enquanto a formação de coágulo caseoso indica o potencial proteolítico.

A boa fermentação do leite é essencial para as tecnologias alimentícias, pois, o resultado dessa fermentação, a coalhada, apresenta altíssimo valor nutritivo, destacando o valor das proteínas presentes, as quais dão ao alimento um aumento da biodisponibilidade de vitaminas do complexo B. No processo de fermentação, as bactérias ácido lácticas transformam lactose em ácido láctico, facilmente digerido por estômagos mais sensíveis, além de preservar a gordura, minerais e vitaminas do leite puro.

Os resultados obtidos na caracterização morfológica e bioquímica (Teste de Coloração de Gram, Teste de Catalase, Produção de Gás, Atividade Proteolítica, Produção de Diacetil, e Teste de Lactofermentação) dos quarenta (40) isolados obtidos do leite de búfala, estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados morfológicos e bioquímicos dos isolados de Bactérias ácido lácticas do leite de búfala.

Isolados	Coloração de Gram	Formação		Lactofermentação	Atividade Proteolítica	Diacetil
		de Gás	Catalase			
I ₁	+/Cocos	-	-	2	+	-
I ₂	+/Bacilos	-	-	2	-	-
I ₃	+/ Bacilos	-	+	2	-	+/+
I ₄	+/ Bacilos	-	-	3	-	-
I ₅	+/Cocos	+	+	3	+	-
I ₆	+/ Bacilos	+	+	3	+	+/-
I ₇	+/ Bacilos	+	-	2	+	+/+
I ₈	+/ Bacilos	+	+	3	+	+/-
I ₉	+/ Bacilos	+	+	2	+	+/+
I ₁₀	+/Cocos	-	-	2	+	-
I ₁₁	+/Cocos	-	-	4	+	-
I ₁₂	+/Cocos	-	-	3	-	-
I ₁₃	+/Cocos	-	-	4	-	-
I ₁₄	+/Cocos	-	-	4	-	-
I ₁₅	+/Cocos	-	-	4	-	-
I ₁₆	+/Cocos	-	-	2	-	-
I ₁₇	+/Cocos	-	-	3	-	-
I ₁₈	+/Cocos	-	-	4	+	-
I ₁₉	+/ Bacilos	-	-	2	-	-
I ₂₀	+/Cocos	-	-	4	-	-
I ₂₁	+/Cocos	-	-	1	-	-
I ₂₂	+/Cocos	+	-	2	+	-
I ₂₃	+/Cocos	+	-	2	-	+/+
I ₂₄	+/ Bacilos	+	+	3	-	+/+
I ₂₅	+/Cocos	-	-	4	-	-
I ₂₆	+/Cocos	-	-	4	-	-
I ₂₇	+/Cocos	-	-	4	-	+/+
I ₂₈	+/Cocos	-	-	1	-	-

I ₂₉	+/Cocos	-	-	1	-	-
I ₃₀	+/Cocos	+	-	1	+	-
I ₃₁	+/Cocos	+	-	3	+	-
I ₃₂	+/Cocos	+	-	3	+	-
I ₃₃	+/Cocos	-	-	1	+	-
I ₃₄	+/Cocos	-	-	4	+	+/-
I ₃₅	+/Cocos	-	-	1	+	-
I ₃₆	+/Cocos	-	-	4	+	-
I ₃₇	+/Cocos	-	-	4	-	-
I ₃₈	+/Cocos	-	-	4	-	-
I ₃₉	+/Cocos	-	-	4	-	-
I ₄₀	+/Cocos	-	-	1	-	-

Fonte: Autor

(+): BAL que apresentaram resultado positivo para o teste; (-): BAL que apresentaram resultado negativo para o teste; (+/+): BAL que apresentaram produção de diacetil alta; (+/-): Não demonstrou resultado para o teste

1 - Coágulo gelatinoso e uniforme; 2 - Coágulo esfacelado e esponjoso; 3 - Coágulo caseoso, que se contrai de um lado ou em todo o contorno, com soro claro ou leitoso; 4 - Coágulo mole, mas não líquido; 5 - Sem coágulo.

5.1.7 Capacidade Acidificante

De acordo com os resultados obtidos, pode-se verificar que o pH inicial do leite (tempo zero) em todos os isolados variou de 6,25 (I₃₇, I₃₈ e I₄₀) a 6,76 (I₃). Em 6 horas de incubação, todos os quarenta (40) isolados apresentaram capacidade de reduzir o pH do meio, com os valores variando entre 4,70 (I₃₅) a 6,35 (I₂). Após 16 h de incubação, treze (13) isolados (I₂₅, I₂₆, I₂₈, I₂₉, I₃₀, I₃₃, I₃₄, I₃₅, I₃₆, I₃₇, I₃₈, I₃₉ e I₄₀) reduziram o pH menor que 4,5 (pH \leq 4,5), como expresso na Tabela 2.

Para uma cultura láctica ser considerada produtora rápida de ácido, deve reduzir o pH do leite do seu valor normal (6,6) para 5,2 em 6 h de incubação à temperatura adequada (Cogan et al., 1997). Assim, dos quarenta isolados obtidos no presente estudo, sete (7) isolados (I₂₅, I₃₂, I₃₃, I₃₅, I₃₇, I₃₈, e I₄₀) apresentam rápida atividade acidificante quando inoculadas em leite (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da capacidade acidificante dos isolados de Bactérias ácido lácticas do leite de búfala.

Isolados	Tempo (Horas)		
	0h	6h	16h
I ₁	6,72	6,25	5,81
I ₂	6,70	6,35	5,77
I ₃	6,76	6,01	5,73
I ₄	6,71	6,32	5,80
I ₅	6,72	6,04	6,00
I ₆	6,75	5,94	5,79
I ₇	6,73	5,98	5,85
I ₈	6,73	6,05	5,81
I ₉	6,74	5,98	5,76
I ₁₀	6,71	6,26	5,71
I ₁₁	6,72	6,33	6,44
I ₁₂	6,72	6,32	5,73
I ₁₃	6,71	6,29	5,64
I ₁₄	6,72	6,25	5,73
I ₁₅	6,72	6,21	5,64
I ₁₆	6,66	6,31	5,75
I ₁₇	6,71	6,25	5,73
I ₁₈	6,71	6,30	5,72
I ₁₉	6,72	6,33	5,73
I ₂₀	6,71	6,23	5,66
I ₂₁	6,73	6,33	5,68
I ₂₂	6,70	6,29	5,73
I ₂₃	6,70	6,06	5,71
I ₂₄	6,70	5,98	5,98
I ₂₅	6,61	5,20	4,31
I ₂₆	6,66	5,92	4,23
I ₂₇	6,67	5,76	4,90
I ₂₈	6,66	5,74	3,83
I ₂₉	6,65	5,41	3,53

I ₃₀	6,66	6,71	4,04
I ₃₁	6,65	6,68	5,69
I ₃₂	6,26	5,16	5,81
I ₃₃	6,27	5,26	3,69
I ₃₄	6,27	6,09	3,85
I ₃₅	6,28	4,70	3,52
I ₃₆	6,29	5,91	4,45
I ₃₇	6,25	4,86	3,56
I ₃₈	6,25	5,01	3,59
I ₃₉	6,26	5,36	3,60
I ₄₀	6,25	5,14	3,58

A capacidade acidificante das bactérias lácticas é de grande importância em produtos lácteos. A rápida redução do pH, pelo acúmulo de ácido láctico, atua, principalmente no controle da microbiota contaminante. Assim, constituem um fator auxiliar no processo de conservação e segurança dos produtos lácteos (Figueiredo et al., 2016).

Segundo Fernandes (2014), a capacidade de produzir ácidos orgânicos, a qual é uma das características das bactérias ácido lácticas, provoca a redução do pH, sendo este um fator primordial na qual se baseia atividade antimicrobiana de tais bactérias, uma vez que a maioria dos patógenos alimentares possuem faixa de pH próxima a neutralidade ou ligeiramente alcalina.

Feio & Lima (2020) estudaram a capacidade acidificante de BAL obtidas em leite de búfala e constataram que dos 24 isolados, 7 apresentam rápida atividade acidificante quando inoculadas em leite. Figueiredo et al. (2016) avaliaram o gênero *Enterococcus* isolados de Queijo do Marajó e verificaram que as BAL's não apresentaram rápida atividade acidificante quando inoculadas em leite, o que não acontece quando se trabalha com os gêneros de BAL como o *Lactococcus* e *Streptococcus*, como foi comprovado por Carvalho (2007) e Araújo et al. (2008).

Fazendo-se uma comparação com todas as bactérias ácido lácticas isoladas e estudadas, a partir dos testes bioquímicos, pode-se dizer que os isolados que apresentaram os melhores resultados foram: I₃₂, I₃₃, I₃₅ E I₄₀. Todos apresentaram-se como catalase negativa e com rápida atividade acidificante. Além disso, os isolado I₃₃, I₃₅ e I₄₀, ainda apresentaram excelente perfil de lactofermentação, com características de fermentação láctica e boa atividade proteolítica.

6 CONCLUSÃO

As análises fenotípicas e morfológicas dos quarenta (40) isolados de bactérias ácido lácticas do leite de búfala foram gram-positivos, com nove (9) isolados apresentando a forma de bacilos e trinta e um (31) a forma de cocos.

Os resultados da caracterização bioquímica foram satisfatórios, demonstrando o bom potencial tecnológico da maioria dos isolados avaliados. Trinta e quatro (34) isolados apresentaram-se como catalase negativos. Vinte e nove (29) isolados não produziram gás, caracterizando-se como homofermentativos, e onze (11) isolados apresentaram produção de gás, caracterizando-os como heterofermentativos. Dezessete (17) isolados apresentaram atividade proteolítica. Nove (9) isolados se mostraram produtores de diacetil, sendo que dos nove, seis (6) isolados foram considerados com produção de diacetil alta e três (3) isolados foram considerados como produtores fracos de diacetil.

Em relação ao perfil de lactofermentação, sete (7) apresentaram como padrão de lactofermentação a formação do coágulo gelatinoso e uniforme, proveniente da fermentação láctica; dez (10) apresentaram coágulo esfacelado e esponjoso, com produção de ácido e gás, com soro claro e abundante, proveniente da fermentação pseudoláctica; nove (9) apresentaram coágulo caseoso, proveniente da ação proteolítica; e quatorze (14) apresentaram coágulo mole, mas não líquido, proveniente da fermentação de origem inespecífica.

No que se refere ao teste de atividade acidificante, verificou-se que em 6 horas de incubação, todos os quarenta (40) isolados apresentaram capacidade de reduzir o pH do meio, sendo considerados como uma cultura láctica com rápida produção de ácido.

Ao comparar todos os isolados estudados, pode-se dizer que os que apresentaram os melhores resultados foram: I₃₂, I₃₃, I₃₅ E I₄₀.

Pesquisas sobre a identificação de BAL do leite de búfala e a caracterização de suas propriedades são de grande importância, uma vez no Estado do Pará tem-se o maior rebanho bubalino do Brasil. Além disso, há poucos estudos a cerca destes temas. Os trabalhos encontrados na literatura são sobre avaliação da microbiota láctica de leite e derivados bovinos.

Ainda se fazem necessários mais testes como a caracterização bioquímica e genética para confirmação de quais gêneros são os isolados de BAL's estudados. Os resultado e informações obtidos na presente pesquisa, pretendem contribuir para a futura definição de um fermento láctico a partir de leite de búfala, criar novas perspectivas para a melhoria da qualidade de derivados e para a segurança alimentar, e para enriquecer o banco de cultura lácticas da Universidade do Estado do Pará.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. C. G. et al. Serotype Distribution and Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Streptococcus pneumoniae* in COVID-19 Pandemic Era in Brazil. **Microorganisms**, v. 12, n. 2, p. 401, 2024.

ANDRADE, K. D. **Qualidade do leite de búfala (*Bubalus bubalis*) suplementada com selênio**. 2015. 50f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

ARAÚJO, T. F.; MARQUES, S. L. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; ARCURI, E. F.; RODRIGUES, V. C.; FERREIRA, E. G.; CHAVES, K. S. Perfil de sensibilidade a antibióticos de *Enterococcus* spp. isolados do fermento endógeno utilizados na fabricação do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, MG.. In: 27 Congresso Nacional de Laticínios, 2008, Juiz de Fora. **Anais**. 27 Congresso Nacional de Laticínios, 2008.

BARRETO, C. M. et al. Probiotic Potential and Application of Indigenous Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Ripened Short-Aged Cheese. **Current Microbiology**, v. 81, n. 7, p. 202, 2024.

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

BERESFORD, T. P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, 11, 259-274. 2001.

BIN-ASIF, H.; ALI, S. A. The genus *Enterococcus* and its associated virulent factors. **Microorganisms**, p. 109-130, 2019.

BULUT, Ç. **Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria from Cheese**. 2003. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciência). İzmir Institute of Technology. Izmir, Turkey. Setembro, 2003.

CABRAL, M. L. B.; LIMA, M.S.F.; FERNANDES, G.A.A.; COSTA, E.F.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H. Artisancheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures. **Journal of Bioenergy and Food Science** v.3, n. 4, p.207-215, 2016.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

COELHO-ROCHA, N. D. et al. Evaluation of probiotic properties of novel Brazilian *Lactiplantibacillus plantarum* strains. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 1, p. 160-174, 2023.

CUI, Y. et al. New insights into various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1701, 2016.

DE PAULA, A. T. et al. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 899-910, 2015.

DOS SANTOS, K. M. O. et al. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 1463-1471, 2014.

EL-GHAISH, S.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, I.; SITOHY, M.; IVANOVA, I.; HAERTLE, T.; CHOBERT, J. Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 230, n. 4, p. 635-643, 2010.

ESTEPAR, J.; SÁNCHEZ, M. M.; ALONSO, L.; MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 10, p. 737-746, Oct., 1999.

FEIO, C. D. G. B. FEIO; LIMA, F. P. **Isolamento e Caracterização de Bactérias Ácido Láticas de Leite de Búfala**. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade do Estado do Pará. Salvaterra, 2020.

FIGUEIREDO, E. L.; JUNIOR, J. B. L.; TORO, M. J. U. Caracterização Físico-química e Microbiológica do Leite de Búfala “In-natura” Produzido no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v.04, n.01: p.19-28, 2010.

FIGUEIREDO, E. L. **Enterococcus isolados do Queijo do Marajó, Tipo Creme: Caracterização tecnológica, cinética de multiplicação, capacidade de adesão e resistência a sanitizantes**. 100 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

FIGUEIREDO, E. L.; ANDRADE, N. J.; PIRES, A. C. S.; PEÑA, W. E. L.; FIGUEIREDO, H. M. Caracterização do Potencial Tecnológico e Identificação Genética de Bactérias Ácido Láticas Isoladas de Queijo do Marajó, Tipo Creme, de Leite de Búfala. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.18, n.3, p.293-303, 2016.

FIGUEIREDO, E. L.; ANDRADE, N. J.; PIRES, A. C. S.; PEÑA, W. E. L.; FIGUEIREDO, H.M. Aspectos microbiológicos e higiênicossanitários do queijo do Marajó, de leite de búfala: uma revisão. **REBRAPA. Brazillian Journal of Food Research**. v.9, n.4, p.47-60, 2018

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. 3ª ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 638 p. 2000.

FURTADO, M. M. **Isolamento de bactérias láticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro, Minas Gerais**. Viçosa, 1990. 95 p. Dissertação. Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. 1990.

GIAZZI, A. **Caracterização e Estudo do Perfil Tecnológico de Bactérias Ácido Láticas Isoladas de Queijos Tipo Minas Artesanais e Leite Cru**. Dissertação (Mestrado).

Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2017.

GUIMARÃES, P.C.M Isolamento e caracterização bioquímica de culturas lácticas obtidas do Queijo Marajoara . 69 f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal do Pará, Pará, 2011

HELLER, K. J.; BOCKELMANN, W.; SCHREZENMEIR, J.; DEVRESE, M. Cheese and Its Potential as a Probiotic Food. In: FARNWORTH, E. R. **Handbook of Fermented Functional Foods**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. 581 p.

HUANG, Yan-Yan et al. Metabolic properties, functional characteristics, and practical application of *Streptococcus thermophilus*. **Food Reviews International**, v. 40, n. 2, p. 792-813, 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>. Fonte: Pesquisa da Pecuária Municipal - 2022. Acesso em: 06/08/2024.

KONDROTIENE, K. et al. *Lactococcus lactis* in Dairy Fermentation—Health-Promoting and Probiotic Properties. **Fermentation**, v. 10, n. 1, p. 16, 2023.

LIMA, T. C. C.; RANGEL, A. H. N.; MACEDO, C. S.; ARAÚJO, T. P. M.; ARAUJO, V. M.; JUNIOR, D. M. L.; MURMANN, L.; NOVAES, L. P. Composição e qualidade do leite e do soro do leite de búfalas no estado do rio grande no norte. **Acta Veterinária Brasílica**, v.8, n.1, p. 25-30, 2014.

MACEDO, A. C.; TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2 p. 233-240, 2004.

NERES, L. S.; PACHECO, E. A.; JUNIOR, J. B. L.; LIMA, S. C. G.; BRASIL, L. S. N. S.; NAHUM, B.S Qualidade do leite de búfala e derivados produzidos em Santa Isabel, Pará. **Acta Veterinária Brasílica**, v.8, n.4, p.242-246, 2014

NORNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C. BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from

refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2009.

ÖZOGUL, F.; HAMED, I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amine formation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 58, n. 10, p. 1660-1670, 2018.

SIMÕES, M. G.; PORTAL, R. E.; RABELO, J. G. FERREIRA, C. L. L. F. Seasonal variations affect the physicochemical composition of buffalo milk and artisanal cheeses produced in Marajó Island (PA, Brazil). **Advance Journal of Food Science and Technology**. p. 81-91, 2014.

SILVA, L. F. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de búfala**. 2010. Dissertação (Curso de Mestrado em Microbiologia). São José do Rio Preto. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, 2010.

SILVA, G. C; RIBEIRO, L. F. Os bubalinos no Brasil e a produção de leite. **GETEC**, v.10, n.26, p.42-50. 2021.

SONG, A. Ai-Lian et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. **Microbial cell factories**, v. 16, p. 1-15, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 920p. 2005.

VIDAL, A. M. C.; NETTO, ARLINDO S. Obtenção e processamento do leite e derivados. **Pirassununga-SP. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP)**, 220p, 2018.