

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

Carlos Augusto Badillo Almeida

**POTENCIAL FUNCIONAL DE *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e
Lactococcus lactis L4A8 ISOLADOS DE LEITE DE BÚFALA**

Porto Alegre
2021

Carlos Augusto Badillo Almeida

**POTENCIAL FUNCIONAL DE *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e
Lactococcus lactis L4A8 ISOLADOS DE LEITE DE BÚFALA**

Dissertação 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 mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

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

Porto Alegre
2021

CIP - Catalogação na Publicação

Badillo Almeida, Carlos Augusto
POTENCIAL FUNCIONAL DE Leuconostoc mesenteroides
LB10.4 e Lactococcus lactis L4A8 ISOLADOS DE LEITE DE
BÚFALA / Carlos Augusto Badillo Almeida. -- 2021.
103 f.
Orientadora: Amanda Souza da Motta.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2021.

1. Alimentos funcionais. 2. Bactérias lácticas. 3.
Probióticos. 4. Microencapsulação. 5. Bacteriocinas.
I. Souza da Motta, Amanda, orient. II. Título.

“Um hombre sábio se buscará más oportunidades de las que se le presentan”

Francis Bacon

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai, que sempre apoiou minha carreira acadêmica e por ser o grande responsável por tudo isso.

À minha mãe, por todo apoio, conselhos e amor.

Aos meus irmãos Natalia e Michael, alegrias da minha vida.

À minha avó, pelo amor incondicional e por ser parte essencial de minha vida.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Amanda, por ter me mostrado que um orientador não é um ser a ser temido, e sim uma pessoa que, além de te guiar academicamente, está aberto a escutar suas ânsias, desejos, virtudes e medos.

Aos amigos do laboratório Luana, Danieli, Nathasha, Rosana, Julia e Débora, por toda ajuda, convívio, amizade na bancada e na vida, sempre com um sorriso, compartilhando conhecimentos e que me receberam muito bem.

Ao Daniel, meu amigão, por toda ajuda, força, carinho e atenção. Dani muito abrigado.

A meu amigo Dave, por ter acompanhado a loucura que foi o último ano, me apoiar e sempre fazer seguir em frente.

À Beatriz, minha amiga querida, pela ajuda e amizade verdadeira.

Ao Christian Gregory e sua família por todo apoio que me deram, pelos momentos engraçados, por fazer de meu aniversário um dia importante e confortar meu coração nos momentos em que tive saudades da família. You are my person.

A minha preciosa família do Brasil, Suiane e Amanda, pelas quais me fizeram acreditar que posso ter tudo aquilo que quiser, basta não desistir. As pessoas pelas quais eu posso dizer que tenho verdadeiro amor.

Á Pedro Henrique pelo solidarismo, por me ajudar durante diversos momentos importantes ao final do meu trabalho, além da valiosa amizade e carinho nesses últimos meses.

Um obrigado especial a senhora Ceciliania por todo o apoio, confiança e por sempre me alegrar e me motivar.

Aos meus amigos Alan, Rogério, Carlos, Cristiano, Hemily e Dennis, por todo o apoio, conselhos, amizade e pelo convívio.

Ao Orlando, por ser essa pessoa que Deus me deu, pela força e amor nesta luta. Recuerda siempre: "Pisa fuerte donde quieras que vayas y siempre se libre".

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e professores, pelo ensino de qualidade e referência.

Finalmente, ao CNPq, pelo suporte financeiro, fundamental para a realização e andamento deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado meu Deus pelas pessoas maravilhosas que colocaste em minha vida.

POTENCIAL FUNCIONAL DE *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 ISOLADOS DE LEITE DE BÚFALA

Autor: Carlos Augusto Badillo Almeida
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Amanda de Souza da Motta

RESUMO

O crescente interesse por alimentos funcionais faz com que a indústria procure novas linhagens de bactérias com potencial funcional. Neste contexto, o leite de búfala pode ser utilizado para o isolamento de cepas BALs com eventual potencial probiótico ou tecnológico. O objetivo deste trabalho foi explorar o potencial funcional de *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 isolados do leite de búfala e identificar aplicações na indústria de alimentos. Para atingir este objetivo, foram avaliados testes de inocuidade, atividade antimicrobiana, propriedades tecnológicas, condições de temperatura, influência de conservantes alimentares, tolerância em condições do trato gastrointestinal, avaliação da eficiência de microencapsulação e manutenção das culturas microencapsuladas aplicada em leite UHT e em caldo MRS. Os resultados da inocuidade não apresentaram atividade hemolítica nem produção de gelatinase. *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 apresentou resultado mais tardio da atividade proteolítica-acidificante em Litmus Milk em comparação à *Lactococcus lactis* L4A8. Em ágar leite, ambas apresentaram atividade proteolítica. Não foi detectada atividade lipolítica, produção de gás e hidrólise da lisina. Os isolados demonstraram ser capazes de obter crescimento microbiano em temperaturas de 20, 30 e 37°C. Também, sofreram efeitos moderados das bacteriocinas Nisina e Pediocina. Em associação, os isolados apresentaram tolerância adversa ao trato gastrointestinal e viabilidade na liberação das células microencapsuladas aplicadas em Leite UHT. Os resultados mostraram-se promissores à aplicação na indústria alimentícia como culturas *starter*.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (58 p.) Abril, 2021.

FUNCTIONAL POTENTIAL OF *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 and *Lactococcus lactis* L4A8 BUFFALA MILK ISOLATES

Author: Carlos Augusto Badillo Almeida
Advisor: Prof. Dr. Amanda de Souza da Motta

ABSTRACT

The growing interest in functional foods makes the industry look for new strains of bacteria with functional potential. In this context, buffalo milk can be used for isolating BALs strains with probiotic or technological potential. This work objective was to explore the functional potential of *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 and *Lactococcus lactis* L4A8 isolated from buffalo milk and to identify their applications in food industry. To achieve this objective, safety tests, antimicrobial activity, technological properties, temperature conditions, influence of food preservatives, tolerance in conditions of the gastrointestinal tract, evaluation of microencapsulation efficiency and maintenance of microencapsulated cultures applied in UHT milk and broth MRS were all evaluated. Innocuity results did not show hemolytic activity or gelatinase production. *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 showed a later result of proteolytic-acidifying activity in Litmus Milk compared to *Lactococcus lactis* L4A8. In milk agar, both showed proteolytic activity. No lipolytic activity, gas production and lysine hydrolysis were detected. The isolates demonstrated microbial growth at temperatures of 20, 30 and 37°C. Also, they suffered moderate effects from the bacteriocins Nisina and Pediocina. In association, the isolates showed tolerance to the gastrointestinal tract and viability in the release of microencapsulated cells applied in UHT milk. The results showed promise for application in the food industry as starter crops.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Propriedades das bactérias ácido-lácticas	15
3.2	Bactérias ácido-lácticas nos alimentos.....	16
3.3	Gênero <i>Leuconostoc</i>	18
3.3.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> na industria de alimentos	19
3.4	Espécie <i>Lactococcus lactis</i>	20
3.4.1	<i>Lactococcus lactis</i> na industria de alimentos	21
3.5	Bactérias ácido-lácticas como potencial probiótico	23
3.6	Microencapsulação de bactérias ácido-lácticas.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Micro-organismo e condições de cultivo.....	28
4.2	Avaliação da inocuidade das bactérias lácticas.....	28
4.2.1	Avaliação de atividade hemolítica	28
4.2.2	Avaliação de atividade gelatinase	28
4.3	Avaliação da atividade enzimática das bactérias lácticas.....	28
4.4	Viabilidade das bactérias lácticas em diferentes temperaturas	30
4.5	Influência de bacteriocinas sobre as bactérias lácticas	30
4.6	Deteção de atividade antimicrobiana pelas bactérias lácticas	31
4.7	Avaliação da tolerância das bactérias lácticas em condições do trato gastrointestinal	32
4.8	Avaliação da microencapsulação sobre as bactérias lácticas associadas	32
4.8.1	Avaliação da eficiência de encapsulação das bactérias ácido lácticas.....	33
4.8.2	Avaliação da manutenção das culturas associadas de bactérias ácido lácticas microencapsuladas aplicada em caldo MRS e leite UHT	34
4.9	Análises estatísticas	34
5	RESULTADOS	36
5.1	Avaliação da inocuidade das bactérias lácticas.....	36
5.2	Avaliação da atividade enzimática das bactérias lácticas.....	36

5.2.1	Avaliação da atividade proteolítica	36
5.2.2	Avaliação da atividade lipolítica.....	38
5.2.3	Avaliação da produção de gás.....	38
5.2.4	Avaliação da hidrólise da lisina.....	38
5.3	Viabilidade das BALs em diferentes temperaturas	38
5.4	Influência das bacteriocinas Nisina e Pediocina sobre as bactérias lácticas <i>L. mesenteroides</i> LB10.4 e <i>L. lactis</i> L4A8.	40
5.5	Avaliação da atividade antimicrobiana produzidas pelas bactérias ácido lácticas.....	42
5.6	Avaliação da tolerância das bactérias lácticas em condições do trato gastrointestinal simulado.....	42
5.7	Avaliação da eficiência de encapsulação das bactérias ácido lácticas	43
5.8	Avaliação da manutenção das culturas lácticas microencapsuladas e aplicada em caldo MRS e leite UHT.....	44
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXOS	71

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Avaliação do efeito de temperaturas em meio de cultura ágar MRS.....	38
Tabela 2. Avaliação do efeito de temperaturas em caldo MRS.....	39
Tabela 3. Eficiência de encapsulação das bactérias ácido lácticas avaliadas em Caldo MRS e leite Ultra-High-Temperature (UHT) integral 3% de gordura.....	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Reação em Litmus Milk após de sete dias de cultivo. A) Reação do isolado <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LB10.4 e B) Reação do isolado <i>Lactococcus lactis</i> L4A8.....</p>	36
<p>Figura 2. Atividade proteolítica de <i>L. mesenteroides</i> LB10.4 e <i>L. lactis</i> L4A8 em ágar leite.....</p>	37
<p>Figura 3. Influência das bacteriocinas Nisina e Pediocina sobre os isolados <i>L. mesenteroides</i> LB10.4 e <i>L. lactis</i> L4A8. A) <i>L. mesenteroides</i> LB10.4 e Nisina. B) <i>L. lactis</i> L4A8 e Nisina. C) <i>L. mesenteroides</i> LB10.4 e Pediocina. D) <i>L. lactis</i> L4A8 e Pediocina.....</p>	40
<p>Figura 4. Comportamento dos isolados <i>L. lactis</i> L4A8 (A), <i>L. mesenteroides</i> LB10.4 (B) e associados (C) após exposição às condições do trato gastrointestinal sendo elas: antes da exposição, após suco gástrico simulado (SGS) e após suco intestinal simulado (SIS).....</p>	41
<p>Figura 5. Avaliação dos isolados associados <i>L. mesenteroides</i> LB10.4 e <i>L. lactis</i> L4A8 após de microencapsulação aplicadas em caldo MRS (A) e leite Ultra-High-Temperature (UHT) integral 3% de gordura (B).....</p>	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
MRS	<i>Mann Rogosa Sharp</i>
MH	Mueller Hinton
TSB	Tryptic soy both
BALs	Bactérias ácido-láticas
FAO	Food and Agricultural Organization
OMS	Organização Mundial de Saúde
WHO	World Health Organization
GRAS	Generally Recognized as Safe
UHT	Ultra-High-Temperature
TGI	Trato gastrointestinal
SGS	Suco gástrico simulado
SIS	Suco intestinal simulado
UFC	Unidade Formadora de Colônias
pH	Potencial de hidrogênio
°C	Graus centígrados
M	Molar
g	Gramas
µL	Microlitros
mL	Mililitros
rpm	Rotações por minuto
mm	Milímetros
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
NaCl	Cloreto de Sódio
PBS	Phosphate-buffered saline
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
KCl	Cloreto de potássio

1 INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos e nos diferentes processos entende-se como fundamental a aplicação de diferentes micro-organismos, dos quais as bactérias ácido lácticas (BALs), desempenham papel funcional determinante. Estes micro-organismos são benéficos para o ser humano e, além disso, capazes de gerar processos sintéticos, inibidores e biológicos de forma natural, que permitem sintetizar produtos como substâncias orgânicas, para a aceleração de processos bioquímicos nos alimentos.

Um grupo característico a destacar das BALs é a espécie *Leuconostoc mesenteroides*, a qual se distribui amplamente na natureza. Em nível industrial é utilizada na produção de vinhos, produtos lácteos e açúcar, além disso, é muito utilizada na indústria de alimentos, dadas suas propriedades fermentadoras e sua capacidade para gerar compostos aromáticos. Cabendo destacar que devido a sua grande exigência nutricional, seu isolamento se torna dificultado.

Outra espécie biotecnologicamente importante a destacar é *Lactococcus lactis* devido aos aspectos de segurança, alcançados por terem sido utilizadas há anos na preservação e manutenção de alimentos. Na indústria de laticínios há estudos que destacam importância de genes que codificam enzimas proteolíticas que participam na maturação de produtos como queijos sendo *Lactococcus lactis* responsável pela descarboxilação de cadeia ramificada do ácido α -acetolactato.

Atualmente, o leite de búfala ocupa o segundo lugar na produção mundial, depois do leite bovino, devido a suas características nutricionais com alto conteúdo de lipídeos, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais. Este leite vem sendo explorado para a produção de uma ampla variedade de produtos lácteos, tais como queijos, manteiga, sorvetes e iogurtes. Apesar disso, ainda há poucos estudos de bactérias lácticas isoladas de leite de búfala.

Breyer et al. (2020) realizou a identificação de isolados de bactérias lácticas de leite de búfala, pela técnica de MALDI-TOF/MS, onde determinou a presença de cinco gêneros com valor de confiança $\geq 1,7$ (*Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp. E *Staphylococcus* sp) permitindo uma boa caracterização da diversidade de BALs analisadas. Estes resultados serviram como base para a seleção dos isolados de interesse como *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 para serem estudados quanto a sua potencial

aplicação na área de alimentos.

Portanto, o presente estudo foi desenvolvido visando explorar o potencial funcional de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 isolados de leite de búfala, bem como, identificar suas potenciais propriedades para aplicações em alimentos. Estudar suas propriedades probióticas e capacidade de microencapsulação será objeto deste estudo para que seja possível explorar a funcionalidade destes isolados na matriz láctea.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial funcional de *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 isolados de leite de búfala.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar as atividades enzimáticas de *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8;

2.2.2 Investigar a estabilidade e viabilidade dos isolados em diferentes temperaturas e frente a diferentes bacteriocinas;

2.2.3 Avaliar a produção de atividade antimicrobiana pelos isolados;

2.2.4 Determinar a capacidade de sobrevivência das bactérias lácticas estudadas em condições de acidez e sais biliares;

2.2.5 Avaliar a eficiência do processo de microencapsulação dos isolados de bactérias lácticas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Propriedades das bactérias ácido-lácticas

O grupo de bactérias ácido-lácticas é composto por diversos gêneros bacterianos, cuja principal característica é que possuem um metabolismo estritamente fermentativo, convertendo açúcar principalmente em ácido láctico, particularidade que permite a conservação dos alimentos (Dahunsi et al., 2018; Dahunsi et al., 2019).

As BALs são micro-organismos gram-positivos, em forma de cocos ou bacilos, não esporulados, não móveis, catalase e oxidase negativas, anaeróbios estritos ou anaeróbios facultativos e geralmente nitrato redutase negativos (Mörschbacher et al., 2018; Rio et al., 2019).

Durante décadas, as BALs têm sido utilizadas na indústria alimentícia por conferirem características sensoriais e reológicas aos produtos lácteos (Treguier et al., 2019; Dongmo et al., 2017; Kandasamy et al., 2018). Além disso, quando entram em contato com a microbiota bacteriana do ser humano no sistema digestivo são capazes de atuar como inibidores, impedindo a colonização e desenvolvimento de bactérias patogênicas no trato digestivo, o que ocorre devido à concorrência pelos locais de adesão epitelial, nutrientes e a síntese de substâncias como ácidos orgânicos o peróxido de hidrogênio, além da liberação de bacteriocinas (Kauer et al., 2017; Chiaro et al., 2019; Barache et al., 2020).

Além disso, as BALs desempenham um papel vital em várias fermentações, utilizadas como cultura inicial na indústria de alimentos (Taniguchi et al., 2020; Rubak et al., 2020). Atualmente na tecnologia de preservação, as BALs são usadas para inibir micro-organismos deteriorantes em frutas e vegetais, demonstrando ser uma ferramenta promissora (Junsheng et al., 2020). Existem cerca de 33 gêneros de bactérias ácido-lácticas, como *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Flacklamia*, *Globicatella*, *Ignavigranum*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactibacillus*, *Trichococcus*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactovum*, *Streptococcus*. Todos pertencem ao filo *Firmicutes*, sendo o gênero *Lactobacillus* o maior de todos (Konig, 2017; Vinusha et al., 2018; Sharma et al., 2020).

Segundo a fermentação de glicose, elas se classificam principalmente em dois grandes grupos:

- **Homofermentativas:** São de interesse para a produção de 2-hidroxiopropiônico ou 2-hidroxiopropanóico (ácido láctico) em escala industrial. Caracterizam-se por possuir a enzima aldolase e geralmente utilizam açúcares como hexose e pentose via Embden-Meyerhof utilizando a via da glicólise e a via da pentose fosfato. Entre elas encontram-se: *Lactobacillus* e bactérias do gênero *Pediococcus* e *Streptococcus* (Estrada et al., 2017);
- **Heterofermentativas:** conseguem metabolizar as hexoses e pentoses pela via 6-fosfogluconato-fosfoacetolase gerando como produto final ácido láctico como ácido orgânico e outros metabólitos (acetato, etanol e CO₂). Incluem principalmente bactérias do gênero *Leuconostoc*, *Oenococcus* e alguns *Lactobacillus* spp. Os principais *Lactobacillus* spp heterofermentativos são *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* e *Lb. reuteri* (Estrada et al., 2017; Abedi e Hashemi, 2020).

Atualmente, uma nova proposta de reavaliação formal taxonômica dos gêneros de bactérias ácido-lácticas está sendo proposta. A nova taxonomia classifica as BALs no filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales e menciona a cinco famílias: *Lactobacillaceae* (no momento atual inclui a família *Leuconostocaceae*), *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae* e *Aerococcaceae* (Zheng et al., 2020; Ashaolu et al., 2020; Sharma et al., 2020).

3.2 Bactérias ácido-lácticas nos alimentos

Nos últimos anos, a produção e o consumo de alimentos passaram por mudanças, relacionados a uma demanda crescente por alimentos naturais e saudáveis. Essas tendências envolveram as bactérias ácido lácticas que podem ser aproveitadas na indústria de alimentos como cultura *starter*, originando na matéria prima transformações mediante o processo fermentativo, promovendo de forma positiva o sabor e aroma (Winters et al., 2019; Landis et al., 2021; Chiva et al., 2021).

As BALs empregadas como cultura *starter* podem ter propriedades probióticas, além de contribuir ao final com o perfil sensorial do alimento, podendo fornecer segurança microbiológica. O valor nutritivo poderá ser incrementado por meio da síntese de vitaminas, proteínas, antioxidante e aminoácidos essenciais *in situ*

(Palla et al., 2019; Palla et al., 2020).

Na indústria de alimentos, as BALs são utilizadas na produção de queijo, iogurtes, leites fermentados, massas fermentadas tipo I e tipo II, e também no processamento de bebidas alcoólicas, carnes e vegetais (Frantzen et al., 2018; Ganzle et al., 2019; Brandt, 2019; Terpou et al., 2019; Wang et al., 2019; Vedovatto et al., 2019; Comasio et al., 2020). Os principais gêneros utilizados na indústria de alimentos por serem considerados seguros incluem: *Lactobacillus* (Produtos láteos, carnes fermentadas e vegetais fermentadas), *Lactococcus* (Leite, carnes, vegetais e cereais), *Leuconostoc* (Vegetais e leite), *Oenococcus* (Vinho), *Pediococcus* (Vegetais e carne), *Streptococcus* (Leite) e *Weissella* (Produção de fermento). Essas culturas têm sido usadas como culturas iniciadoras ou adjuntas para fermentação de alimentos e bebidas, devido ao papel na preservação de alimentos fermentados. Além disso, esses micro-organismos melhoram as características físico-químicas e organolépticas dos alimentos (Behera et al., 2018; Agriopoulou et al., 2020; Petrova et al., 2020; Voidarou et al., 2021).

Diferentes estudos têm demonstrado a importância das BALs na conservação de alimentos, inibindo vários micro-organismos deteriorantes e no controle de patógenos, devido a sua produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas (Romero et al., 2020; Agriopoulou et al., 2020). Aquino et al. (2019) demonstrou que as BALs (*Carnobacterium piscícola*, *C. divergens*, *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Le. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Le. gelidum* e *Le. carnosum*) são capazes de reduzir a deterioração das bactérias em quase 80% e também inibindo o crescimento de *Listeria monocytogenes*. Além disso *Lb. acidophilus* no meio TSB e carne moída inibem o crescimento de *Salmonella* sp. e *E. coli* enterohemorrágica em um período de 5 dias, mantendo a qualidade sensorial dentro de intervalos aceitáveis.

Fang et al. (2020) exploraram os efeitos dos produtos de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cepa F17 e *Le. lactis* cepa H52 em uvas de mesa 'Red Globe' para o aumento do prazo de validade e melhoria de qualidade das uvas durante o armazenamento pós-colheita. Os resultados demonstraram que os sobrenadantes de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cepa F17 e *Le. lactis* cepa H52 atuaram como barreira protetora às frutas, reduzindo perda de água; taxa de decomposição; contagem de bactérias mesófilas aeróbias e coliformes; acidez titulável e dos fenóis totais; além de atrasar a maturidade e senescência das uvas de mesa. O

sobrenadante de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* da cepa F17 foi mais eficaz e resultou em melhores avaliações sensoriais e teve um efeito inibitório significativo sobre leveduras e bolores no dia 5. Enquanto isso, o sobrenadante de *Le. lactis* cepa H52 teve um efeito inibitório significativo sobre os fungos durante todo o período de armazenamento.

3.3 Gênero *Leuconostoc*

Leuconostoc sp. pertence à família *Streptococcaceae* e é composto por 24 espécies diferentes. A espécie *Leuconostoc mesenteroides* inclui quatro subespécies: *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *L. mesenteroides* subsp. *suionicum*. As demais 24 espécies são: *L. amelibiosum*, *L. argentinum*, *L. cremoris*, *L. citreum*, *L. carnosum*, *L. dextranicum*, *L. durionis*, *L. fallax*, *L. ficulneum*, *L. holzapfelii*, *L. pseudoficulneum*, *L. fructosum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. pseudomesenteroides*, *L. miyukkimchii*, *L. oeni*, *L. palmae*, *L. garlicum*, *L. paramesenteroides* e *L. rapi*. (Sharma et al., 2018).

As bactérias do gênero *Leuconostoc* sp. são cocobacilos gram-positivos, não esporulados, anaeróbio facultativo, catalase negativa, heterofermentativas e são intrinsicamente resistentes à vancomicina. Devido as suas exigências nutricionais, são de difícil isolamento (Giménez et al., 2019). No geral, encontram-se em plantas, vinho e produtos lácteos (Adem et al., 2017).

Leuconostoc sp. desenvolve-se bem em meios de cultivo como ágar sangue, meio M17, ágar *Mann Rogosa Sharp* (MRS) e caldo MRS. Apresenta forma esférica ou lenticular e mede de 0,5 a 0,7 µm de largura por 0,7 a 1 µm de comprimento. A temperatura ótima para seu desenvolvimento é entre 20 e 30° C, pH entre 4,4 e 5. É α-hemolítica ou não-hemolítica, podendo ser confundida com outros *Streptococcus* do grupo Viridans, razão pela qual se avalia a resistência à vancomicina com a intenção de observar a suscetibilidade a ação de antibióticos (Jofré et al., 2006).

Le. mesenteroides podem ser encontrados em alimentos como carne, vegetais, bebidas, laticínios e produtos de panificação, e devido a capacidade fermentativa ajuda a melhorar características organolépticas e a segurança dos produtos alimentícios (Sharma et al., 2018; Pino et al., 2018).

3.3.1 *Leuconostoc mesenteroides* na indústria de alimentos

A espécie *Le. mesenteroides* é de grande interesse alimentício, pela sua capacidade de crescer rapidamente uma vez que seu metabolismo é energeticamente eficiente (Serra et al., 2018).

Le. mesenteroides é uma bactéria heterofermentativa capaz de produzir ácido láctico a partir da utilização de lactose e citrato e são utilizados principalmente como iniciador primário na fermentação de produtos como manteiga e creme, para produção de diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol (Cicotello et al., 2018). Essa espécie de bactéria também pode ser utilizada como cultura adjunta para acelerar o amadurecimento de queijos tradicionais, com o intuito de desenvolver características sensoriais e nutricionais (Calasso et al., 2020).

Na indústria de laticínios, *Le. mesenteroides* vem sendo utilizado como cultura produtora de aromas em fermentações lácteas, em queijos e empregado para formação da coalhada (Pujato et al., 2017). Mastrigt et al. (2019) avaliaram as espécies *Le. Mesenteroides*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* considerados os principais produtores de aroma e textura em queijos do tipo holandês. Ambas as espécies de BALs foram cultivadas em mono e co-culturas para investigar sua interação e as taxas de crescimento, bem como determinar se o co-cultivo aumenta a complexidade do aroma em comparação com o desempenho de uma única espécie. Durante as monoculturas, as taxas de crescimento de *Lc. lactis* subsp. *lactis* foi maior (média \pm SE; 15,94 \pm 0,42 gDW / mol ATP) que *Le. mesenteroides* (média \pm SE; 9,52 \pm 0,73 gDW / mol ATP) contribuindo para maiores concentrações de biomassa nas culturas. A modelagem dinâmica do acúmulo de biomassa mostrou que os requisitos de manutenção de *Lc. lactis* e *Le. mesenteroides* diminuiu 7 vezes a taxa de crescimento, chegando a quase zero. Apesar de sua baixa abundância (\pm 1%), *Le. mesenteroides* contribui para a produção de aroma em co-culturas.

Além disso, *Le. mesenteroides* tem potencial biotecnológico para a indústria de alimentos, devido a produção de substâncias com potencial antibacteriano como produção de ácido láctico, peróxido de hidroxila e peptídeos antibacterianos (Bungenstock et al., 2020). Estudos demonstraram que *Le. mesenteroides* tem efeito inibitório contra *Listeria monocytogenes*, um micro-organismo patogênico de alimentos (Bah et al., 2019).

Estudos mostram que as bacteriocinas nisina e a pediocina PA1 são utilizadas comercialmente na indústria de alimentos como conservantes e podem ser

usadas em carnes, laticínios, peixes, saladas e vegetais (Silva et al., 2018). Bellil et al. (2018) relataram que *Le. mesenteroides* isolada de leite, pode produzir uma bacteriocina denominada BacCHBY46, capaz de reduzir a formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, contribuindo como estratégia contra biofilmes de patógenos, ou sendo usados para auxiliar na segurança alimentar.

Além disso, alguns patógenos de origem alimentar, *Listeria monocytogenes*, já são resistentes a bacteriocinas como nisina, lactocina 705 e enterocina CRL35 (Grazia et al., 2017). De tal forma que, é necessário o estudo de novos tipos de bacteriocinas para uso como conservantes de qualidade alimentar.

Quiddir et al. (2019) avaliaram a atividade antifúngica de 194 bactérias ácido lácticas isoladas de diferentes produtos (leites crus de camelo, cabra, vaca, ovelha). Testes *in vitro* mostram que *Aspergillus flavus* T5, *Paecilomyces formosus* AT, *Aspergillus tubingensis* NA, foram completamente inibidos por *Le. mesenteroides* B4, *Le. mesenteroides* TE6, *Le. mesenteroides* L1, *Le. mesenteroides* L8, *Le. mesenteroides* L13, *Le. mesenteroides* L12 e 3 *Lactobacillus* (*Lb. plantarum* CH1, *Lb. plantarum* CH2 e *Lb. paracasei*). *Le. mesenteroides* produziram concentrações significativamente mais altas de ácido cafeico e acetato de fenil, promovendo uma atividade antifúngica importante, em comparação com as outras bactérias.

Atualmente, novas linhagens de BALs vem sendo estudadas para determinar propriedades conservantes e identificar suas potenciais aplicações na indústria de alimentos, como também investigar através de métodos de inoculação de uma única espécie ou co-cultivo, as mudanças na formação sabor e aroma em produtos fermentados (Sidek et al., 2018; Jawan et al., 2020).

3.4 Espécie *Lactococcus lactis*

Lc. lactis é uma bactéria Gram-positiva, não formadora de esporos, mesofílico, facultativamente anaeróbio, sem motilidade (Wels et al., 2019; Mataragas, 2020) e são membros da família Streptococcaceae (Gaudu et al., 2019).

Além disso é uma bactéria fermentativa estritamente homolática que converte sua fonte de carbono em L-lactato a partir do piruvato por meio da enzima lactato desidrogenase (Song et al., 2017).

Até 1985, foram identificadas duas subespécies de *Lc. lactis* (Inicialmente definidas como *Streptococcus lactis* e *Streptococcus cremoris*), A espécie é dividida em quatro subespécies, *lactis*, *cremoris*, *hordniae* e *tructae* (Laroute et al., 2017).

Atualmente encontram-se reclassificadas como *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, respetivamente (Mataragas, 2020).

Atualmente, 263 genomas de espécies de *Lc. lactis* estão disponíveis no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/156>), sendo a espécie mais bem caracterizada entre os lactococci, e entre as bactérias fermentadoras de alimentos (Gaudu et al., 2019).

A principal função de *Lc. lactis* reside na indústria de laticínios e biotecnologia, pelas importantes características industriais do organismo, pela sua capacidade de fermentação de açúcar, habilidade de quebrar proteínas do leite, formar aroma e texturizar, bem como a produção de compostos antimicrobianos (Kok et al., 2017; Kelleher et al., 2019; Johanson et al., 2020).

3.4.1 *Lactococcus lactis* na indústria de alimentos

No grupo das BALs, a espécie *Lc. lactis* tem sido intensivamente utilizada na indústria de laticínios devido a seu status reconhecido como seguro (GRAS) pelo Food and Drug Administration (FDA) e por razões tecnológicas, tais como a produção de bacteriocinas e rápida produção de ácido láctico pela utilização de carboidratos disponíveis (Song et al., 2017; Ma et al., 2019). Esta bactéria está amplamente difundida em aplicações de biotecnologia alimentar para a fermentação e mais recentemente sendo usada como bactérias probióticas em animais e humanos (Higdon et al., 2020).

Informações sobre a classificação de subespécies são importantes para a aplicação de culturas em fermentações lácteas. Para a produção de queijos, como Cheddar, Edam e Gouda, normalmente consistem do emprego de *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, devido à sua associação com compostos aromáticos importantes resultantes provavelmente de metilaldeídos (Leucina, valina e isoleucina) (McAuliffe, 2018).

Lc. lactis subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* são frequentemente utilizadas na indústria de laticínios como culturas iniciadoras devido à produção de acetoína e diacetil, substâncias importantes que conferem características específicas de sabor amanteigado aos laticínios (Fusieger et al., 2020).

Calasso et al. (2020) teve como objetivo fornecer conhecimento dos efeitos da inoculação de starter atenuados e cepas bacterianas de superfície, nas

características microbiológicas, bioquímicas e sensoriais durante o amadurecimento do queijo caciotta. O uso de *Lc. lactis* subsp. *lactis* atenuado impactou fortemente a microbiota do queijo. Isso levou a melhores características bioquímicas e sensoriais em comparação com o queijo convencional. Entre as cepas bacterianas de superfície, *Lc. lactis* subsp. *lactis* desempenhou um papel fundamental nas atividades metabólicas envolvidas no amadurecimento do queijo. Isso resultou em uma melhoria da qualidade sensorial do queijo caciotta.

Siroli et al. (2019) avaliaram o potencial de 15 cepas de *Lc. lactis* produtoras de nisina, isoladas de laticínios, para a fermentação de leite de soja e suco cenoura. As cepas foram inoculadas nas matrizes alimentares a um nível de cerca de 6 log UFC / mL. Cepas de *Lc. lactis* LBG2, FBG1P e 3LC39 apresentaram rápido crescimento e acidificação em ambas as matrizes alimentares. As maiores quantidades de nisina foram identificadas nas amostras de leite de soja fermentadas pela cepa bacteriana LBG2 após de 24 e 48 h (26,4 mg / L). Além disso, a produção de nisina combinada com a rápida acidificação resultou em uma forte atividade antagônica contra um patógeno alimentar, como *Listeria monocytogenes*, tanto em leite de soja quanto em suco de cenoura. Ademais a fermentação aumentou a presença de moléculas voláteis, como aldeídos e cetonas com impacto positivo no perfil organoléptico de ambos os produtos fermentados.

Primeiramente, a nisina é um peptídeo antimicrobiano produzido pela bactéria *Lc. lactis* subsp. *lactis*, estruturalmente um peptídeo composto por 34 aminoácidos, catiônico e hidrofóbico (Singh, 2018; Juturu et al., 2018), referente à família dos lantibióticos, contendo lantionina e metil-lantionina (Kim et al., 2020). Até o momento, seis variantes naturais de nisina são conhecidas: nisina A, nisina Z, nisina Q, nisina U, nisina F e nisina H (Ward et al., 1994; Ozel et al., 2018). Com exceção da nisina U produzida por *Streptococcus uberis* isolado de secreções mamárias de bovinos e nisina H produzida por estreptococos, todas as outras variantes naturais da nisina conhecidas até o momento são produzidas por cepas *Lc. lactis* (Samelis et al., 2018; Malaczewska et al., 2021).

A nisina tem espectro de ação limitado, sendo ativa contra alguns micro-organismos Gram-positivos, como *Lactococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Listeria* spp, e células vegetativas ou esporos de *Bacillus* e *Clostridium* (Malaczewska et al., 2021). Normalmente a nisina não tem ação inibitória contra micro-organismos Gram-negativos.

Outra aplicação bastante importante de *Lc. lactis* em alimentos está relacionada aos produtos probióticos (Duarte et al., 2021). Estes alimentos têm um potencial terapêutico e benefícios conferidos ao organismo, capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos a saúde do indivíduo (Surzenko et al., 2020).

Ramalho et al. (2019) avaliaram as características probióticas, atividade antioxidante e atividades do tipo antidepressivo e ansiolítico de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LL95. Os resultados obtidos de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LL95 apresentaram propriedades probióticas em um modelo de trato gástrico simulado e sobrevivência em diferentes concentrações de NaCl e sais biliares. Além disso, a atividade antioxidante do *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LL95 foi demonstrada por meio da atividade de eliminação do radical DPPH, eliminação do radical ABTS e ensaios de poder antioxidante redutor do íon férrico (FRAP). Seis ratos receberam *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LL95 por via oral a uma dose de 10^9 UFC / dia por 28 dias. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LL95 melhorou o comportamento depressivo e de ansiedade, demonstrado pela diminuição do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda e teste de natação forçada. Esses achados indicam a potencial atividade antioxidante do *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LL95 e seu papel no comportamento, sugerindo que o probiótico pode ter aplicações terapêuticas.

3.5 Bactérias ácido-lácticas como potencial probiótico

Os probióticos são micro-organismos vivos que, no geral, podem ser encontrados em diferentes tipos de alimentos, medicamentos e alguns suplementos dietéticos (Paitán et al., 2019). Ao serem consumidos em quantidades apropriadas conferem benefícios para a saúde (Demirbas et al., 2017), auxiliam na manutenção do trato digestivo, além de inibirem o crescimento de bactérias patogênicas (Shi et al., 2019). Os probióticos mais utilizados pertencem ao gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium* (Edalati et al., 2019; Martins et al., 2019). A maioria dos micro-organismos empregados como probióticos representam uma área de crescimento na indústria funcional de alimentos.

No âmbito da saúde, os micro-organismos probióticos são benéficos no tratamento de infecções urinárias, diarreias, intolerância à lactose, síndrome de cólon irritável, hemorróidas, entre outros (Vitetta et al., 2017; Torban et al., 2019). Não obstante, para que esses micro-organismos possam ser bem-sucedidos ao entrar em

contato com o trato digestivo devem ser capazes de suportar as condições do pH, resistir à ação dos sucos gástricos e aos sais biliares, além de serem capazes de colonizar e proliferar neste meio (Hernández et al., 2019). Portanto, sua resistência às condições gástricas e intestinais humanas constitui um parâmetro importante para a seleção de micro-organismos probióticos.

Gómez et al. (2016) avaliaram a resistência de *Le. mesenteroides* P45 isolada do *Pulque*, a exposição de lisozima *in vitro*, sais biliares e pH ácido. Os resultados mostraram que *Le. mesenteroides* P45 exibiu resistência à lisozima, pH ácido (2,5) e sais biliares (0,3 e 1%), sendo o primeiro trabalho que relata resistência da lisozima às espécies de *Leuconostoc*. A resistência ao pH e sais biliares é propriedade essencial de micro-organismos potencialmente probióticos. Son et al. (2018), qualificaram propriedades probióticas de alimentos fermentados coreanos e atividade da β -glucosidase em quatro isolados identificados como *Le. mesenteroides* H40, *Lb. plantarum* FI10604, *Lb. brevis* FI10700 e *Lb. perolens* FI10842 pela sequência do gene 16S rRNA. *Le. mesenteroides* H40 foi sensível à ampicilina (10 μ g), tetraciclina (30 μ g), cloranfenicol (30 μ g) e doxiciclina (30 μ g), ademais foi capaz de passar pelo trato gastrointestinal e sobreviver na presença de ácido gástrico e sal biliar. *Le. mesenteroides* H40 não produziu enzima carcinogênica como p-glucuronidase. Ademais, apresentou capacidade de adesão as células intestinais (2,86-12,37%), indicando poder ser empregado como um potencial probiótico.

Oliveira et al. (2019) avaliaram três linhagens microbianas tolerantes a ácidos, como *Le. mesenteroides* LPBF2, *Lb. satsumensis* LPBF1 e *Saccharomyces cerevisiae* LPBF3, isolado de uma bebida funcional de kefir à base de mel. Apresentaram resistência ao estresse associado ao hospedeiro, capacidade de adesão ao epitélio e atividade antimicrobiana. As três linhagens microbianas toleraram diferentes valores de pH (2.0, 3.0, 4.0 e 7.0) e concentrações de sal biliar (0,3% e 0,6%), e sobreviveram na presença de suco gástrico simulado (condições impostas pelo trato gastrointestinal). Além disso, eles mostraram altas porcentagens de hidrofobicidade, agregação automática e atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As linhagens microbianas analisadas neste estudo, cumprem os critérios de seleção estabelecidos pela FAO/OMS para um candidato a micro-organismos probiótico.

Atualmente, há uma necessidade crescente de encontrar novas linhagens de BALs com potencial probiótico e que tenham impacto no bem-estar e na saúde

humana e animal. Landa et al. (2019), ao avaliarem a prevenção e diminuição de diarreias ocasionadas por enteropatógenos em bezerros (Bovino), recomendaram o uso de probióticos feitos à base de bactérias ácido-lácticas (BALs) aumentando assim o ganho de peso do animal. As espécies bacterianas *Le. mesenteroides*, *Pd. pentosaceus*, *Lb. plantarum*, *Lb. crispatus*, *Lc. lactis*, pelas características avaliadas (pH ácido e sais biliares), apresentaram um potencial probiótico.

O leite de búfala pode ser usado como fonte para o isolamento de cepas BALs potencialmente probióticas porque é rico em proteínas, vitaminas, e minerais, especialmente vitamina C e Ferro (Khan et al., 2019; Du et al., 2019; Hifzulrahman et al., 2019; Ji et al., 2019). Alguns gêneros isolados de leite de búfala já foram estudados para possíveis propriedades probióticas. As bactérias comumente isoladas pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus* e *Streptococcus* (Venema et al., 2018; Abdou et al., 2018; Breyer et al., 2020).

De acordo com especialistas das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial Saúde (FAO/OMS), para exercer efeitos benéficos no hospedeiro, esses produtos devem permanecer com algumas características inalteradas após a adição do micro-organismo para serem considerados probióticos.

Como, por exemplo, conter pelo menos 10^7 UFC de bactérias probióticas viáveis durante todo o período de vida de prateleira do produto ou uma dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica é de 10^8 e 10^9 , o que corresponde ao consumo de 100g de produto contendo 10^6 e 10^7 UFC/g um número suficiente de células viáveis com capacidade das células de aderir ao intestino humano e manter suas propriedades funcionais nos alimentos (FAO/OMS, 2018).

3.6 Microencapsulação de bactérias ácido-lácticas

A microencapsulação é um aprisionamento de células/micro-organismos em na escala micrométrica que são revestidas por cápsulas extremamente pequenas capazes de manter a sua imobilização, proteção, estruturação, funcionalização e liberação controlada (Dianawati et al., 2016; Li et al., 2019). A substância ativa dentro da cápsula é conhecida como o núcleo, da mesma maneira a parede é nomeada material de parede, membrana ou agente de revestimento (Flores et al., 2017).

A seleção do material da parede é muito importante porque promove a

eficiência da encapsulação e a estabilidade da microcápsula (Bevilacqua et al., 2020). Os materiais com destaque para as microcápsulas são os carboidratos, proteínas e lipídios. Polissacarídeos tais como amido, carragena, alginato, goma gelana e xantana são os materiais mais comumente empregados na encapsulação de bactérias ácido lácticas como Bifidobactérias e Lactobacilos (Vaniski et al., 2017; Bevilacqua et al., 2020).

Diversas técnicas são empregadas na encapsulação de probióticos, em geral podem ser divididos em três grupos (Vaniski et al., 2017).

- Físico-químicos: Coacervação simples ou complexa, evaporação emulsão solvente, emulsão solidificação e envolvimento lipossômico;
- Físicos: spray drying, spray coating, spray chilling, gelificação iônica, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização;
- Químicos: polimerização interfacial, inclusão molecular.

De acordo com seu tamanho, tais cápsulas podem ser classificadas como nanopartículas ou micropartículas, com um diâmetro que varia de 0,01 a 0,2 μm e de 1 a 100 μm . Maior de 100 μm são denominadas de macropartículas (Dianawati et al., 2016; Gurruchaga et al., 2018).

A microencapsulação tem diversas aplicações em áreas como a indústria médica, farmacêutica, cosméticos, agrícola e alimentos, sendo amplamente utilizada na encapsulação em aromatizantes, adoçantes, óleos essenciais, corantes, vitaminas, micro-organismos, entre outros (Chang et al., 2018; Aprodu et al., 2019; Maruyama et al., 2020; Stevanovic et al., 2020).

Na indústria, os fabricantes são confrontados quanto à sobrevivência dos probióticos por parâmetros químicos (pH, presença de sal, açúcar, acidez, aromatizantes artificiais, bacteriocinas e corantes), parâmetros de processamento (tratamento térmico, temperatura, materiais de embalagem e métodos de armazenamento) e parâmetros microbiológicos (cepa de probióticos, proporção e taxa de inoculação) que podem limitar a viabilidade de seus benefícios nos alimentos (Rovinaru et al., 2020). Neste sentido, alternativas tecnológicas que protejam as células bacterianas vêm sendo desenvolvidas e aplicadas.

Singh et al. (2019), avaliaram a microencapsulação em alginato e leite desnatado quanto ao seu efeito protetor na viabilidade probiótica de *Lb. gastricus*

BTM7 durante o armazenamento e a exposição a condições gastrointestinais simuladas. Os resultados de revestimento com leite desnatado e alginato em uma proporção de 1:1 procedeu a uma maior eficiência de encapsulação de 94% com uma redução na contagem de células viáveis de um 1 Log e liberação de 90% de células encapsuladas em um tempo de 90 min. A encapsulação de *Lb. gastricus* BTM7 resultou em melhor proteção no pH do suco gástrico com aumento de 4 e 9 vezes na capacidade de sobrevivência após de 2 horas de incubação. O alginato auxiliou na sobrevivência da bactéria probiótica e foi comprovado que a incorporação de leite desnatado diminuiu a atividade de água e melhorou a estabilidade das células probióticas durante o armazenamento.

Portanto, abordar as bactérias ácidos lácticas estudando suas propriedades, considerando ainda tratarem-se de isolados ainda não aplicados em alimentos, suscitou o desenvolvimento deste trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos e condições de cultivo

O trabalho foi desenvolvido com duas bactérias ácido lácticas isoladas de leite de búfala, previamente identificadas (Breyer et al., 2020). Para o estudo, os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram mantidos em caldo MRS com glicerol 20% e armazenados a – 20 °C.

Para a reativação, *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram transferidos para tubos contendo 3 mL de caldo MRS e incubados à temperatura de 30 °C por 24 a 48 h. Após seu crescimento, foram semeados por esgotamento em placas com Ágar *Mann Rogosa Sharp* (MRS) e incubados a 30 °C por 24 a 48 h. A pureza das colônias foi avaliada através de coloração de Gram.

4.2 Avaliação da inocuidade das bactérias lácticas

4.2.1 Avaliação de atividade hemolítica

Para avaliar a atividade hemolítica, os isolados foram semeados em placas de ágar *Columbia Blood Base* suplementado com 5% de sangue de carneiro, e incubados a 30 °C por até 48 h. As placas de ágar sangue foram examinadas para determinar sinais ou não de halos ao redor das colônias, sugerindo hemólise dos eritrócitos (Maragkoudakis et al. 2006). A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo a 37 °C por até 48 h.

4.2.2 Avaliação de atividade gelatinase

Para avaliar a atividade de gelatinase, os isolados foram inoculados pela técnica de picada em tubos de ensaios contendo gelatina nutriente. Os tubos foram incubados a 30 °C por até 24 h e colocados na geladeira a 4 °C por 30 min. Para a interpretação, se a gelatina permanecesse sólida, o teste seria considerado negativo para produção da gelatinase. Se o ágar gelatina apresentar-se liquefeito a prova deverá ser considerada positiva (Marra et al., 2007).

4.3 Avaliação da atividade enzimática das bactérias lácticas

Para estas avaliações os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram empregados. A determinação da atividade proteolítica-acidificante foi realizada em tubos de ensaio com 10 mL do meio líquido Bacto Litmus Milk BD Difco®

(Becton Dickinson France S.A., Le Pont de Claix, França), o qual foi inoculado com 200 µL de uma suspensão bacteriana a uma concentração de 3 MacFarland (9.0×10^8 UFC/mL). A incubação foi realizada a 30 °C durante 7 dias, procedendo-se com leituras diária dos tubos. A reação foi interpretada como ácida quando o meio passa de azul-púrpura para vermelho-rosa devido à fermentação de lactose e glicose. A reação foi alcalina quando o micro-organismo utiliza as substâncias nitrogenadas presentes no meio, formando amônia ou aminas e a cor do meio permanece inalterada. Quando a redução ocorre, o oxigênio é removido do "Litmus" pela ação da enzima redutase, gerando descoloração do meio. Por outro lado, a coagulação indica a precipitação da caseína por ação ácida, observando um clareamento do meio (Ramirez et al., 2016). Todas as análises foram realizadas em quadruplicatas.

A determinação da atividade proteolítica foi avaliada também com o meio ágar leite. Os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram cultivados em MRS a 30 °C durante 48 h. Após, foram inoculados pela técnica de picada em ágar leite por duplicatas e as placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Os resultados foram determinados com base na formação de uma zona clara ao redor da picada, e o diâmetro desta zona clara foi medido para quantificação da atividade proteolítica (Raveschot et al., 2020). A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo a 37 °C por até 48 h. Todas os analises foram realizadas no programa SPSS (18.0).

A atividade lipolítica foi avaliada pela técnica de semeadura por esgotamento e da picada em meio de cultura ágar nutritivo com adição de 1% e 5% de nata (aproximadamente 36% de matéria gorda) (Pedroza et al., 2017). O ágar tributirina também foi empregado, avaliando os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8. Depois, foi incubado a 30 °C durante 72 h. A atividade da lipase secretada no meio foi observada pela formação de halo ao redor da colônia, sendo assim, interpretada como lipólise positiva (Narihiro et al., 2014). O isolado *Lb. paracasei* LB6.4 e *Pseudomonas aeruginosa* P79 foram usados como controle positivo. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

A capacidade de produção de gás foi determinada em tubos de ensaio com 10 mL de caldo nutritivo suplementado com 5% de lactose, sendo adicionados 100 µL de cultivo correspondentes a uma concentração de 3 MacFarland (9.0×10^8 UFC/mL). Em seguida, os tubos foram incubados a 30 °C por 48 horas. A presença de bolhas no interior dos tubos de Durham, indicará a produção de gás pelo micro-organismo. A

cepa *Escherichia coli* ATCC 10536 foi utilizada como controle positivo.

Para avaliar a atividade de hidrólise da lisina, *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram inoculados em um tubo contendo 3 mL de caldo lisina descarboxilase, sendo adicionados 100 µL da cultura (concentração de $9,0 \times 10^8$ UFC/mL). Os tubos foram incubados a 30 °C por 48 horas. A alteração na cor do meio de amarelo para roxa será considerada como resultado positivo (Giazzi, 2017). A cepa *Escherichia coli* ATCC 10536 foi utilizada como controle positivo.

4.4 Viabilidade das bactérias lácticas em diferentes temperaturas

Para avaliar a viabilidade de *Lb. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 em diferentes temperaturas, todas as análises foram realizadas em triplicata usando o método estabelecido por Bromberg et al. (2006) com modificações. Cultivos de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 em 10^8 UFC/mL, foram inoculados em meio ágar MRS e caldo MRS e incubados nas seguintes condições: condição de temperatura em ágar MRS: 20 °C, 30 °C, 37 °C e refrigeração 5,5 °C, por 72 horas; condição de temperatura em Caldo MRS: 20 °C, 30 °C, 37 °C, 50 °C e refrigeração 5,5 °C, por 72 horas. Após estas condições as placas e tubos foram avaliados quando ao crescimento bacteriano dos isolados.

4.5 Influência de bacteriocinas sobre as bactérias lácticas

A influência das bacteriocinas nisina (0,25g) e pediocina (0,20g) foi avaliada frente aos isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8, de acordo com o protocolo estabelecido por López et al. (2008). Foi utilizado como matéria prima, leite Ultra-High-Temperature (UHT) integral 3% de gordura.

Colônias de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram transferidas para tubos contendo 3 mL de caldo MRS e incubados à temperatura de 30 °C por 48 horas. Um mililitro do pre-inóculo de cada um dos isolados, foram adicionados em 100 mL de leite UHT, individualmente. Em seguida, foram transferidos 10 mL dos cultivos bacterianos para 3 tubos falcon estéreis para então proceder-se com a adição das bacteriocinas, individualmente. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Tubos falcon com 10 mL de leite UHT que continham apenas *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram utilizados como controle positivo.

Os sistemas, receberam os diferentes conservantes naturais (nisina e pediocina) em concentrações determinadas pela ANVISA e foram mantidos em refrigeração (7 °C) por aproximadamente 10 dias. A contagem de micro-organismo de cada sistema foi avaliada através do método descrito por Miles & Misra (1938), com modificações. Foi efetuada nos tempos 0 a 3, 7 e 10 dias de incubação, em ágar MRS, incubado a 30 ± 1 °C por 72 horas. Cada sistema foi avaliado adicionando 100 µL da cultura, em tubos eppendorf que continha 900 µL de solução salina ao 0,85%, realizando diluições seriadas. Posteriormente foi realizada a contagem em placa das células viáveis pela técnica da microdiluição e foi depositada de cada diluição, uma alíquota de 20 µL em meio de cultura MRS. Os resultados foram expressos em log₁₀ UFC/mL.

4.6 Detecção de atividade antimicrobiana pelas bactérias lácticas

Colônias de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram transferidas para tubos contendo 3 mL de caldo MRS e incubados à temperatura de 30 °C por 24 a 48 horas. A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita através da técnica da gota. Foi transferido 500 µL da suspensão bacteriana do pre-inóculo de cada um dos isolados, para erlenmeyers com 50 mL de caldo MRS, individualmente. Também um cultivo associado dos dois isolados foi feito com a adição de 250 µL de cada isolado em um erlenmeyer com 50 mL de caldo MRS. Em seguida, foram incubados a 30 °C por 24 e 48 horas e o pH foi determinado. Após a incubação, 1 mL de cada cultura foi centrifugado 10.000 rpm/15 min e o sobrenadante livre de células foi empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana.

Como micro-organismos indicadores foram empregados: *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria monocytogenes* ATCC 35152, *Listeria monocytogenes* 4B, *Listeria monocytogenes* QF Oxford e *Listeria innocua* 6B. Para o preparo das culturas indicadoras foi feita uma suspensão em solução salina 0,85 % NaCl até atingirem 0,5 na escala de MacFarland. Em seguida, as suspensões bacterianas foram semeadas na superfície de meio ágar Mueller Hinton (MH), com o auxílio de suabes. Posteriormente, 20 µL sobrenadante livre de células foi adicionado nas placas e a incubação foi feita a 37 °C por 24 horas, para o acompanhamento da avaliação do aparecimento de halos de inibição os quais foram medidos e expressos

em milímetros (mm). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

4.7 Avaliação da tolerância das bactérias lácticas em condições do trato gastrointestinal

O teste da tolerância das bactérias lácticas a condições gastrointestinais foi avaliado de forma individual e associadas, realizado em triplicata, com duas repetições, seguindo a técnica de Iraporda et al. (2019). Colônias de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram transferidas para tubos contendo 9 mL de caldo MRS e incubados à temperatura de 30 °C por 48 horas. Foram transferidos 5 mL da suspensão bacteriana do pre-inóculo de cada um dos isolados, para tubos falcon individualmente.

Posteriormente, os 3 preparados foram submetidos a centrifugação a (7000xg /10 min). Os pellets foram lavados três vezes com tampão PBS 1 x (pH 7,0) e em seguida, ressuspensos em uma solução simulada de ácido gástrico (NaCl 125 mM, KCl 7 mM, NaHCO₃ 45 mM, pH 2,5) com pepsina 3 g L⁻¹ previamente esterilizado por filtração e incubado em 30 °C por 90 minutos. Posteriormente, as suspensões foram submetidas a centrifugação (7000xg / 10 min). Os pellets foram lavados três vezes com tampão PBS 1 x (pH 7,0) e em seguida, ressuspensos em solução de fluido intestinal simulado (NaCl 22 mM, KCl 3.2 mM, NaHCO₃ 7.6 mM, pancreatina 0,1% (w/v), sais biliares bovinos 0,15% (w/v), pH 8,0) previamente esterilizado por filtração e incubado em 37 °C por 150 minutos. Em cada estágio da simulação, alíquotas de 100 µL foram coletadas e a concentração dos isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foi avaliada por diluições em série em meio de cultura ágar MRS. Os resultados de sobrevivência bacteriana foram expressos em Log₁₀ UFC mL⁻¹.

4.8 Avaliação da microencapsulação sobre as bactérias lácticas associadas

Para avaliar a viabilidade das bactérias lácticas por ensaios de microencapsulação, todas as análises foram realizadas em triplicata de acordo com a metodologia proposta por Todorov et al. (2012). Cultivos associados de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8, foram transferidos para tubos contendo 10 mL de caldo MRS e incubados à temperatura de 30 °C por 48 h. Foi transferido 1 mL da suspensão bacteriana do pre-inóculo de cada um dos isolados, para erlenmeyers com 20 mL de caldo MRS, individualmente. Em seguida, foram incubados a 30 °C por

48 horas. Após crescimento as células foram centrifugadas (10.000xg /10 min, 4 °C). Os pellets foram lavados duas vezes com 10 mL de água peptonada 0,1 % e em seguida, ressuspenso em 5 mL da mesma solução. A fim de determinar as células viáveis no início do teste, 100 µL foram retirados desta suspensão e realizada a diluição seriada. Posteriormente, para encapsulação das células as suspensões foram misturadas com 20 mL de solução de alginato de sódio a 2%, preparada com água destilada. Depois com ajuda de uma seringa estéril, foram transferidas lentamente as suspensões misturadas para uma solução com 100 mL de 0,05M CaCl₂, suplementado com Tween 80 0,1% e aguardaram-se 30 min para a estabilização. Foram retirados 100 µL da solução onde as microcápsulas se encontravam, para realizar diluição seriada, com o objetivo de se avaliar a contagem de BALs que não foram encapsuladas. Após 30 minutos de repouso para estabilização, foram centrifugadas (350xg /10 min, 4 °C). Os pellets foram lavados três vezes com 10 mL de água peptonada 0,1 % para serem filtradas através de papel filtro Grade 1 Whatman. As microcápsulas foram transferidas para um frasco contendo 100 mL de água peptonada 0,1% estéril para posterior avaliação da eficiência de encapsulação.

4.8.1 Avaliação da eficiência de encapsulação das bactérias ácido lácticas

Para avaliar a eficiência de encapsulação das BALs, todas as análises foram realizadas em triplicata usando o método estabelecido por Sousa et al. (2012) com modificações. Foi adicionado 1 g de microcápsulas de Alginato de Sódio em 9 mL de uma solução de Citrato de Sódio 2%. Em seguida este conteúdo foi centrifugado a (300xg /10 min, 17 °C). Logo após, alíquotas de 100 µL foram coletadas fazendo diluições em série em meio de cultura ágar MRS, para determinar as UFC g⁻¹. A eficiência de encapsulação foi representada em percentual e foi calculada com a seguinte fórmula:

$$Eficiência = \left[\frac{(Y - Z)}{X} \right] * 100$$

Onde X é a contagem inicial de micro-organismo antes da encapsulação; Y é a contagem de micro-organismo encapsulados e Z é a contagem de micro-organismo no fluido externo ao redor das cápsulas, ou seja, na solução de CaCl₂ 0,05M.

4.8.2 Avaliação da manutenção das culturas associadas de bactérias ácido lácticas microencapsuladas aplicada em caldo MRS e leite UHT

A partir de cultivos associados de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 microencapsuladas foram aplicadas em caldo MRS e leite UHT integral de acordo com a metodologia proposta por Borges et al. (2019) com modificações. Foram adicionados separadamente 1 g de microcápsulas em tubos com 9 mL de caldo MRS e 9 mL de leite UHT, sendo incubadas em temperatura de refrigeração (5,5 °C). A liberação das culturas microbianas associadas de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 das microcápsulas foi avaliada nos tempos 0, 7, 15, 20 e 30 dias de aplicação no leite UHT e caldo MRS. Cada tubo foi levado ao vórtex para homogeneização, e em seguida, realizada a diluição seriada, juntamente com a aferição do pH. As placas foram incubadas a 30 ± 1 °C por 72 h. O objetivo deste experimento, além de avaliar a liberação das culturas microbianas e sua viabilidade, foi observar a capacidade de acidificação do leite e caldo MRS. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.9 Análises estatísticas

Quanto ao processamento dos dados, a dupla digitação, revisão e análise do banco de dados foram realizados no programa SPSS, versão 18.0 [SPSS Inc., lançado em 2009. *PASW Statistics for Windows*, versão 18.0. Chicago: SPSS Inc.].

Para as análises descritivas, os dados quantitativos com distribuição simétrica foram expressos como médias e erros padrões das médias (\pm EPM), enquanto dados assimétricos foram descritos por medianas e intervalos interquartílicos (percentis 25 – 75, [P25–P75]). O teste de Shapiro-Wilk foi usado para determinar a normalidade da distribuição dos dados quantitativos. As variáveis categóricas foram descritas como frequências absolutas (n) e relativas (n%).

Análises bivariadas para comparações de variáveis quantitativas entre os diferentes tratamentos foram conduzidas utilizando os testes t de Student para amostras independentes, teste de Mann-Whitney, Análise de variância de uma via (One-Way ANOVA) com *post hoc* de Bonferroni, ou o teste de Kurskal-Wallis com *post hoc* de Dunn, quando aplicável. Análises bivariadas para comparações de variáveis quantitativas entre os diferentes tempos de análise foram conduzidas utilizando os testes t de Student para amostras pareadas, teste de Wilcoxon, Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) ou teste de Friedman, quando aplicável. O nível de

significância foi estabelecido em 5% para todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da inocuidade das bactérias lácticas

Os dois isolados foram analisados quanto a sua inocuidade, avaliando a produção de hemolisinas e gelatinase. Os resultados mostraram que os isolados de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 não apresentaram atividade hemolítica nem a produção de gelatinase. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 apresentou atividade de hemolisina no ágar *Columbia Blood Base* suplementado com 5% de sangue de carneiro, como controle positivo.

5.2 Avaliação da atividade enzimática das bactérias lácticas

5.2.1 Avaliação da atividade proteolítica

Após a avaliação das propriedades enzimáticas, a atividade proteolítica-acidificante dos isolados demonstrou reações enzimáticas desejáveis (Figura 1). *Le. mesenteroides* LB10.4 (Figura 1 A) apresentou um resultado mais tardio da atividade proteolítica-acidificante, aparecendo uma reação alcalina nos primeiros dias do teste, indicando que o micro-organismo o utilizou as substâncias nitrogenadas presentes no meio, formando amônio ou aminas; a cor do meio permaneceu inalterada. *Le. mesenteroides* LB10.4 mostrou fermentação de lactose, quando o tornassol ficou rosa como resultado da produção de ácido no meio Litmus Milk, a uma temperatura de 30 °C.

O isolado *Lc. lactis* L4A8 (Figura 1 B) apresentou alteração já no primeiro dia de incubação a 30 °C, devido à acidificação do meio Litmus Milk, o meio passou de azul-púrpura para rosa-vermelho, devido à fermentação de lactose. Porém, o isolado mostrou uma reação de redução no meio gerando assim uma descoloração, visto que o oxigênio é removido pela ação da enzima redutase. Entretanto, *Lc. lactis* L4A8 ao final do experimento no dia sete apresentou coagulação e separação do soro na superfície do meio. De acordo com os resultados obtidos, as BALs analisadas apresentaram atividade proteolítica-acidificante, *Le. mesenteroides* LB10.4 mostrou um resultado mais tardio em relação à atividade da acidificação do meio Litmus Milk que *Lc. lactis* L4A8. Todos estes resultados foram após sete dias de cultivo no meio líquido Bacto Litmus Milk BD Difco®.

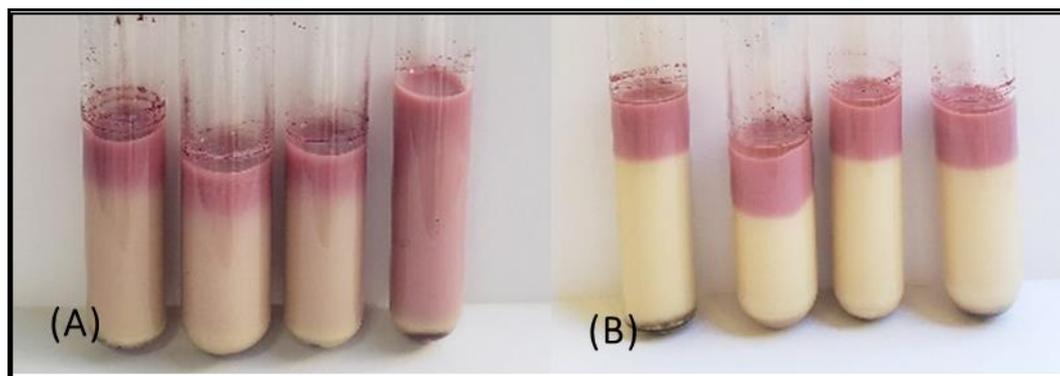


Figura 1. Reação em Litmus Milk após de sete dias de cultivo. A) Reação do isolado *Le. mesenteroides* LB10.4, e B) Reação do isolado *Lc. lactis* L4A8.

No perfil proteolítico, em meio de cultura ágar leite, *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 após de 48 h de incubação a 30 °C, apresentaram maior atividade proteolítica com hidrólise da caseína em ágar leite, com medidas de halos de 16,56 mm e 16,13 mm em relação à cepa controle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com um halo de 9,57 mm após de 48 h de incubação a 37 °C (Figura 2) (One-Way ANOVA com *pot hoc* de Bonferroni, [F(2,20)=35,681, $p \leq 0,0001$]).

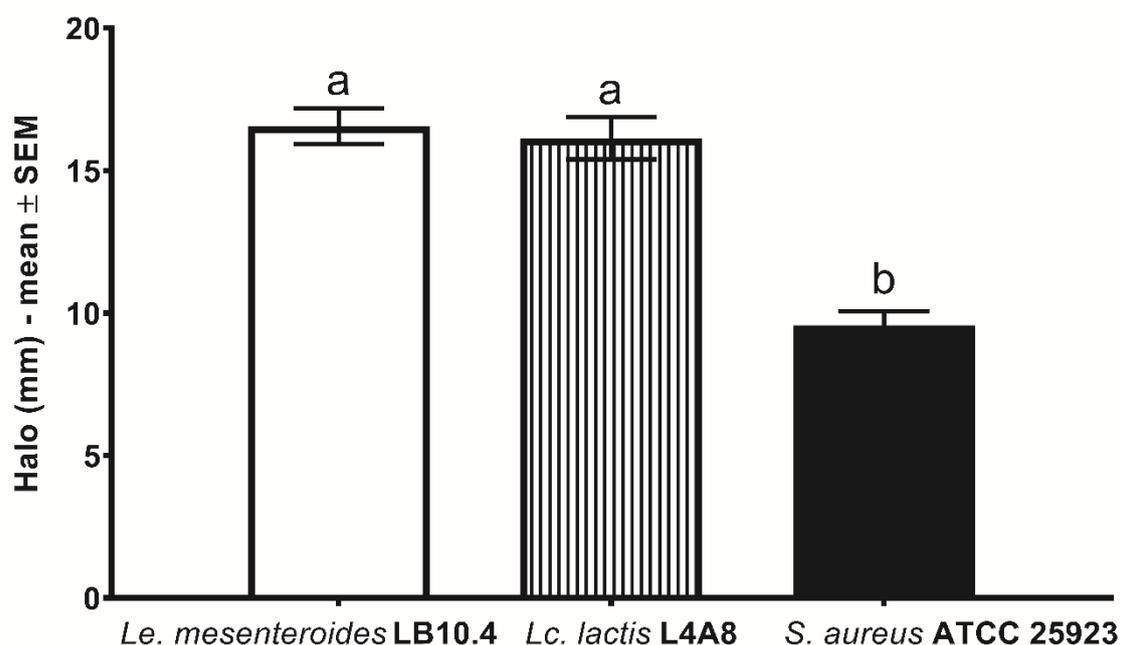


Figura 2. Atividade proteolítica de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 em ágar leite. Análise de Variância (One-Way ANOVA) com *post hoc* de Bonferroni ($p \leq 0,0001$). ^{ab}Letras diferentes indicam significância estatística.

5.2.2 Avaliação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi avaliada com meio de cultura ágar tributirina e ágar nutriente com 1% e 5% de nata. Os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 após de 72 h de incubação a 30 °C não apresentaram atividade lipolítica. Nesse estudo, nem todas as cepas controle apresentaram atividade lipolítica. *Pseudomonas aeruginosa* P79 apresentou atividade de lipase no meio cultura ágar tributirina com um halo de 19 mm. No ágar nata não foram observadas atividade lipolítica, nas condições experimentais realizadas.

5.2.3 Avaliação da produção de gás

A capacidade de produção de gás não foi observada para nenhum dos isolados avaliados: *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8. A cepa *Escherichia coli* ATCC 10536 foi usada como controle positivo por ser uma bactéria produtora de gás, como foi confirmado no estudo, uma vez que apresentou bolhas de gás no interior dos tubos de Durham depois do período de incubação a 30 °C por 48 horas.

5.2.4 Avaliação da hidrólise da lisina

Em relação da hidrólise da lisina, os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 não apresentaram a produção da enzima lisina descarboxilase. A cepa controle *Escherichia coli* ATCC 10536 apresentou alteração na cor do meio de amarelo para roxa, o que é considerado como resultado positivo para descarboxilação da lisina.

5.3 Viabilidade das BALs em diferentes temperaturas

Para à avaliação deste teste conforme o crescimento da bactéria, foi estabelecido um critério de avaliação das BALs em meio de cultura ágar MRS, baseado no quadrante da placa. A placa de petri foi dividida em 4 quadrantes, os crescimentos das colônias na superfície do quadrante foram identificados com uma cruz para cada quadrante onde foi observado crescimento. A não observação do crescimento bacteriano foi descrito como ausência.

Alem disso, para avaliação em caldo MRS, o crescimento foi interpretado como ausência ou presença. Foi avaliado qualitativamente nos meios ágar e caldo MRS, o desenvolvimento de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 em diferentes condições de temperaturas, sendo elas: 5,5 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C e 50

°C, por 4 dias.

Le. mesenteroides LB10.4 quando inoculado em meio de cultura ágar MRS, apresentou crescimento de colônias nas temperaturas de 20 °C e 30 °C. Houve uma diminuição do crescimento em 37 °C e ausência de crescimento em temperatura de refrigeração (5,5 °C), como ilustrado na Tabela 1. Além disso *Le. mesenteroides* LB10.4 inoculado em caldo MRS apresentou um crescimento em temperaturas de 20 °C, 30 °C e 37 °C observando-se turvação nos tubos e ausência de desenvolvimento em temperaturas de 50 °C e 5,5 °C, ilustrado na tabela 2.

Lc. lactis L4A8 inoculado em meio de cultura ágar MRS, apresentou crescimento de colônias nas temperaturas de 20 °C, 30 °C e 37 °C e não se desenvolveu em baixa temperatura de 5,5 °C, como ilustrado na Tabela 1. Quando inoculado em caldo MRS, *L. lactis* L4A8 não se desenvolveu em temperaturas de 5,5 °C e 50 °C, porém apresentou turvação em temperaturas de 20 °C, 30 °C e 37 °C, como ilustrado na Tabela 2.

Tabela 1. Avaliação do efeito de temperaturas em meio de cultura ágar MRS

Bacteria testada	5,5 °C	20 °C	30 °C	37 °C
<i>Le. mesenteroides</i> LB 10.4	Ausência	++++	++++	++
	Ausência	++++	++++	+
	Ausência	++++	++++	Ausência
<i>Lc. lactis</i> L4A8	Ausência	++++	++++	++++
	Ausência	++++	++++	++++
	Ausência	++++	++++	++++

Tabela 2. Avaliação do efeito de temperaturas em caldo MRS

Bacteria testada	5,5 °C	20 °C	30 °C	37 °C	50 °C
<i>Le. mesenteroides</i> LB 10.4	Ausência	Presença	Presença	Presença	Ausência
	Ausência	Presença	Presença	Presença	Ausência
	Ausência	Presença	Presença	Presença	Ausência
<i>Lc. lactis</i> L4A8	Ausência	Presença	Presencia	Presença	Ausência
	Ausência	Presença	Presencia	Presença	Ausência
	Ausência	Presença	Presencia	Presença	Ausência

5.4 Influência das bacteriocinas Nisina e Pediocina sobre as bactérias lácticas *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8

Para o tratamento de *Le. mesenteroides* LB10.4 com Nisina e o controle de *Le. mesenteroides* LB10.4 sem conservante (Figura 3A), a quantidade inicial de células expostas foi de aproximadamente 6.43 Log₁₀. No dia 3 *Le. mesenteroides* LB10.4 com Nisina apresentou uma queda de 0 Log₁₀. Na sequência do experimento, o isolado apresentou uma contagem no seu crescimento do ciclo logarítmico microbiano nos dias 7 e 10, atingindo de maneira logarítmica 2.89 Log₁₀, mostrando que este isolado foi significativamente afetado pelo conservante Nisina. O controle de *Le. mesenteroides* LB10.4 sem conservante não sofreu redução da contagem das células viáveis desde o princípio do tempo zero até o final do tempo 10, com uma contagem estável de 6.456 Log₁₀ (Teste de Friedman para amostras relacionadas, p=0,868) ou entre cada dia analisado (Teste de Mann-Whitney, p>0,05 para todas as análises) (Figura 3A).

O mesmo tratamento em *Lc. lactis* L4A8 com Nisina e o controle de *Lc. lactis* L4A8 sem conservante (Figura 3B) iniciou em torno de 6.398 Log₁₀. Nos dias 0 e 3 demonstrou um crescimento logarítmico estável até 6.275 Log₁₀. Em relação ao dia 10, observou-se uma redução significativa no crescimento afetado pelo conservante Nisina, atingindo até 3.787 Log₁₀ (Teste de Friedman para amostras relacionados, p=0,05). O controle de *Lc. lactis* L4A8 sem conservante não apresentou o mesmo efeito, mantendo-se estável nos 10 dias de avaliação de maneira logarítmica até 6.561 Log₁₀ (Teste de Friedman para amostras relacionadas, p>0,05) ou entre cada dia analisado (Teste de Mann-Whitney, p>0,05 para as análises) (Figura 3B).

Por outro lado, o tratamento de *Le. mesenteroides* LB10.4 com Pediocina e o controle de *Le. mesenteroides* LB10.4 sem conservante (Figura 3C) mostrou uma quantidade inicial de células de aproximadamente 5.742 Log₁₀. No acompanhamento do experimento, *Le. mesenteroides* LB10.4 com Pediocina apontou um maior crescimento microbiano no dia 7 atingindo de maneira logarítmica até 6.646 Log₁₀, em relação ao dia 3 e 10 mantendo-se um crescimento logarítmico estável de 6.316 e 6.485 Log₁₀ (Teste de Friedman para amostras relacionadas, p=0,05). Da mesma forma, no controle *Le. mesenteroides* LB10.4 sem conservante, apresentou o mesmo efeito, mantendo-se de maneira logarítmica de 5.742 até 6.485 Log₁₀. Ambos tratamentos não apresentaram diferença (Teste de Friedman para amostras relacionadas, p>0,05) ou entre cada dia analisado (Teste de Mann-Whitney, p>0,05,

para todas as análises).

Adicionalmente, o mesmo tratamento em *Lc. lactis* L4A8 com Pediocina e o controle de *Lc. lactis* L4A8 sem conservante (Figura 3D) iniciou em torno de 6.439 Log₁₀. Nos dias 3 e 7 *Lc. lactis* L4A8 com Pediocina apresentou uma contagem decrescente de 4.191 e 2.975 Log₁₀, mostrando que este isolado foi significativamente afetado pelo conservante Pediocina. Na sequência do experimento, o isolado no dia 10 mostrou um crescimento do ciclo logarítmico microbiano até 3.026 Log₁₀. Portanto, se observou diferença estatística entre *Lc. lactis* L4A8 com Pediocina e o controle *Lc. lactis* L4A8 sem conservante entre cada dia analisado ($p > 0,05$ para todas as análises). O controle *Lc. lactis* L4A8 sem conservante no dia 10 atingiu de maneira logarítmica até 7.342 Log₁₀.

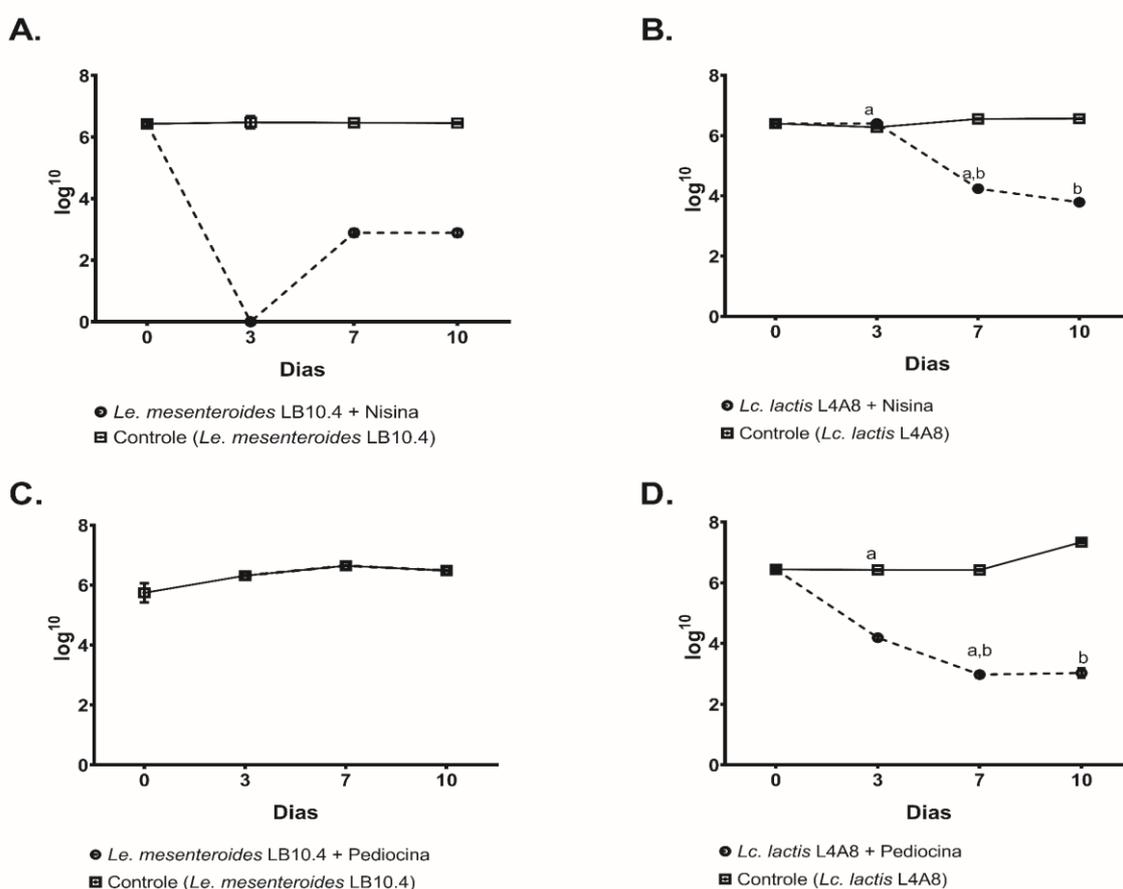


Figura 3. Influência das bacteriocinas Nisina e Pediocina sobre os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8. A. *Le. mesenteroides* LB10.4 e Nisina. B. *Lc. lactis* L4A8 e Nisina. C. *Le. mesenteroides* LB10.4 e Pediocina. D. *Lc. lactis* L4AB e Pediocina. ^{ab}Letras diferentes indicam diferença estatística entre os dias analisados nos grupos tratados. Teste de Mann-Whitney ou Teste de Friedman, quando aplicável.

5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana produzidas pelas bactérias ácido lácticas

Através da metodologia da gota, com o sobrenadante livre de células, foi possível determinar a atividade antimicrobiana dos isolados testados frente a diferentes micro-organismos patogênicos. O cultivo de *Le. mesenteroides* LB10.4 após 48 h de incubação a 30°C apresentou um pH de 5. O isolado *Le. mesenteroides* LB10.4 exibiu atividade bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e apresentou um halo de inibição de 20 mm.

O cultivo *Lc. lactis* L4A8 após 48 h de incubação a 30 °C apresentou um pH de 4 e não foi observado halo de inibição contra os indicadores testados, nas condições experimentais executadas.

Os cultivos das co-culturas *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 após 48 h de incubação a 30 °C apresentou um pH 5, as co-culturas apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As co-culturas *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 apresentaram um halo de inibição de 19 mm. Para as outras bactérias indicadoras não foram observados halos de inibição.

5.6 Avaliação da tolerância das bactérias lácticas em condições do trato gastrointestinal simulado

A tolerância das bactérias lácticas *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 frente às condições do TGI foi analisada através de simulação *in vitro* individualmente e associados, com objetivo de determinar a viabilidade celular dos isolados após a exposição às condições adversas encontradas no trânsito do TGI (e.g. pH ácido, presença de sais biliares). Os dois isolados individualmente e associados iniciaram a simulação com aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Nas simulações de condições gástricas (Figura 4), para *Lc. lactis* L4A8 (Figura 4A), não foi observado efeito na viabilidade celular com as exposições ao suco gástrico simulado (SGS) e suco intestinal simulado (SIS) por períodos de 90 e 150 minutos, respectivamente (Teste de Krusal-Wallis, $p > 0,05$ para todas as análises).

Ademais, o isolado *Le. mesenteroides* LB10.4 (Figura 4B) demonstrou diminuir sua viabilidade celular, afetada pela exposição ao suco gástrico simulado (SGS) com um pH 2 (ácido) em conjugação com a pepsina simulando o stress gástrico, atingindo de maneira logarítmica até 5.582 Log_{10} . Depois foi exposto a ação sais biliares (SIS) e da pancreatina com um pH 8 simulando o stress intestinal,

mostrando uma queda gradativa na viabilidade celular, atingindo uma redução logarítmica de 3.333 Log_{10} , apresentando uma redução drástica na contagem (Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn, $p=0,044$).

Além disso, *Le. mesenteroides* LB10.4 em associação com *Lc. lactis* L4A8 (Figura 4C) em condições gástricas simuladas de (SGS) não apresentaram diferença significativa na contagem microbiana, atingindo de maneira logarítmica em 7.581 Log_{10} e em condições gástricas simuladas de (SIS) apresentaram reduções na viabilidade celular com a exposição à sais biliares até 7.366 Log_{10} (Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn $p=0,027$, respectivamente). Em ambos tratamentos para *Lc. lactis* L4A8 (Figura 4A) e em associação *Lc. lactis* L4A8 com *Le. mesenteroides* LB10.4 (Figura 4C) demonstrando uma habilidade de sobreviver e se multiplicar.

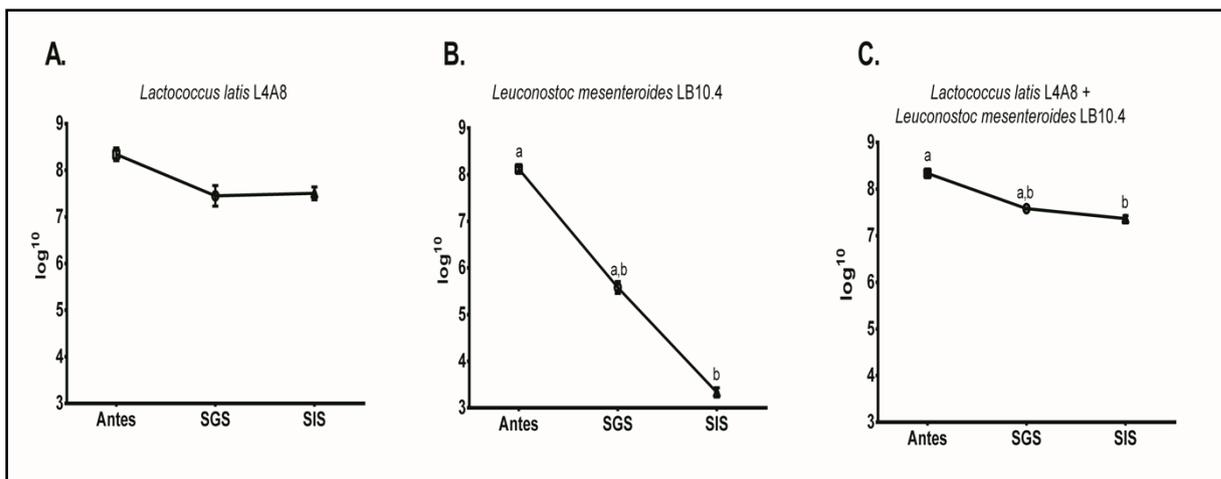


Figura 4. Comportamento dos isolados *Lc. lactis* L4A8 (A), *Le. mesenteroides* LB10.4 (B) e associados (C) após exposição às condições do trato gastrointestinal, sendo elas: antes da exposição, após suco gástrico simulado (SGS) e após suco intestinal simulado (SIS). ^{ab}Letras diferentes indicam diferença estatística entre os dias analisados nos grupos tratados. Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn.

5.7 Avaliação da eficiência de encapsulação das bactérias ácido lácticas

A eficiência de encapsulação dos isolados associados de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 em caldo MRS e em Leite Ultra-High-Temperature (UHT) foi de 83,68% e de 79,01%, respectivamente (Tabela 3). De acordo com os resultados obtidos as culturas lácticas associadas permaneceram viáveis após a encapsulação. Os isolados associados foram incubados a 30 ± 1 °C por 72 horas.

Tabela 3. Eficiência de encapsulamento das bactérias ácido lácticas avaliados em Caldo MRS e Leite Ultra-High-Temperature (UHT).

Matriz	Eficiência de encapsulação (%)
Caldo MRS	83.68 ± 14.821
Leite UHT	79.01 ± 3.332

Valores referentes à média das replicatas e seus respectivos desvios padrão.

5.8 Avaliação da manutenção das culturas lácticas microencapsuladas e aplicadas em caldo MRS e leite UHT

Foram estudadas para a liberação das culturas associadas microencapsuladas *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 (Figura 5) aplicadas em caldo MRS e leite UHT. Os isolados associados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8, iniciaram uma mesma concentração de inóculo inicial aproximadamente 10^8 UFC/mL.

As culturas associadas estudadas permaneceram em refrigeração à temperatura de 5,5 °C, por 30 dias de estudo. As culturas avaliadas foram liberadas por meio da agitação no vórtex nos dias (0, 3, 7, 15, 20 e 30) correspondente ao estudo.

A viabilidade das células das culturas associadas mostrou que em caldo MRS e Leite UHT, apresentaram resultados distintos quanto à sobrevivência dos micro-organismos associados e liberados ao longo do período de investigação.

A sobrevivência das culturas associadas *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 encapsuladas em alginato de sódio a 2% e inseridas no caldo MRS, apresentaram no dia 15 uma liberação maior de células viáveis de maneira logarítmica de 4.526 Log₁₀ (Figura 5A). Nos demais dias de análise (3, 7, 20 e 30) a viabilidade das células liberadas mostrou ser estável, observando-se uma concentração de 4.045 Log₁₀, 3.95 Log₁₀, 3.941 Log₁₀ e atingindo de maneira logarítmica até 3.387 Log₁₀.

Por outro lado, quando os isolados associados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 encapsulados em alginato de sódio a 2%, foram aplicados em leite Ultra-High-Temperature (UHT) integral 3% de gordura (Figura 5B), apresentaram nos dias (0, 3 e 7) uma liberação moderada, atingindo de maneira logarítmica em 3.123 Log₁₀, 3.133 Log₁₀ e 3.032 Log₁₀. Além disso, nos demais dias de análise (15, 20 e 30) registrou a maior viabilidade celular liberada, com uma concentração logarítmica de 3.974 Log₁₀, 4.52 Log₁₀ e 5.32 Log₁₀.

Da mesma forma, a capacidade de acidificação pelas bactérias associadas

Le. mesenteroides LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram avaliadas na aplicação em caldo MRS e leite Ultra-High-Temperature (UHT) integral 3% de gordura. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade de acidificação pelas bactérias associadas com mudanças de pH de 4 em caldo MRS e um pH de 5 em leite (UHT). As mudanças de pH das culturas estudadas permaneceram á uma temperatura de 5,5 °C, após de 30 dias de estudo.

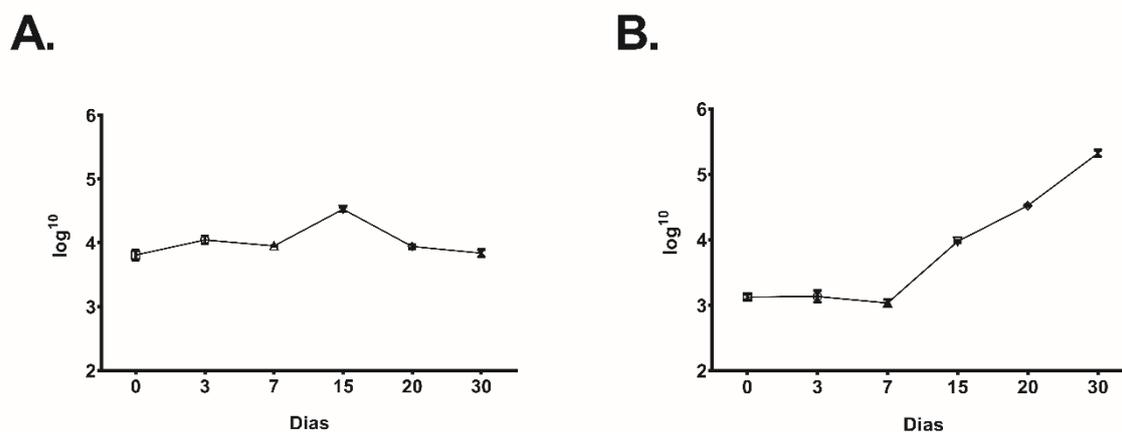


Figura 5. Avaliação da liberação dos isolados associados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 após de microencapsulação aplicadas em caldo MRS (A) e leite Ultra-High-Temperature (UHT) integral 3% de gordura (B).

6 DISCUSSÃO

O crescente aumento de consumo de alimentos no mundo faz com que a indústria explore cada vez mais bactérias ácido lácticas que demonstrem funcionalidade e possam ser aplicados na indústria de alimentos. Em nível industrial para a produção de derivados no Brasil tem sido cada vez mais estudado o leite bubalino buscando ampliar os conhecimentos nesta área. Portanto, este trabalho visou ampliar os conhecimentos nesta área, explorando novos isolados de bactérias lácticas, buscando identificar suas propriedades para uma posterior aplicação em alimentos.

Portanto, se avaliou a inocuidade dos isolados de bactérias ácido lácticas, tendo em vista que diversos testes que asseguram a sua segurança para aplicação em alimentos precisam ser realizados e são preconizados pela ANVISA, para que se possa fazer a proposição de novas BAL em alimentos.

Na presente investigação e no trabalho realizado por Breyer et al. (2020), nenhuma das cepas testadas, *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8, exibiu atividade hemolítica e atividade de gelatinase. Este é um resultado relevante que indica que os isolados podem ser utilizados em alimentos pois não apresentam riscos à saúde, visto que não apresentam este fator de virulência. Em um estudo realizado por Kaktcham et al. (2018) os gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* apresentaram características impróprias como atividade β -hemolítica, atividade de gelatinase ou capacidade de produção de amina biogênica com base em testes fenotípicos. Da mesma forma, Lopes et al. (2017) estudou os isolados *Enterococcus faecalis* L3A21E8, *Lc. lactis* L3A21M1, *Lb. plantarum* L3C1E8, *Le. mesenteroides* L3A21M4 e *Le. mesenteroides* L3C21R7 e estes demonstraram que todos os isolados tiveram resultados negativos para a produção de histaminas e Dnase, mas atividade de gelatinase foi detectada em 64% dos isolados de *Enterococcus*, enquanto nenhuma das cepas de *Leuconostoc* foi produtora de gelatinase. Colombo et al. (2020) também verificaram que os isolados *Lb. casei* (MSI1, MSI5, MRUV1, MRUV6), *Lb. acidophilus* (MVA3), *Lb. nagelli* (MSIV4), *Lb. harbinensis* (MSI3, MSIV2), *Lb. fermentum* (SIVGL1), *Lb. plantarum* (MLE5, MSI2), *Pediococcus pentosaceus* (MLEV8), *Pd. acidilactici* (MSI7), *Weissella paramesenteroides* (MRUV3, MSAV5) provenientes de um ambiente de laticínios, não apresentaram qualquer atividade hemolítica nos testes *in vitro* a 25 °C ou 30 °C. De acordo com Franz et al. (2001) a produção de hemolisina é um fator importante nas infecções causadas por *Enterococcus* spp. sendo identificado

em maior frequência em isolados de amostras clínicas do que de alimentos.

Além disso, os dois isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 já foram avaliados quanto a inocuidade em trabalho anterior, em relação a presença de genes de virulência como os genes *ace* (adesão), *sprE* (serina protease), *cpd* (feromônio sexual), *cylA* (citolisina) *agg* e *asa1* (agregação), através de reações de PCR e susceptibilidade a antimicrobianos, concluindo que nenhum dos isolados teve os genes detectados e nenhuma resistência foi observada (Breyer et al. 2020). Estes dados reforçam a escolha destas duas bactérias para o estudo proposto neste trabalho assegurando a inocuidade para a aplicação em alimentos.

Em seguida, foram avaliadas as propriedades tecnológicas, como atividades extracelulares proteolíticas e lipolíticas, características importantes que contribuem para o sabor de produtos alimentícios fermentados como resultado da quebra de gordura, proteína e carboidrato. Ademais, também fornece o desenvolvimento de aromas e sabores pela liberação de peptídeos e aminoácidos da caseína, que atuam como precursores do aroma nos queijos, como também para as características de sabor (Serrano et al., 2018; Terpou et al., 2018). Da mesma forma, os isolados estudados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram positivos, ou seja, apresentaram alteração de cor e coagulação nos dias de avaliação durante a incubação, devido à acidificação do meio Litmus milk a uma temperatura de 30 °C apresentando a digestão do Litmus milk indicando que os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foram capazes de degradar a caseína, o que é consistente com nossos achados neste estudo. Esses resultados foram semelhantes aos produzidos por várias cepas de BALs isoladas de queijos tradicionais (Hemme e Foucaud-Scheunemann, 2004; Cano et al., 2019). Além disso, Lopes et al. (2017) relataram que os isolados identificados como *Le. mesenteroides*, *Lc. lactis*, *Lb. paracasei*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus pseudoavium* foram capazes de degradar a caseína. A degradação das proteínas do leite constitui um dos principais processos durante a maturação dos queijos uma vez que intervém na textura final do produto em consequência da degradação do coágulo (Li et al., 2019; Li et al., 2020).

Da mesma forma, as duas bactérias *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 exibiram atividade proteolítica em ágar leite. Seixas et al. (2018) relataram espécies de *Le. mesenteroides* que apresentaram baixa atividade proteolítica, sendo boas candidatas para uso como culturas auxiliares na fabricação de queijos. Esses resultados foram análogos aos produzidos em nosso estudo sugerindo assim,

características tecnológicas desejáveis para culturas iniciadoras funcionais.

No teste de produção de lipase pôde-se observar que os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 provenientes de leite de búfala não apresentaram atividade lipolítica, porém foi um resultado não esperado neste estudo. Lopes et al. (2017) avaliou BALs isoladas de queijo artesanal açoriano as quais apresentaram atividade lipolítica em 30% dos isolados, um *Leuconostoc*, dois *Lactobacillus* e 31 *Enterococcus*. Benito et al. (2007) verificou a atividade lipolítica de *Lc. lactis*, *Le. mesenteroides*, *Pd. pentosaceus*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* concluindo que não apresentaram atividade lipolítica contra azeite-rodamina B e gordura de porco. Entretanto, no ágar tributirina mostraram atividade lipolítica muito baixa. Esses resultados não foram semelhantes aos produzidos em nosso estudo onde a ausência de crescimento de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 foi observada em ágar tributirina.

Katz et al. (2002), relataram atividades de lipase e esterase de bactérias ácido lácticas representando os gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* isolados de leite ovelha e queijos. *Lb. plantarum* O186, *Lb. acidophilus* O252, *Enterococcus faecium* O174, *Enterococcus faecium* O426 e *Enterococcus faecalis* Ov409 apresentaram atividade lipase associada à fração intracelular da tributirina.

A produção de gás CO₂ é especialmente relevante em microorganismos heterofermentativos como produto da fermentação de açúcares. No entanto, também há produção em espécies homofermentativas como resultado do metabolismo do citrato. Portanto, se avaliou a capacidade de produção de gás através de meio caldo nutritivo suplementado com 5% de lactose, o que permitiu a identificação das BALs *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 como não produtora de gás neste teste. Similarmente, Killer et al. (2014) determinaram que um isolado de *Lb. rodentium* sp. nov. MYMRS/TLU1 mostrou incapacidade de produzir gás a partir da glicose, sugerindo uma nova cepa pertencente ao grupo dos Lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos (produziu apenas ácido l- láctico a partir da glicose e do gluconato). A produção de gás vem sendo estudada em BALs devido a sua potencial aplicação na indústria de alimentos, uma vez que podem ser usados como iniciadores produtores de sabor ou culturas que auxiliarem em vários produtos lácteos fermentados (Manteiga láctica, creme de leite cultivado) e tipos de queijos (Soetaert et al., 1995; Holland e Liu., 2011). Ademais, diversos estudos vêm descrevendo a

produção de gás da glicose produzidos por BALs (Cai et al., 1998; Killer et al., 2017).

No teste da avaliação da hidrólise da lisina foi possível determinar que os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 provenientes de leite de búfala, não apresentam a capacidade de descarboxilação da lisina em meio caldo lisina descarboxilase, porém foi um resultado não esperado neste estudo. De acordo com Corbo et al. (2001) a sobrevivência dos micro-organismos probióticos de *Bifidobacterium bifidum* Bb02 e *Bifidobacterium longum* Bb46 após 19 dias nos queijos canestrado pugliese de leite de ovelha, conferiu concentrações maiores para os aminoácidos ácido glutâmico, leucina, lisina valina, prolina e ácidos graxos butírico, capríco, cáprico e oleico. Sayadi et al. (2013) por exemplo, observaram que a reação da enzima (γ -glutamil) -lisina esta ligada em muitas proteínas e é usada para melhorar a textura e modificar as propriedades funcionais de alimentos preparados. Da mesma forma, Papadimitriou et al. (2016) estudou as bactérias ácido lácticas *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus* e *Lc. lactis* encontrando que as BALs modificam o metabolismo do piruvato às custas do ácido láctico e aumentou a síntese de compostos básicos, por exemplo: Lisina e diacetil/acetoina. Entretanto outros estudos demonstraram o contrário; Even et al. (2002) expressam que o estresse ácido causa acidificação intracelular, o que diminui a atividade das enzimas citoplasmáticas. Porém, é possível que os resultados obtidos em nosso estudo, onde a ausência da capacidade de descarboxilação da lisina por *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 destacaram estresse ácido influenciando os níveis de enzimas glicolíticas como da lisina.

Um dos critérios importantes na avaliação das bactérias ácido lácticas na indústria de alimentos é a temperatura (Utama et al., 2018), pois permite um desenvolvimento mais rápido e permite que o micro-organismo expresse o seu potencial máximo metabólico (Mandhania et al., 2019). Portanto, neste estudo observou-se que *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 em caldo MRS e meio de cultura ágar MRS apresentaram ausência de desenvolvimento em temperaturas de (5,5°C e 50°C). De acordo com Bromberg et al. (2006) o efeito da temperatura no desenvolvimento da cultura *Lc. lactis* spp. *hordniae* CTC 484 proveniente de frango, apresentou a 37 °C um desenvolvimento celular maior, atingindo uma densidade elevada após 18 h de incubação ($DO_{600}=0,654$), verificando-se que é uma temperatura favorável ao cultivo da bactéria ácido láctica. Da mesma forma, Hwang et al. (2018) relatam em seu estudo que as bactérias de ácido láctico *Lb. brevis*, *Pd. pentosaceus*,

Lb. plantarum, *Le. lactis*, *Lb. saki*, *Le. mesenteroides* e *Weissella confusa* isoladas de kimchi caseiro apresentaram conteúdos de arginina, citrulina e ornitina maior em meio MRS a 30°C. Ademais, diversos estudos descrevem a capacidade das BALs de crescer em meios de cultura ágar MRS e caldo MRS com temperaturas ótimas de crescimento à 30°C e 37°C (Xu et al., 2017; Gunduz et al., 2020; Kosmerl et al., 2021).

A tecnologia de preservação em alimentos combina diversos métodos de preservação inibitórios ao crescimento microbiano. As bacteriocinas podem agir contribuindo para a melhora da segurança do alimento. Neste estudo, avaliaram-se os efeitos das bacteriocinas Nisina e Pediocina sobre as bactérias ácido lácticas *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8. Os efeitos do tratamento apresentaram resultados satisfatórios em *Le. mesenteroides* LB10.4 + Pediocina e *Lc. lactis* L4A8 + Nisina. Segundo Gálvez et al. (2007) quando as células são expostas a combinação de fatores antimicrobianos, a intensidade de impactos na viabilidade celular pode levar a perda da manutenção de culturas desejáveis. O impacto de múltiplos danos celulares, pode requerer um alto gasto energético, resultando na exaustão de energia e morte celular. Porém, é possível que os resultados obtidos em nosso estudo, onde os isolados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 apresentaram uma redução no número de células viáveis, destacaram um gasto energético devido ao estresse das bacteriocinas adicionadas.

A atividade antimicrobiana produzidas pelas BALs *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8, foi avaliada através da metodologia da gota, para investigar sua atividade antimicrobiana frente a diferentes micro-organismos patogênicos. O sobrenadante livre de células do isolado *Le. mesenteroides* LB10.4 demonstrou atividade bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 apresentando um halo de inibição de 20 mm, o que já é bem estabelecido na literatura, especialmente *Le. mesenteroides*, que são capazes de reduzir significativamente o pH do produto, produzindo CO₂ e, portanto, inibindo o crescimento da microbiota não láctica ou deteriorante (Hutkins, 2019; Szutowska et al., 2020; Szutowska et al., 2020).

Em adição, o isolado *Lc. lactis* L4A8 após 48 h de incubação a 30 °C não apresentou atividade antimicrobiana. Além disso, nos também avaliamos os cultivos das co-culturas *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8, os sobrenadantes das co-culturas apresentaram atividade bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 apresentando um halo de inibição de 19 mm. De acordo com, Masuda et al. (2011) o sobrenadante da cultura de *Le. mesenteroides* TK41401 isolado de

picles japoneses, possuía atividade antimicrobiana contra ampla gama de gêneros bacterianos e atividade particularmente forte contra *Bacillus coagulans*, principal contaminante dos picles. Entretanto, este trabalho também foi capaz de demonstrar a atividade antimicrobiana produzida pela BAL.

A capacidade de tolerância das BALs em condições do trato gastrointestinal simulado é considerada essencial para a determinação de seu potencial probiótico. As BALs analisadas *Lc. lactis* L4A8 e *Le. mesenteroides* LB10.4 de forma individual e associadas, demonstraram manter sua viabilidade quando expostas às condições do TGI simuladas *in vitro*. No entanto, o isolado *Le. mesenteroides* LB10.4 demonstrou uma queda na viabilidade celular em cada etapa da simulação, diminuindo sua concentração logarítmica de 8.123 Log₁₀ para 5.582 Log₁₀ e 3.333 Log₁₀, respectivamente. Isso sugere que tal bactéria tolera menos o estresse causado por pH ácido e pela presença de sais biliares, do que o isolado *Lc. lactis* L4A8 e *Le. mesenteroides* LB10.4 em associação com *Lc. lactis* L4A8 testados. Em experimento similar, Ramalho et al. (2019) testaram a viabilidade celular *in vitro* de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LL95 e seu efeito no comportamento de camundongos, na avaliação da resistência do trato gástrico, foi possível observar que *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LL95 manteve sua viabilidade acima de 8,2 Log UFC/mL. Mesmo com uma redução de células viáveis durante a simulação *in vitro*, o isolado ainda pode ser capaz de atingir o intestino e promover efeitos benéficos se atingir uma densidade em torno de 6 Log UFC/mL. Seus resultados demonstraram resultados similares as BALs analisadas neste trabalho: *Lc. lactis* L4A8 e *Le. mesenteroides* LB10.4, variando de 8,337 Log₁₀ no início da simulação para 7.366 Log₁₀ após a exposição ao TGI. Iraporda et al. (2019) utilizando o protocolo realizado neste estudo, verificaram que os três isolados de BALs (*Lactobacillus paracasei*) proveniente de kefir também toleram as condições do trato gastrointestinal, mantendo 10⁸ UFC/mL após de exposição.

Diversas BALs são responsáveis por promover benefícios à saúde, para isso elas devem ser metabolicamente estáveis e ativas, além de sobreviver à passagem do trato gastrointestinal em maior número. A tecnologia de microencapsulação é considerada um dos métodos mais úteis para aumentar a estabilidade e viabilidade de probióticos em condições ambientais adversas (Qi et al., 2019). Portanto, é de extrema importância avaliar a eficiência de encapsulação das bactérias ácido lácticas.

Baseado nos resultados de TGI as BALs associadas foram selecionadas

para a etapa da avaliação da eficiência de encapsulação, como também, da manutenção das culturas lácticas microencapsuladas aplicadas em leite UHT e caldo MRS. Nossos estudos demonstram que a eficiência de encapsulação com os isolados associados de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 variou em leite UHT entre $79.01 \pm 3.332 \%$ e para caldo MRS 83.68 ± 14.821 . Resultados semelhantes realizados por Liao et al. (2019) utilizando alginato com galacto-oligossacarídeos, isomalto- oligossacarídeos, fruto- oligossacarídeos e xilo- oligossacarídeos, onde demonstraram que a eficiência da encapsulação de *Lb. fermentum* L7 nas células co-encapsuladas com oligossacarídeos estavam na faixa 79,52 até 89,75%, eram significativamente maiores do que as células encapsuladas com alginato sozinho. Portanto, as presenças destes dados nas BALs selecionadas neste estudo sugerem capsulas estáveis. A alta eficiência de encapsulação pode ser explicada pelo fato que na fase estacionária a cultura de células exibe melhor capacidade de sobrevivência do que a fase log (Ilha et al., 2015).

Ao estudar a eficiência de encapsulação, foi demonstrado que a manutenção das culturas lácticas associadas de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 microencapsuladas aplicadas em caldo MRS demonstraram uma menor liberação celular nos dias (0, 3, 7, 20 e 30), mantendo uma concentração de 3.808 Log_{10} e 3.837 Log_{10} , respectivamente. Isso sugere que as BALs associadas apresentaram variação na capacidade de liberação das células encapsuladas. No entanto, no dia 15 foi observada uma maior liberação das células alcançando uma concentração de 4.526 Log_{10} . Da mesma forma, Trabelsi et al. (2013) relataram que *Lb. plantarum* encapsulado com alginato de sódio sobreviveu por após de 60 dias, com uma perda de apenas 9,34 para 7 Log UFC/mL após de tratamento térmico a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Porém, é possível que os resultados obtidos em nosso estudo, onde os isolados associados *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 apresentaram uma menor liberação, possam sugerir uma liberação mais tardia das células. Quanto a manutenção das culturas lácticas associadas de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 microencapsuladas aplicadas em Leite Ultra-High-Temperature (UHT), pode-se observar uma maior liberação nos dias 15, 20 e 30, variando de 3.974 Log_{10} , 4.52 Log_{10} e 5.32 Log_{10} . Mahmoud et al. (2020) avaliaram a capacidade de sobrevivência de *Lb. plantarum* microencapsulado com alginato combinado com leite desnatado, dextrina, proteína desnaturada de soro de leite ou revestido com quitosana, curiosamente o armazenamento sob condições de refrigeração aumentou a viabilidade de *Lb.*

plantarum em todos os agentes encapsulantes testados por 4 semanas, o que é consistente com nossos achados neste estudo, sugerindo que as BALs selecionadas neste estudo foram armazenadas a uma temperatura de refrigeração 5,5 °C, por 72 horas favorecendo o crescimento bacteriano dos isolados viável em leite UHT.

Matejčková et al. (2016) mostraram a capacidade de sobrevivência das células encapsuladas durante o armazenamento refrigerado por um mês, a viabilidade do *Lb. plantarum* encapsulado aumentou ao longo do período de armazenamento. Isso pode ser devido ao fato de que *Lb. plantarum* foi capaz de crescer a 8 °C em leite UHT.

7 CONCLUSÃO

O leite de búfala apresenta-se como uma potencial fonte para isolar bactérias ácido lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas. Os dois isolados, *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 acabaram se destacando como micro-organismo inócuos.

Os diversos testes de atividades enzimáticas realizados nos dois isolados de BALs sendo um deles a atividade proteolítica, permite diferenciar sua atividade metabólica e funcional, o que constituiu um conhecimento valioso para a aplicação como novas culturas starters com propriedades tecnológicas. Estes dois isolados também demonstraram ser capazes de obter crescimento microbiano em ótimas temperaturas à 20 °C, 30 °C e 37 °C característica essencial para viabilidade celular em fermentações.

Os efeitos do tratamento das bacteriocinas apresentaram resultados moderados em *Le. mesenteroides* LB10.4 + Pediocina e *Lc. lactis* L4A8 + Nisina, sugerindo que cepas de BALs poderiam ser selecionadas para aplicação tecnológica, juntamente com as bacteriocinas.

Além disso, estes dois isolados em associações demonstraram ser capazes de tolerar as condições adversas do trato gastrointestinal, característica essencial para micro-organismos probióticos, porém outros testes precisam ser realizados. Ao mesmo tempo, culturas lácticas associadas de *Le. mesenteroides* LB10.4 e *Lc. lactis* L4A8 microencapsuladas, registrou uma liberação celular mais tardia, quando foram aplicadas em Leite Ultra-High-Temperature (UHT). Estes dados sugerem estudos em outras matrizes lácteas alimentares.

Considerando todos os resultados obtidos neste estudo, foi possível indicar que o isolado *Lc. lactis* L4A8 apresenta características favoráveis para indústria, mas ainda são necessários mais estudos *in vivo*, atendendo aos critérios para a proposição de novos isolados que tenham impacto tecnológico e funcional.

REFERÊNCIAS

- Abedi E, Hashemi S. 2020. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates. *Heliyon*. 6(2020):1-32.
- Abdou A, Hedia R, Omara S, Mahmoud M, Kandil M, Bakry M. 2018. Interspecies comparison of probiotics isolated from different animals. *Vet World*. 11:2231-0916.
- Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Król M, Varzakas T. 2020. Lactic Acid Bacteria as Antibacterial Agents to Extend the Shelf Life of Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: Quality and Safety Aspects. 8(952):1-24.
- Adem K, Bilge A, Aytaç Y, Zarife K, Ahmet D, Ergin Ç, Erdal I. 2017. Catheter Related *Leuconostoc Mesenteroides* Bacteremia: A Rare Case and Review of the Literature. *J pediatr*. 4(1):35-38.
- Alves P, Teixeira D, Diaz C. 2018. Antimicrobial activity of microorganisms isolated from kefir grains. *Cienc Anim Bras*. 19:1-8.
- Aprodu L, Milea S, Anghel R, Enachi E, Barbu V, Craciunescu O, Râpeanu G, Bahrim G, Oancea A, Stanciuc N. 2019. New Functional Ingredients Based on Microencapsulation of Aqueous Anthocyanin-Rich Extracts Derived from Black Rice (*Oryza sativa* L.). *Molecules*. 24(3389):1-14.
- Aquino S, Romero L, Fujikawa H, Simán E, Zuñiga B. 2019. Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria to Improve Shelf Life of Raw Meat. *Biocontrol Sci*. 24(4):185-192.
- Ashaolu S, Reale A. 2020. A Holistic Review on Euro-Asian Lactic Acid Bacteria Fermented Cereals and Vegetables. *Microorganisms*. 8(1176):1-24.
- Bartkiene E, Lele V, Ruzauskas M, Domig K, Starkute V, Zavistanaviciute P, Bartkevics V, Pugajeva I, Klupsaite D, Juodeikiene G, Mickiene R, Rocha J. 2020. Lactic Acid Bacteria Isolation from Spontaneous Sourdough and Their Characterization Including Antimicrobial and Antifungal Properties Evaluation. *Microorganisms*. 8(64):1-20.
- Bah A, Albano H, Barbosa J, Fhoula I, Gharbi Y, Najjari A, Boudabous A, Teixeira P, Ouzari H. 2019. Inhibitory Effect of *Lactobacillus plantarum* FL75 and *Leuconostoc mesenteroides* FL14 against Foodborne Pathogens in Artificially Contaminated Fermented Tomato Juices. *Biomed Res Int*. 10:1-11.
- Barache N, Ladjouzi R, Belguesmia Y, Bendali F, Drider D. 2020. Abundance of *Lactobacillus plantarum* Strains with Beneficial Attributes in Blackberries (*Rubus* sp.), Fresh Figs (*Ficus carica*), and Prickly Pears (*Opuntia ficus-indica*) Grown and Harvested in Algeria. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 12:1514-1523.
- Behera S, Ray R, Zdolec N. 2018. *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *Int J Biomed Res*. 2018:1-18.

- Bellil Y, Benmechernene Z, Bellil W, Kihal M. 2018. Antibacterial and antibiofilm activity of the bacteriocin-producing strain *Leuconostoc mesenteroides* CHBY46 isolated from Algerian dromedary milk against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *South Asian J Exp Biol.* 8(4):120-131.
- Benito M, Martin A, Aranda E, Nevado F, Moyano S, Córdoba M. 2007. Characterization and Selection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Iberian Dry-Fermented Salchichón and Chorizo Sausages. *J Food Sci.* 72(6):1-10.
- Berebon D, Ofokansi K, Attama A, Eze C, Onwusoba R, Ugwoke I. 2018. Preliminary studies on isolation, bile tolerance and antibiogram of potential probiotics (Probiotics) from locally fermented food products at beach market, nsukka metrópolis, Enuge State, Nigeria. *Br Biotechnol J.* 22(3):1-10.
- Bevilacqua A, Campaniello D, Speranza B, Racioppo A, Altieri C, Sinigaglia M, Corbo M. 2020. Microencapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* into Alginate Beads: A Focus on Functional Properties of Released Cells. *Foods.* 9(1051):1-13.
- Brandt M. 2019. Industrial production of sourdoughs for the baking branch—An overview. *Int J Food Microbiol.* 302:1-7.
- Breyer G, Arechavaleta N, Siqueira F, Motta A. 2020. Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stress. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 13(2):468-483.
- Bromberg R, Moreno I, Delboni R, Cintra H. 2006. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *Hordniae* ctc 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. *Ciênc tecnol aliment.* 26(1):135-144.
- Bungenstock L, Abdulmawjood A, Reich F. 2020. Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *PLoS One.* 15(3):1-15.
- Borges R, Cunha D, Barbosa F. 2019. Prospecção e avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de leite de búfala no estado de Amapá. *Rev Biol.* 19(2):1519-5228.
- Cai Y, Benno Y, Ogawa M, Ohmomo S, Kumai S, Nakase T. 1998. Influence of *Lactobacillus* spp. from an Inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from Forage Crops on Silage Fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 64(8):2982-2987.
- Calasso M, Minervini F, Filippis F, Ercolini D, Angelis M, Gobbetti M. 2020. Attenuated *Lactococcus lactis* and Surface Bacteria as Tools for Conditioning the Microbiota and Driving the Ripening of Semisoft Caciotta Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 86(5):1-18.
- Cano I, Mendoza D, Anaya J, Wang K, Kosmerl E, Flores R. 2019. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Appl microbiol biotechnol.* 103(13):5243-5257.

- Casas S, Gaime L, Pérez C. (2019). Evaluación de las características probióticas de bacterias ácido lácticas aisladas de ensilados de pulpa de café. *IDCyTA*. 4:133-141.
- Chang C, Nickerson M. 2018. Encapsulation of omega 3-6-9 fatty acids-rich oils using proteinbased emulsions with spray drying. *J Food Sci Technol*. 55(8):2850-2861.
- Characterization and Selection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Iberian Dry-Fermented Salchichón and Chorizo Sausages.
- Chiaro T, Round J. 2019. Fiber Puts *Lactobacillus* to SLEep. *Cell Host & Microbe*. 25:1-3.
- Chiva R, Lera L, Uña J, López A, Alcantud M, Horganero E, Veja S, Santos M, Velázquez E, Tamame M. 2021. Yeast Biodiversity in Fermented Doughs and Raw Cereal Matrices and the Study of Technological Traits of Selected Strains Isolated in Spain. *Microorganisms*. 9(47):1-43.
- Cicotello J, Wolf I, Angelo L, Guglielmotti D, Quiberoni A, Suárez V. 2018. Response of *Leuconostoc* strains against technological stress factors: Growth performance and volatile profiles. *Food Microbiol*. 73:362-370.
- Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskevicius A, Bartkiene E. 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*. 31:539-545.
- Clavel M, Pichon N. 2011. Les probiotiques dans la prévention des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. *Journal des Anti-infectieux*. 13:254-258.
- Cock L, Dorado M, Artunduaga D, Salazar A, González E, Aguilar C. 2019. Crude extracts of metabolites from co-cultures of lactic acid bacteria are highly antagonists of *Listeria monocytogenes*. *Heliyon*. 5:1-4.
- Colasso M, Minervini F, Filippis F, Ercolini D, Angelis M, Gobbetti M. 2020. Attenuated *Lactococcus lactis* and Surface Bacteria as Tools for Conditioning the Microbiota and Driving the Ripening of Semisoft Caciotta Cheese. *Appl Environ Microbiol*. 86(5):1-18.
- Colombo M, Nero L, Todorov S. 2020. Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. *Braz J Microbiol*. 51:787-795.
- Comasio A, Kerrebroeck S, Harth H, Verté F, Vuyst L. 2020. Potential of Bacteria from Alternative Fermented Foods as Starter Cultures for the Production of Wheat Sourdoughs. *Microorganisms*. 8(1530):1-23.
- Congreso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Diversidade de Bactérias Ácido Lácticas de Queijo de Coalho Artesanal da Região do Jaguaribe, Ce. 2016. Gramado\RS. Santos J, Bruno L. 2016 Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1059872/1/AAC16017.pdf>. Acesso em: 02 dic. 2019.

- Corbo M, Albenzio M, Angelis M, Sevi A, Gobbetti M. 2001. Microbiological and Biochemical Properties of CanestratoPugliese Hard Cheese Supplemented with Bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 84:551-561.
- Dahunsi A, Dahunsi S, Olayanju A. 2019. Synergistic microbial interactions between lactic acid bacteria and yeasts during production of Nigerian indigenous fermented foods and beverages. *Food Control.* 110:1-9.
- Dahunsi A, Jeyaram K, Sanni A. 2018. Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products. *Food Control.* 92:225-231.
- Danawati D, Mishra V, Shah N. 2016. Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review. *Food Sci Nutr.* 56(10):1-33.
- Demirbas F, Ispirli H, Kurnaz A, Yilmaz M, Dertli E. 2017. Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT – Food Sci Technol.* 79:361-366.
- Dongmo S, Sacher B, Kollmannsberger H, Becker T. 2017. Key volatile aroma compounds of lactic acid fermented malt based beverages – impact of lactic acid bacteria strains. *Food Chemistry.* 229:565-573.
- Duarte S, Monteiro G. 2021. Plasmid Replicons for the Production of Pharmaceutical-Grade pDNA, Proteins and Antigens by *Lactococcus lactis* Cell Factories. *Int. J. Mol. Sci.* 22(1379):1-30.
- Du C, Deng T, Zhou Y, Ye T, Zhou Z, Zhang S, Shao B, Wei P, Sun H, Khan F, Yang L, Hua G. 2019. Systematic analyses for candidate genes of milk production traits in water buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Anim Genet.* 50:207-216.
- Edalati E, Saneei B, Alizadeh M, Hosseini S, Bialvaei A, Taheri K. 2019. Isolation of probiotic bacteria from raw camel's milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning. *New Microbe and New Infect.* 27:64-68.
- Estrada O, Carvajal A, Rubio P, González I, Fuentes L, Bautista N, Guevara J. 2017. Caracterización e identificación de bal procedentes de gallos pluma de león y perdicesredvet. *Rev Electrón Vet.* 18(2):1-12.
- Even S, Lindley N, Loubiere P, Bousquet M. 2002. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. *MOL MICROBIOL.* 45(4):1143-1152.
- Fang X, Duan Q, Wang Z, Li F, Du J, Ke W, Liu D, Beier R, Guo X, Zhang Y. 2020. Products of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Strain F17 and *Leuconostoc lactis* Strain H52 Are Biopreservatives for Improving Postharvest Quality of 'Red Globe' Grapes. *Microorganisms.* 8(656):1-16.
- FAO/OMS - Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial Saúde. Documento de debate sobre las directrices armonizadas sobre el uso de probióticos en alimentos y complementos alimenticios. 2018. Berlín, Alemania. Disponível em: <file:///E:/Artigos/FAO-OMS%202018.pdf>

- Figuroa J, Rodríguez A, Lucero A, Tejada A. 2017. Avances en el estudio de la bioactividad multifuncional del kéfir. *Interciencia*. 42(6):347-354.
- Frantzen C, Kleppen H, Holo H. 2018. *Lactococcus lactis* Diversity in Undefined Mixed Dairy Starter Cultures as Revealed by Comparative Genome Analyses and Targeted Amplicon Sequencing of *epsD*. *Appl Environ Microbiol*. 84(3):1-15.
- Franz C, Muscholl A, Yousif N, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel W, Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol*. 67:4385-4389.
- Flores F, Kong F. 2017. In Vitro Release Kinetics of Microencapsulated Materials and the Effect of the Food Matrix. *Rev Food Sci Technol*. 8:1-25.
- Fusieger A, Martins M, Freitas R, Nero L, Carvalho A. 2020. Technological properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* obtained from dairy and non-dairy niches. *Braz J Microbiol*. 51:313-321.
- Gálvez A, Abriouel H, López R, Omar N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*. 120:51-70.
- Ganzle M, Zheng J. 2019. Lifestyles of sourdough lactobacilli—Do they matter for microbial ecology and bread quality?. *Int J Food Microbiol*. 302:1-9.
- Gaucher F, Kponouglo K, Rabah H, Bonnassie S, Ossemond J, Pottier S, Jardin J, Bion V, Marchand P, Blanc P, Jeantet R, Jan G. 2019. *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 Osmoadaptation coupled to acid-adaptation increases its viability during freeze-drying. *Front Microbiol*. 10:(2324):10-15.
- Gaudu P, Yamamoto Y, Jensen P, Hammer K, Lechardeur D, Gruss A. 2019. Genetics of Lactococci. *Microbiol Spectr*. 7(4):1-2.
- Garruchaga H, Burgo S, Hernandez M, Orive G, Selden C, Fuller B, Ciriza J, Pedraz J. 2018. Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. *J Control Release*. 281:119-138.
- Giazi A. 2017. Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo minas artesanais e leite cru. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina.
- Giménez V, Llanes G. 2019. *Leuconostoc mesenteroides* bacteremia, a rare cause of septic shock. *Rev Virtual Soc Parag Med Int*. 6(1):128-133.
- Gobbi F, Barbosa L, Tissianel A, Freitas A, Lepaus B, Cunha L, Costa T, Prandi B, Pauw E, Corral E, Quinton L. 2019. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food Chemistry*. 282:109-119.
- Gómez M, García J, Matus V, Quintana I, Bolívar F, Escalante A. 2016. In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *Springerplus*. 5(708):1-10.

- Grazia S, Sumayyah S, Haiti F, Sahlan M, Heng N, Malik A. 2017. Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) activity of *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 and its synergistic action in combination with antibiotics. *Asian Pac J Trop Med.* 10(12):1440-1145.
- Gunduz G, Gaglio R, Franciosi E, Settanni L, Erten H. 2020. Molecular analysis of the dominant lactic acid bacteria of chickpea liquid starters and doughs and propagation of chickpea sourdoughs with selected *Weissella confusa*. *Food Microbiol.* 91:1-13.
- Hankin L, Anagnostakis L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia.* 597-607p.
- Hemme D, Foucaud-Scheunemann C. 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int Dairy J.* 14:467-494.
- Heredia P, Hernández A, Gonzáles A, Vallejo B. 2017. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia.* 42(6):340-346.
- Hernández J, Frizzo L, Fernández J, Valdez G, Zbrun M, Herrera I. 2019. *In vitro* evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus acidophilus* SS80 and *Streptococcus thermophilus* SS77. *Revista de salud animal.* 41(1): 2224-4700.
- Higdon S, Huang B, Bennett A, Weimer B. 2020. Identification of Nitrogen Fixation Genes in *Lactococcus* Isolated from Maize Using Population Genomics and Machine Learning. *Microorganisms.* 8(2043):1-26.
- Hifzulrahman H, Abdullah M, Akhtar M, Pasha T, Bhatti J, Ali Z, Saadullah M, Haque M. 2019. Comparison of oil and fat supplementation on lactation performance of Nili Ravi buffaloes. *J Dairy Sci.* 102:3000-3009.
- Holland R, Liu S. 2011. Lactic acid bacteria *Leuconostoc* spp. *Journals & Books.* 138-142.
- Hutkins R. *Microbiología e tecnología de alimentos fermentados.* 2. Nova York: Wiley; 2019.
- Hwang H, Lee J. 2018. Characterization of Arginine Catabolism by Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi. *Molecules.* 23(3049):1-12.
- Ilha E, Silva T, Lorenz J, Rocha G, Anna E. 2015. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *Eur Food Res Technol.* 240:977-984.
- Instituto tecnológico de buenos aires. Mejora de la producción de leche bubalina en el tambo el alba. Buenos Aires; 2017. Disponible em: <https://ri.itba.edu.ar/bitstream/handle/123456789/1211/Muzarella%20Buifala.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acceso em: 26 Agos. 2019.
- Iraporda C, Rubel I, Manrique G, Abraham A. 2019. Influence of inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers on

- probiotic properties of *Lactobacillus* strains. LWT – Food Sci Technol. 101:738-746.
- 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. Tech. 101: 738-46.
- Jawan R, Abbasilliasi S, Tan J, Mustafa S, Halim M, Ariff A. 2020. Influência das condições de cultura e composições de meio na produção de substâncias inibidoras semelhantes à bacteriocina por *Lactococcus lactis* Gh1. Microorganisms. 8(10):1454.
- Ji X, Xu W, Cui J, Ma Y, Zhou S. 2019. Goat and buffalo milk fat globule membranes exhibit better effects at inducing apoptosis and reduction the viability of HT-29 cells. Sci Rep. 9(2577):1-14.
- Jofré L, Sakurada A, Ulloa T, Hormazábal J, Godoy V, Fernández J, Gutiérrez M, Pilar M, Castillo M, Canales A. 2006. *Leuconostoc* infections in patients with short gut syndrome, parenteral nutrition and continuous enteral feeding. Rev chilena infectol. 23(4):340-345.
- Johanson A, Goel A, Olsson L, Franzén C. 2020. Respiratory Physiology of *Lactococcus lactis* in Chemostat Cultures and Its Effect on Cellular Robustness in Frozen and Freeze-Dried Starter Cultures. Appl Environ Microbiol. 86(6):1-15.
- Junsheng L, Jin B, Shuyi L, Zhenzhou Z, Yang Y, Hongxun W, Olusola L. 2020. Effect of lactic acid bacteria on the postharvest properties of fresh lotus root. Postharvest Biol Technol. 160:1-8.
- Juturu V, Wu J. 2018. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. Biotechnol Adv. 36:2187-2200.
- Kaktcham P, Temgoua J, Zambou F, Ruiz G, Wachter C, Chabela M. 2017. In Vitro Evaluation of the Probiotic and Safety Properties of Bacteriocinogenic and Non-Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria from the Intestines of Nile Tilapia and Common Carp for Their Use as Probiotics in Aquaculture. Probiotics Antimicrob Proteins. 10:98-109.
- Kandasamy S, Kavitate D, Halady P. 2018. Lactic Acid Bacteria and Yeasts as Starter Cultures for Fermented Foods and Their Role in Commercialization of Fermented Foods. 25-52 p.
- Khan I, Nadeem M, Imran M, Ullah R, Ajmal M, Jaspal M. 2019. Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. Lipids Health Dis. 18(41):1-13.
- Katz M, Medina R, Gonzales S, Oliver G. 2002. Esterolytic and Lipolytic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Ewe's Milk and Cheese. J Food Prot. 65(12):1997-2001.

- Kauer M, Singh H, Jangra M, Kauer L, Jaswal P, Dureja C, Nandanwar H, Chaudhuri S, Raje M, Mishra S, Pinnaka A. 2017. Lactic acid bacteria isolated from yak milk show probiotic potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101:7635-7652.
- Kelleher P, Mahony J, Bottacini F, Luigli G, Ventura M, Sinderen D. 2019. The *Lactococcus lactis* Pan-Plasmidome. *Front Microbiol.* 10(707):1-20.
- Killer J, Havlík J, Vlkova E, Rada V, Pechar R, Benada O, Kopečný J, Kofronova O, Sechovcová H. 2014. *Lactobacillus rodentium* sp. nov., from the digestive tract of wild rodents. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64:1526-1533.
- Killer J, Pechar R, Svec P, Salmonová H, Svejstl R, Geigerová M, Rada V, Vlková E, Mekadim C. 2017. *Lactobacillus caviae* sp. nov., an obligately heterofermentative bacterium isolated from the oral cavity of a guinea pig (*Cavia aperea* f. *porcellus*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 67:2903-2909.
- Kim S, Becattini S, Moody T, Shliaha P, Littmann E, Seok R, Gjonbalaj M, Eaton V, Fontana E, Amoretti L, Wright R, Caballero S, Wang Z, Jung H, Morjaria S, Leiner I, Qin W, Ramos R, Cross J, Narushima S, Honda K, Peled J, Hendrickson R, Taur Y, Brink M, Pamer E. 2020. Microbiota-derived lantibiotic restores resistance against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Nature.* 572(7771):665-669.
- Kok J, Gijtenbeek L, Jong A, Meulen S, Solopova A, Kuipers O. 2017. The Evolution of gene regulation research in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Ver.* 41(2017):220-2243.
- Konig H, Frohlich J. 2017. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. 1-521 p.
- Kosmerl E, Mendoza D, Anaya J, Flores R, Cano I. 2021. Improving Human Health with Milk Fat Globule Membrane, Lactic Acid Bacteria, and Bifidobacteria. *Microorganisms.* 9(341):1-22.
- Kumariya R, Garsa A, Rajput Y, Sood S, Akhtar N, Patel S. 2019. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microb Pathog.* 128:171-177.
- Landa P, Caballero Y, Ramírez E, Hernández A, Ramírez L, Espinosa D, Hernández D. 2019. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico para becerros del altiplano mexicano. *Rev Mex de Cienc Pecuarias.* 10(1):68-83.
- Landis E, Oliverio A, McKenney E, Nichols L, Kfoury N, Daniels M, Shell L, Madden A, Shapiro L, Sakunala S, Drake K, Robbat A, Booker M, Dunn R, Fierer N, Wolfe B. 2021. The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *eLife.* 16(1644):1-24.
- Laroute V, Tormo H, Couderc C, Bonin M, Bourgeois P, Bousquet M, Mingot M. 2017. From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms.* 5(27):1-17.

- Li S, Tang S, He Q, Hu J, Zheng J. 2020. In vitro antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk with different culture combinations. *J. Dairy Sci.* 103(2):1-11.
- Li S, Tang S, He Q, Hu J, Zheng J. 2019. Changes in Proteolysis in Fermented Milk Produced by *Streptococcus thermophilus* in Co-Culture with *Lactobacillus plantarum* or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* During Refrigerated Storage. *Molecules.* 24(3699):1-13.
- Liao N, Luo B, Gao J, Li X, Zhao Z, Zhang Y, Ni Y, Tian F. 2019. Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnol Let.* 41:263-272.
- Limón C, Hernández C, Cerda B. 2019. Aislamiento, Caracterización y Evaluación Antimicrobiana de Bacterias a partir de Leche de Cabra. *IDCyTA* 4:142-146.
- Lopes M, Stanton C, Ross P, Dapkevicius M, Silva C. 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiol.* 63:178-190.
- López S, Carrillo T, Malo A. 2008. Efecto de agentes reductores en la propagación de *Lactobacillus casei* en leche. *TSIA.* 2(2):79-86.
- Ma T, Lu J, Zhu J, Li X, Gu H, López M, Wu X, Luo S, Zhao Y, Jiang S, Mu D. 2019. The Secretion of *Streptomyces monbaraensis* Transglutaminase From *Lactococcus lactis* and Immobilization on Porous Magnetic Nanoparticles. *Front Microbiol.* 10(1675):1-13.
- Mahmoud M, Abdallah N, Shafei K, Tawfik N, Sayed H. 2020. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon.* 6:1-14.
- Malaczewska J, Lukowska E. 2021. Nisin—A lantibiotic with immunomodulatory properties: A review. *Peptides.* 137:1-18.
- Mandhania M, Paul D, Suryavanshi M, Sharma L, Chowdhury S, Diwanay S, Diwanay S, Shouche Y, Patole M. 2019. Diversity and Succession of Microbiota during Fermentation of the Traditional Indian Food Idli. *Appl Environ Microbiol.* 85(13):1-19.
- Martins A, Ramos H, Lopes N. 2019. Uso do probiótico na prevenção da diarreia associada a antibiótico em pacientes hospitalizados: uma revisão não sistemática. *Braspen Journal.* 34(1):100-108.
- Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* 16: 189-99.
- Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, Milici AJ, Medina I, Gootz TD. 2007. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 59-65.

- Matejčková Z, Liptáková D, Spodniaková S, Valik E. 2016. Characterization of the growth of *Lactobacillus plantarum* in milk in dependence on temperature. *Acta Chimica Slovaca*. 9(2):104-108.
- Maruyama C, José N, Lima R, Fraceto L. 2020. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* Preserves Enzymatic Activity and Enhances the Potential for Biological Control. *Front Bioeng Biotechnol*. 8(225):1-14.
- Mastrigt O, Egas R, Abee T, Smid E. 2019. Aromaformation in retentostato co-cultures of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Food Microbiol*. 82:151-159.
- Mastrigt O, Tejeda D, Kristensen M, Abbe T, Smid E. 2018. Aroma formation during cheese ripening is best resembled by *Lactococcus lactis* retentostat cultures. *Microb Cell Fact*. 17(104):2-8.
- Masuda Y, Ono H, Kitagawa H, Ito H, Mu F, Sawa N, Zendo T, Sonomoto K. 2011. Identification and Characterization of Leucocyclicin Q, a Novel Cyclic Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. *Appl Environ Microbiol*. 77(22):8164-8170.
- Mataragas M. 2020. Investigation of genomic characteristics and carbohydrates' metabolic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during ripening of a Swiss-type cheese. *Food Microbiol*. 87(2020):1-12.
- Matejčková Z, Liptáková D, Spodniaková S, Valik L. 2016. Characterization of the growth of *Lactobacillus plantarum* in milk in dependence on temperature. *Acta Chim Slovaca*. 9:104-108.
- McAuliffe O. 2018. Symposium review: *Lactococcus lactis* from nondairy sources: Their genetic and metabolic diversity and potential applications in cheese. *J. Dairy Sci*. 101:3597-3610.
- Miles AA, Misra SS, Irwin JO. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*. 38(6):732-49.
- Mokoena M. 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*. 22(8):1-21.
- Mörschbacher A, Dullius A, Henrique C, Bandt C, Kuhn D, Brietzke D, Malmann F, Pretto H, Altmayer T, Gonçalves T, Schweizer Y, Oreste T, Ribeiro A, Lehn D, Volken C, Hoehne L. 2018. Assessment of selenium bioaccumulation in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*. 101(12):10626-10635.
- Narihiro T, Suzuki A, Yoshimune K, Hori T, Hoshino T, Yumoto I, Yokota A, Kimura N, Kamagata. 2014. The Combination of Functional Metagenomics and an Oil-Fed Enrichment Strategy Revealed the Phylogenetic Diversity of Lipolytic Bacteria Overlooked by the Cultivation-Based Method. *Microbes Environ*. 29(2):154-161.
- Ouiddir M, Bettache G, Salas M, Pawtowski A, Donot C, Brahimi S, Mabrouk K, Goton E, Mounier J. 2019. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal

- bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food Microbiol.* 82(2019):160-170.
- Oliveira B, Mello F, Pereira G, Soccol V, Rakshit S, Carvalho J, Soccol C. 2019. In Vitro Probiotic Properties and DNA Protection Activity of Yeast and Lactic Acid Bacteria Isolated from A Honey-Based Kefir Beverage. *Foods.* 8(485):1-12.
- Ozel B, Simsek O, Akcelik M, Saris P. 2018. Innovative approaches to nisin production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102:6299-6307.
- Paitán E, Santos R, Sotelo A, Zúñiga D, Vílchez C. 2019. Molecular characterization of bacteria with probiotic potential isolated from stool of human neonates. *Rev Peru biol.* 26(1):119-130.
- Palla M, Agnolucci M, Calzone A, Giovannetti M, Cagno R, Gobbetti M, Rizzello C, Pontonio E. 2019. Exploitation of autochthonous Tuscan sourdough yeasts as potential starters. *Int J Food Microbiol.* 302:59-68.
- Palla M, Blandino M, Grassi A, Giordano D, Sgherri C, Quartacci M, Reyneri A, Agnolucci M, Giovannetti M. 2020. Characterization and selection of functional yeast strains during sourdough fermentation of different cereal wholegrain flours. *Scientific Reports.* 10(12856):1-15.
- Papadimitriou K, Alegria A, Bron P, Angelis M, Gobbetti M, Kleerebezem M, Lemos J, Linares D, Ross P, Stanton C, Turrone F, Sinderen D, Varmanen P, Ventura M, Zúñiga M, Tsakalidou E, Kok J. 2016. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Ver.* 80(3):837-890.
- Pardini M, Sousa J, Pereira P, Prado J. 2019. Phylogenetic distribution of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese. *Food Res Int.* 128:1-11.
- Parra R. 2010. Review Lactic Acid Bacteria: Functional Role In The Foods. *Acta Agron.* 8(1):94-105.
- Pedroza C, Romero M, Orduz S. 2017. Lipolytic Activity of Microorganisms Isolated From Waste Waters Contaminated With Fats. *Rev Bio Agro.* 15(1):36-44.
- Petrova P, Petrov K. 2020. Lactic Acid Fermentation of Cereals and Pseudocereals: Ancient Nutritional Biotechnologies with Modern Applications. *Nutrients.* 12(1118):1-26.
- Pino A, Liotta L, Randazzo C, Todaro A, Mazzaglia A, Ardo F, Chiofalo V, Caggia C. 2018. Polyphasic approach to study physico-chemical, microbiological and sensorial characteristics of artisanal Nicastrese goat's cheese. *Food Microbiol.* 70:143-154.
- Pujato S, Guglielmotti D, García M, Quiberoni A, Mojica F. 2017. *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* bacteriophages: Genomics and cross-species host ranges. *Int J Food Microbiol.* 257:128-137.

- Qi W, Liang X, Yun T, Guo W. 2019. Growth and survival of microencapsulated probiotics prepared by emulsion and internal gelation. *J Food Sci Technol.* 56(3):1398-1404.
- Ramalho J, Soares M, Spiazzi C, Bicca D, Soares V, Pereira J, Silva W, Sehn C, Cibin F. 2019. In Vitro Probiotic and Antioxidant Potential of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL95 and Its Effect in Mice Behaviour. *Nutrients.* 11(901):1-17.
- Ramirez C, Vélez J. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Inf Tecnol.* 27(6):115-128.
- Raveschot C, Cudennec B, Deracinois B, Frémont M, Vaeremans M, Dugersuren J, Demberel S, Drider D, Dhulster P, Coutte F, Flahaut C. 2020. Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from Mongolian traditional dairy products: A multiparametric analysis. *Food Chem.* 304:1-9.
- Rio B, Redruello B, Fernandez M, Cruz M, Ladero V, Alvarez M. 2019. Lactic acid bacteria as a live delivery system for the *in situ* production of nanobodies in the human gastrointestinal tract. *Front microbiol.* 9:1-16.
- Romero I, Hernandez M, Gaitan I, Escribano M, Merodio C, Ballesta M. 2020. Table Grapes during Postharvest Storage: A Review of the Mechanisms Implicated in the Beneficial Effects of Treatments Applied for Quality Retention. *Int. J. Mol. Sci.* 21(9320):1-19.
- Rovinaru C, Pasarin D. 2020. Application of Microencapsulated Synbiotics in Fruit-Based Beverages. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 12:764-773.
- Rubak Y, Nuraida L, Iswantini D, Prangdimurti E. 2020. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in milk fermented by indigenous lactic acid bacteria. *Vet World.* 13(2):345-353.
- Salazar J, Hernández F, Sifuentes A, Arellano W, Lara G, Pacheco V. 2018. Isolation and molecular identification of microorganisms associated with the tempequistle fruit (*Sideroxylon palmeri*). *RIIIT.* 6(31):1-8.
- Samelis J, Kakouri A. 2018. Hurdle factors minimizing growth of *Listeria monocytogenes* while counteracting in situ antilisterial effects of a novel nisin A-producing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* costarter in thermized cheese milks. *Microbiology.* 4(1):19-41.
- Sayadi A, Madadlou A, Khosrowshahi A. 2013. Enzymatic cross-linking of whey proteins in low fat Iranian white cheese. *Int Dairy J.* 29:88-92.
- Seixas F, Rios E, Oliveira A, Beloti V, Poveda J. 2018. Selection of *Leuconostoc* strains isolated from artisanal Serrano Catarinense cheese for use as adjuncts in cheese manufacture. *J Sci Food Agric.* 98:3899-3906.
- Serra M, Garneró J, Nicolau V, Andreatta A. 2018. Assessment of natural vegetal extracts in the inhibition of *Leuconostoc mesenteroides* MS1. *AgriScientia.* 35: 51-62.

- Serrano G, Garibay M, Guerrero A, Ruiz L, Niño A, Ovando A, Olivares L. 2018. Proteolytic System of *Streptococcus thermophilus*. J Microbiol Biotechnol. 28(10):1581-1588.
- Sharma A, Kaur J, Lee S, Park Y. 2018. Genetic diversity analysis of *Leuconostoc mesenteroides* from Korean vegetables and food products by multilocus sequence typing. Appl Microbiol Biotechnol. 102:4853-4861.
- Sharma A, Lee S, Park Y. 2020. Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. Food Sci Biotechnol. 29(10):1301-1318.
- Shi S, Qi Z, Jiang W, Quan S, Sheng T, Tu J, Shao Y, Qi K. 2019. Effects of probiotics on cecal microbiome profile altered by duck *Escherichia coli* 17 infection in Cherry Valley ducks. Microb Pathog. 138:1-8.
- Sidek N, Halim M, Tan J, Abbasiliasi S, Mustafa S, Ariff A. 2018. Stability of Bacteriocin-Like Inhibitory Substance (BLIS) Produced by *Pediococcus acidilactici* kp10 at Different Extreme Conditions. BioMed Res Int. 2018:1-11.
- Silva C, Silva S, Ribeiro S. 2018. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. Front Microbiol. 9(594):1-15.
- Singh M, Sharma D, Chauhan R, Goel G. 2019. Skimmed Milk-Based Encapsulation for Enhanced Stability and Viability of *Lactobacillus gastricus* BTM 7 Under Simulated Gastrointestinal Conditions. Probiotics & Antimicro. Prot. 11:850-856.
- Singh V. 2018. Recent approaches in food bio-preservation - a review. Open Vet J. 8(1):104-111.
- Siroli L, Camprini L, Pisano M, Patrignani F, Lanciotti R. 2019. Volatile molecule profiles and anti-*Listeria monocytogenes* activity of nisin producers *Lactococcus lactis* strains in vegetable drinks. Front Microbiol. 10(563):1-16.
- Soetaert W, Schwengers D, Buchholz K, Vandamme E. 1995. A wide range of carbohydrate modifications by a single micro-organism" *Leuconostoc mesenteroides*. Carbohydrate bioengineering. 351-358.
- Song A, In L, Lim S, Rahim R. 2017. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. Microb Cell Fact. 16(55):1-15.
- Souza E, Oliveira P, Domínguez J, Attilio C, Pinheiro R. 2017. Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. CYTA J food. 15(4):525-530.
- Sousa S, Gomes AM, Pintado MM, Malcata FX, Silva JP, Sousa JM, Costa P, Amaral MH, Rodrigues D, Rocha-Santos TAP, Freitas AC. 2012. Encapsulation of probiotic strains in plain or cysteine-supplemented alginate improves viability at storage below freezing temperatures. Eng. Life Sci. 12(4):457-65.
- Souza BMS, Borgonovi TF, Casarotti SN, Todorov SD, Penna ALB. 2019. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella

- Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 11: 38296.
- Stevanovic Z, Sieniawska E, Glowniak K, Obradovic N, Lijakovic I. 2020. Natural Macromolecules as Carriers for Essential Oils: From Extraction to Biomedical Application. *Front Bioeng Biotechnol.* 8(563):1-24.
- Surzenko N, Pjetri E, Munson C, Friday W, Hauser J, Mitchell E. 2020. Prenatal exposure to the probiotic *Lactococcus lactis* decreases anxiety-like behavior and modulates cortical cytoarchitecture in a sex specific manner. *PLoS One.* 15(7):1-15.
- Szutowska J, Gwiazdowska D. 2020. Probiotic potential of lactic acid bacteria obtained from fermented curly kale juice. *Arch Microbiol.* 203:975-988.
- Szutowska J, Rybicka I, Lemńska K, Gwiazdowska D. 2020. Spontaneously fermented curly kale juice: Microbiological quality, nutritional composition, antioxidante, and antimicrobial properties. *J Food Sci.* 85(4):1-8.
- Taniguchi M, Takao Y, Kawasaki H, Yamada T, Fukusaki E. 2020. Profiling of taste-related compounds during the fermentation of Japanese sakebrewed with or without a traditional seed mash (kimoto). *J Biosci Bioeng.* 130(1):63-70.
- Terpou A, Bosnea L, Kanellaki M, Plessas S, Bekatorou A, Bezirtzoglou E, Koutinas A. 2018. Growth capacity of a novel potential probiotic *Lactobacillus paracasei* k5 strain incorporated in industrial white brined cheese as an adjunct culture. *J Food Sci.* 83(3):1-10.
- Terpou A, Mantzourani I, Galanis A, Kanellaki M, Bezirtzoglou E, Bekatorou A, Koutinas A, Plessas S. 2019. Employment of *L. paracasei* K5 as a Novel Potentially Probiotic Freeze-Dried Starter for Feta-Type Cheese Production. *Microorganisms.* 7(3):1-17.
- Todorov SD, Franco BDGM. 2018. In vitro study of some safety and beneficial properties of bacteriocinogenic *lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK02R. *Chem. Eng. Trans.* 64: 133-38.
- Torban A, Paitan Y, Arielly H, Kondratyeva K, Levy S, Sutton G, Venezia S, Steinman A. 2019. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Hospitalized Neonatal Foals: Prevalence, Risk Factors for Shedding and Association with Infection. *Animals.* 9(600):1-13.
- Tholpady S, Sifri C, Sawyer R, Hazen K, Pruett T, Bonatti H. 2010. *Leuconostoc pseudomesenteroides* blood stream infection following liver transplantation. *Ann Transplant.* 15(1):61-66.
- Trabelsi I, Bejar W, Ayadi D, Chouayekh H, Kammoun R, Bejar S, Salah R. 2013. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *INT J BIOL MACROMOL.* 61:36-42.

- Treguier S, Couderc C, Tormo H, Kleiber D, Garcia C. 2019. Identification of lactic acid bacteria *Enterococcus* and *Lactococcus* by nearinfrared spectroscopy and multivariate classification. *J Microbiol Methods*. 165:1-8.
- Utama D, Park J, Kim D, Kim E, Lee S, 2018. Effect of Ground Chopi (*Zanthoxylum piperitum*) on Physicochemical Traits and Microbial Community of Chicken Summer Sausage during Manufacture. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 38(5):936-949.
- Vaniski R, Corti D, Drunkler D. 2017. Técnicas e materiais empregados na microencapsulação de probióticos. *Rebrapa*. 8(1):156-184.
- Vedovatto E, Steffens C, Cansian R, Backes G, Verlindo R. 2019. Evaluation of different starters cultures in the obtation of italian-type sausage. *Cienc. anim. Bras*. 20:1-24.
- Venema K, Surono I. 2018. Microbiota composition of dadih – a traditional fermented buffalo milk of West Sumatra. *Lett Appl Microbiol*. 68:234-240.
- Vinusha K, Deepika K, Johnson T, Agrawal G, Rakwal R. 2018. Proteomic studies on lactic acid bacteria: A review. *Biochem Biophys Rep*. 14:140-148.
- Vitetta L, Saltzman E, Thomsen M, Nikov T, Hall S. 2017. Adjuvant Probiotics and the Intestinal Microbiome: Enhancing Vaccines and Immunotherapy Outcomes. *Vaccines*. 5(50):1-17.
- Voidarou C, Antoniadou M, Rozos G, Tzora A, Skoufos I, Varzakas T, Lagiou A, Bezirtzoglou E. 2021. Fermentative Foods: Microbiology, Biochemistry, Potential Human Health Benefits and Public Health Issues. *Foods*. 10(69):1-27.
- Wang D, Zhao L, Su R, Jin Y. 2019. Effects of different starter culture combinations on microbial counts and physico-chemical properties in dry fermented mutton sausages. *Food Sci Nutr*. 7:1-12.
- Wang G, Pu J, Yu X, Xia Y, Ai L. 2020. Influence of freezing temperatura before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *J Dairy Sci*. 103(4):3066-3075.
- Ward L, Brown J, Davey G. 1994. Application of the ligase chain reaction to the detection of nisinA and nisinZ genes in *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*. *Microbiology*. 117:29-34.
- Wels M, Siezen R, Hijum S, Kelly W, Bachmann H. 2019. Comparative Genome Analysis of *Lactococcus lactis* Indicates Niche Adaptation and Resolves Genotype/Phenotype Disparity. *Front Microbiol*. 10(4):1-18.
- Winters M, Panayotides D, Bayrak M, Remont G, Viejo C, Liu D, Le B, Liu Y, Luo J, Zhang P, Howell K. 2019. Defined co-cultures of yeast and bacteria modify the aroma, crumb and sensory properties of bread. *J Appl Microbiol*. 127:778-793.

- Xavier J, Madhan M, Natarajan G, Ramana K, Semwal A. 2019. Optimized production of poly (γ -glutamic acid) (γ -PGA) using *Bacillus licheniformis* and its application as cryoprotectant for probiotics. *Biotechnol Appl Biochem*. 00(0):1-11.
- Xu Z, He H, Zhang S, Kong J. 2017. Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage. *Scientific Reports*. 7(13614):1-9.

ANEXO

Artigo produzido a partir deste trabalho e o mesmo será traduzido e submetido a revista “International Journal of DairyTechnology”, após as considerações da Banca Avaliadora.

Titulo:

POTENCIAL FUNCIONAL DE *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 ISOLADOS DE LEITE DE BÚFALA

Carlos Augusto Almeida Badillo¹ and Amanda Souza Motta¹

¹Institute of Health Science, Microbiology, Immunology and Parasitology Department, 222/500 Sarmiento Leite Street, 90050-170, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

ORCID Amanda de Souza da Motta: <https://orcid.org/0000-0001-8637-3868>

Resumo

O crescente interesse por alimentos funcionais faz com que estudos explorem novas linhagens de bactérias para aplicação em alimentos. Neste contexto, este trabalho objetivou estudar os isolados *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 isolados do leite de búfala, quanto as suas propriedades tecnológicas e funcionais. Os isolados foram avaliados quanto a sua inocuidade, produção de atividade antimicrobiana, propriedades tecnológicas, tolerância em condições do trato gastrointestinal, avaliação da eficiência de microencapsulação e manutenção das culturas microencapsuladas em matriz alimentar. As culturas apresentaram-se inócuas nas condições estudadas. *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 apresentou resultado mais tardio da atividade proteolítica-acidificante em Litmus Milk em comparação à *Lactococcus lactis* L4A8. Em ágar leite, ambas apresentaram atividade proteolítica. Não foi detectada atividade lipolítica, produção de gás e hidrólise da lisina. Os isolados demonstraram ser capazes de obter crescimento microbiano em temperaturas de 20, 30 e 37°C. *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 apresentou efeito bacteriostático frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Também, sofreram efeitos moderados das bacteriocinas Nisina e Pediocina. Em associação, os isolados apresentaram tolerância adversa ao trato gastrointestinal e viabilidade na liberação das células microencapsuladas aplicadas em Leite UHT. Os resultados mostraram-se promissores a estudos em outras matrizes alimentares, bem como ensaios com modelo *in vivo* podem ser explorados.

Palavras-chave: alimentos funcionais, bactérias lácticas, leite de búfala, probióticos