



**RENORBIO**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Avaliação do potencial probiótico e tecnológico de  
bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho**

**Cristiane Pereira de Lima**

**Recife – PE**

**2015**



**RENORBIO**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Avaliação do potencial probiótico e tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Ponto Focal: Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

**Cristiane Pereira de Lima**

**Orientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto**

**Co-Orientadora: Laura Maria Bruno**

Ficha catalográfica

L732a      Lima, Cristiane Pereira de  
              Avaliação do potencial probiótico e tecnológico de  
              bactérias ácido lácticas isoladas de queijo coalho / Cristiane  
              Pereira de Lima. – Recife, 2015.  
              90 f. : il.

              Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.  
              Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de  
              Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2015.  
              Ponto focal em Pernambuco - Universidade Federal  
              Rural de Pernambuco.  
              Referências.

              1. Probióticos 2. Bactérias ácido lácticas 3. Queijo coalho  
              4. Alimento funcional I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo,  
              orientadora II. Título

CDD 620.8

**CRISTIANE PEREIRA DE LIMA**

**Avaliação do potencial probiótico e tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho.**

Tese apresentada a Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial

Aprovada em 27 de março de 2015 por:

---

Profª Drª Ana Lucia Figueiredo Porto  
Presidente

---

Profª Drª Camila Souza Porto  
1º Examinador

---

Profª Drª Polyanna Nunes Herculano  
2º Examinador

---

Profª Drª Raquel Pedrosa Bezerra  
3º Examinador

---

Profª Drª Tatiana Souza Porto  
4º Examinador

Ao meu marido Heberon, que sempre esteve ao meu lado me incentivando e apoiando na realização deste trabalho. Aos meus pais, Salete e Luiz, que são muito importantes na minha vida. Em especial à minha mãe que não mediu esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos. Aos meus queridos irmãos, Fábio, Fabiane, Júnior e Leandro.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a força necessária para superar todos os obstáculos.

Aos meus familiares, meu marido Heberon, meus pais Salete e Luiz, meus irmãos Fábio, Fabiane, Júnior e Leandro pelo carinho, paciência, amizade, atenção e por sempre estarem torcendo por mim. Muito obrigada!

Ao Renorbio pela oportunidade de realização deste curso.

À querida professora Ana Porto que, mesmo sem me conhecer, aceitou me orientar e nunca mediu esforços para me ajudar na realização deste trabalho. Obrigada por todo apoio, amizade, otimismo e pelas palavras de incentivo “Não se preocupe, tudo vai dar certo” nos momentos em que mais precisei ouvir.

À Embrapa Agroindústria Tropical pelo suporte de laboratórios, materiais e equipamentos.

À Dr<sup>a</sup> Laura Maria, pela amizade, orientação e apoio em toda a minha vida acadêmica e profissional. Obrigada pelo carinho e estímulo constante durante este período. Seus ensinamentos e conselhos foram muito importantes para mim e guardarei comigo todos eles, com a certeza de que todo esforço é válido quando se quer vencer. Sou muito feliz por ter sua amizade e por poder contar sempre com você.

À Dr<sup>a</sup> Fatima Borges e Dr<sup>a</sup> Terezinha Feitosa pela amizade, apoio, atenção e estímulo constante durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Régia e aos estagiários do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, pelo apoio, ajuda e agradável convivência, facilitando a execução deste trabalho e por estarem sempre dispostos a me auxiliar nas atividades do laboratório.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pelo suporte de material e apoio para a realização deste trabalho.

À professora Ana Paula Uetanabaro por todo apoio, ajuda, confiança e por me receber em seu laboratório.

À Polyane e a todos do laboratório da Agroindústria da UESC pela amizade e apoio na realização desse trabalho.

Ao Instituto Federal Baiano (IFBaiano) pela permissão de afastamento das atividades de docência, possibilitando dedicação exclusiva ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Geovane, Euro, Daniel, Josué, Ivan, Marcio, Ozana, Wanessa e Renata e aos demais colegas do IFBaiano pelo apoio e compreensão.

Ao Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio) pelo auxílio no financiamento do projeto.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta na realização deste trabalho, muito obrigada!!!

"Concedei-nos, Senhor, a serenidade necessária, para aceitar as coisas que não podemos modificar, coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguir umas das outras." (Oração da serenidade)

Reinhold Niebuhr



## RESUMO

Probióticos são micro-organismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas e regularmente. Um dos seus principais benefícios está associado a sua participação na modulação da flora intestinal. Produtos lácteos são reconhecidos como uma excelente fonte e veículo de bactérias lácticas probióticas. O objetivo deste estudo foi caracterizar o potencial probiótico e tecnológico de 24 cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) oriundas de queijo de Coalho artesanal produzidos em Pernambuco. Foram realizados testes de resistência ao trato gastrointestinal (TGI), atividade antimicrobiana frente a patógenos intestinais, capacidade de autoagregação e coagregação, hidrofobicidade celular, atividade  $\beta$ -galactosidase, capacidade de desconjugar sais biliares pela produção de bile sal hidrolase (BSH), sensibilidade a antibióticos, cinética de acidificação, viabilidade em leite acidificado, resistência a aditivos e a interação com fermentos comerciais. As BAL com melhores resultados foram selecionadas para utilização em iogurte produzido a nível piloto, com monitoramento de pH e viabilidade celular, ao longo de trinta dias, sob refrigeração. Das 24 cepas avaliadas, 22 permaneceram viáveis às etapas simuladas do TGI. Dentre essas, seis foram capazes de superar todas as barreiras com redução de apenas um ciclo logarítmico. Duas BAL (128 e 155) inibiram o crescimento da *Listeria monocytogenes* e outras duas (64 e 174) inibiram a *Escherichia coli*. O percentual de autoagregação variou de 27% a 96% e as cepas foram capazes de coagregar com *Staphylococcus aureus* e com *E. coli* alcançando níveis de até 58% e 47%, respectivamente. Os percentuais de hidrofobicidade variaram entre 5% e 57%. Quatro cepas (46, 60, 106 e 128) foram capazes de produzir BSH. Uma cepa (106) foi capaz de produzir até 604 unidades Miller de  $\beta$ -galactosidase. Todas as cepas foram sensíveis a cinco antibióticos e apenas duas (37 e 98) foram resistentes à vancomicina (30  $\mu$ g) e a norfloxacin (10  $\mu$ g). Todas as cepas foram boas produtoras de ácido com boa viabilidade no pH 4 e 5 por 30 dias. Nenhum aditivo foi capaz de inibir o crescimento das cepas avaliadas. Duas BAL (46 e 155) foram inibidas pelos metabolitos de uma cultura starter comercial e quatro (42, 68, 98 e 117) inibiram o desenvolvimento do fermento. As cepas 15 e 106 foram selecionadas e inoculadas como culturas adjuntas no iogurte. Ambas demonstraram ser capazes de resistir ao processo de fabricação e ao armazenamento refrigerado, mantendo um número de células viáveis na ordem de  $10^6 - 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, o que permite sua utilização com propósito probiótico.

Palavras chave: queijo coalho, probióticos, bactérias ácido lácticas, alimento funcional.

## ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that confer health benefits on the host when administered in adequate amounts and regularly. One of the main benefits is associated their participation in the modulation of intestinal flora. Dairy products are recognized as an excellent source and a vehicle of lactic acid bacteria probiotic. The aim of this study was to characterize the probiotic and technological potential of 24 lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from artisanal Coalho cheese from Pernambuco. The gastrointestinal tract resistance (TGI), antimicrobial activity against intestinal pathogens, autoaggregation and coaggregation, cell hydrophobicity,  $\beta$ -galactosidase activity, capacity deconjugate bile salts for the production of bile salt hydrolase (BSH), sensitivity to antibiotics, acidification kinetics, viability in sour milk, resistance additives and interaction with commercial starters. The best LAB were selected for use in yogurt produced as a pilot project, with pH monitoring, and cell viability over thirty days under refrigeration. Of the 24 strains evaluated, 22 remained viable to simulated TGI. Among these, six were able to overcome all barriers with a reduction of only one log cycle. Two LAB (128 and 155) inhibited the growth of *Listeria monocytogenes* and two (64 and 174) inhibited *Escherichia coli*. The autoaggregation rate ranged from 27% to 96% and the strains were able to coagregar with *Staphylococcus aureus* and *E. coli* reaching levels between 58% and 47%, respectively. The hydrophobicity percentage ranged from 5% and 57%. Four strains (46, 60, 106 and 128) were able to produce BSH. One LAB (106) was able to produce up to 604 Miller units of  $\beta$ -galactosidase. All strains were sensitive to five antibiotics and only two (37 and 98) were resistant to vancomycin (30 $\mu$ g) and norfloxacin (10g). All strains were good acid producing and had good viability at pH 4 and 5 for 30 days. No additive was able to inhibit the growth of any strain. Two LAB (46 and 155) were inhibited by the metabolites of a commercial starter culture and four (42, 68, 98 and 117) inhibited growth of commercial culture. Strains 15 and 106 were selected and inoculated as adjunct cultures in yogurt. Both were able to resist the manufacturing process and the cold storage while maintaining viable cell number in the range  $10^6$ - $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup>, allowing its use with probiotic purpose.

Key words: coalho cheese, probiotic, lactic acid bacteria, functional food

## LISTA DE SIGLAS

BAL – Bactérias ácido lácticas

BHI – Brain heart infusion

BSH – Bile sal hidrolase

CFS – Sobrenadante livre de células (Cell free supernatant)

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization)

GRAS – Geralmente reconhecida como segura (Generally Recognized as Safe)

IG - Imunoglobulina

MRS – Man, Rogosa & Sharpe

ONPG - o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

TGI – Trato Gastrointestinal

UFC – Unidades formadoras de colônias

WHO – Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

$\beta$ -gal – Beta – galactosidase

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Contagens celular (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) em etapas simuladas do trato gastrointestinal das seis bactérias ácido lácticas mais resistentes .....	<b>67</b>
<b>Figura 2.</b> Redução do pH após 6 horas de incubação.....	<b>84</b>
<b>Tabela 1.</b> Contagens celular (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) de bactérias ácido lácticas em etapas simuladas do trato gastrointestinal.....	<b>68</b>
<b>Tabela 2.</b> Propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas avaliadas.....	<b>69</b>
<b>Tabela 3.</b> Percentual de crescimento das bactérias ácido lácticas na presença do aditivo em relação ao controle (sem aditivo) .....	<b>85</b>
<b>Tabela 4.</b> Propriedades tecnológicas de bactérias ácido lácticas avaliadas.....	<b>86</b>

## Sumário

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	2
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	4
3.	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
3.1	Probióticos .....	6
3.2	Bactérias ácido lácticas.....	10
3.3	Queijo de Coalho .....	12
3.4	Caracterização de probióticos.....	14
3.4.1	Resistência às barreiras do trato gastrointestinal.....	15
3.4.2	Capacidade de adesão .....	18
3.4.3	Atividade antagonista .....	19
3.4.4	Atividade beta galactosidase.....	21
3.4.5	Produção de bile sal Hidrolase.....	23
3.4.6	Resistência a antibióticos.....	25
3.5	Alimentos probióticos/funcionais .....	26
4.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30
5.	<b>ARTIGOS DERIVADOS DA TESE</b> .....	47
	• <u>ARTIGO 1</u>	
	CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM COALHO CHEESE FROM BRAZIL .....	48
	ABSTRACT .....	48
1.	INTRODUCTION.....	49
2.	MATERIALS AND METHODS .....	50
2.1.	Bacterial strains and culture conditions .....	50
2.2.	Resistance to simulated gastrointestinal .....	50
2.3.	Antimicrobial activity.....	51
2.4.	Autoaggregation and coaggregation with pathogens strains.....	51

2.5.	Hydrophobicity .....	52
2.6.	$\beta$ -galactosidase activity .....	52
2.7.	Bile salt deconjugation ability .....	53
2.8.	Antibiotic resistance .....	53
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	54
3.1.	Resistance to simulated gastrointestinal .....	54
3.2.	Antimicrobial activity.....	55
3.3.	Autoaggregation and coaggregation. ....	55
3.4.	Hydrophobicity .....	56
3.5.	$\beta$ -galactosidase activity .....	57
3.6.	Bile salt deconjugation ability .....	57
3.7.	Antibiotic resistance .....	58
3.8.	Selection of candidate probiotic strains .....	58
4.	CONCLUSION .....	59
5.	REFERENCES.....	60
6.	Figures .....	67
7.	Tables .....	68

- ARTIGO 2

TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA PROBIOTIC CANDIDATE ISOLATED FROM COALHO CHEESE FROM BRAZIL.....		70
ABSTRACT .....		70
1.	INTRODUCTION.....	71
2.	MATERIALS AND METHODS .....	72
2.1.	Microorganisms and growth conditions .....	72
2.2.	Milk acidification kinetics .....	72
2.3.	Viability of LAB strains in milk acidified with lactic acid .....	72
2.4.	Influence of additives on strain growth. ....	73

2.5.	Detection of Bacterial Interactions.....	73
2.6.	Experimental yogurt .....	74
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	74
3.1.	Milk acidification kinetics .....	74
3.2.	Viability of LAB strains in milk acidified with lactic acid .....	75
3.3.	Influence of additives on strain growth .....	76
3.4.	Detection of Bacterial Interactions.....	77
3.5.	Experimental yogurt .....	77
4.	CONCLUSION .....	79
5.	REFERENCES.....	80
6.	Figures .....	84
7.	Tables .....	85
6.	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>88</b>
7.	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>89</b>

---

# Capítulo 1

## Introdução

---



## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o papel da microbiota gastrointestinal na promoção e/ou manutenção da saúde é um fato bem consolidado pela literatura científica (PLÉ et al., 2015; XIE et al., 2015). Entretanto, a grande complexidade deste ecossistema dificulta o entendimento de seu funcionamento e interações (SANDERS, 2011; BINNS, 2013; BUTEL, 2014) o que torna estudos relacionados à modulação desta microbiota com o uso de probióticos cada vez mais relevantes.

Probióticos constituem um suplemento alimentar rico em micro-organismos vivos com efeito benéfico no hospedeiro/consumidor, ao melhorar ou manter o balanço microbiano intestinal (LEE e SALMINEN, 2009; PAGNINI et al., 2010). A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (WHO) definem probióticos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Micro-organismos probióticos conferem vários benefícios à saúde do hospedeiro. Dentre eles destacam-se como principais o auxílio na manutenção da barreira mucosa intestinal e o estímulo da produção de anticorpos e atividade de fagócitos. Podem ainda atuar auxiliando o desenvolvimento e a maturação do sistema imune entérico e sistêmico do hospedeiro (PAGNINI et al., 2010; PASCHOAL et al., 2010).

Para ser utilizado como probiótico, o micro-organismo deve apresentar algumas características: ser inócuo, tolerar o baixo pH do suco gástrico, resistir à ação da bile e das secreções pancreáticas e intestinais, resistir ao processamento de alimentos, mantendo-se viável por longo período durante a estocagem e transporte sem perder a funcionalidade, manter-se metabolicamente ativo no

intestino e não transportar genes que conferem resistência a antibióticos (SAAD, 2006; LEE e SALMINEN, 2009).

Dentre as cepas reconhecidas como probióticos, destacam-se as bactérias ácido lácticas (BAL), as quais apresentam inúmeros benefícios relacionados às características sensoriais, tecnológicas, nutricionais e de segurança dos alimentos (DURLU-OZKAYA et al., 2001; KÖNIG e FRÖHLICH, 2009).

A ausência de efeitos secundários representa a grande vantagem da terapia com probióticos uma vez que, cepas probióticas, especialmente BAL pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, são geralmente reconhecidas como seguras (*Generally Recognized as Safe* - GRAS) (MARTINS et al., 2005)

Apesar de existir um número razoável de cepas probióticas bem caracterizadas e comercialmente disponíveis, a busca de novos micro-organismos com propriedades benéficas à saúde tem constituído, recentemente, um foco importante de pesquisa (TODOROV et al., 2008; CEBRIAN et al., 2011; VITALI et al., 2012; BOTTA et al., 2014).

Desta forma, a prospecção de novas cepas probióticas entre cepas oriundas de produtos fermentados artesanais, justifica-se pela possibilidade de descoberta de cepas particularmente promissoras em termos de benefícios à saúde humana e que tenham bom desempenho do ponto de vista tecnológico boa resistência a condições de processamento e boa viabilidade no produto final.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.2. Objetivo Geral:**

- ✓ Avaliar o potencial probiótico e tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de amostras de queijos Coalho de Pernambuco.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Sugerir cepas de BAL como culturas potencialmente probióticas;
- ✓ Identificar propriedades tecnológicas interessantes de cepas de BAL;
- ✓ Selecionar cepas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de produtos lácteos funcionais;
- ✓ Elaborar um iogurte funcional com bactérias selecionadas;
- ✓ Avaliar, durante armazenamento refrigerado, características físico-químicas e microbiológicas do iogurte funcional elaborado.

---

## Capítulo 2

# Revisão Bibliográfica

---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Probióticos**

O termo “probiótico” é derivado do grego e significa pró-vida. Este conceito vem evoluindo desde o início dos anos 60 até os dias atuais. Foi usado pela primeira vez em 1965 por Lilly e Stillwell para descrever "substâncias secretadas por um micro-organismo, que estimulam o crescimento de outro". Em 1974, Parker utilizou a definição de probióticos para denominar suplementos alimentares incluindo micro-organismos e substâncias que afetam o equilíbrio da microbiota intestinal.

Em 1989, Fuller definiu probióticos como suplementos alimentares à base de micro-organismos vivos, que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal. Em 1992, Havenaar e Huis in't Veld propuseram que os organismos probióticos são “micro-organismos viáveis que possuem efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro após a ingestão, devido à melhoria das propriedades da microbiota”.

Schrezenmeir e De Vrese (2001) sugeriram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm micro-organismos viáveis definidos e em quantidade adequada, capazes de alterar a microbiota intestinal por meio de colonização, produzindo benefícios à saúde.

Diversas outras definições de probióticos têm sido publicadas nos últimos anos, entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é que são micro-organismos vivos, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados regularmente e em quantidades adequadas (FAO/ WHO, 2002).

As primeiras observações relacionadas a estes benefícios surgiram no início do século 20 quando um cientista russo, Eli Metchnikoff, propôs que o consumo de

leite fermentado por bactérias benéficas favorecia o revestimento do cólon, diminuía o pH intestinal levando a desaceleração do processo de envelhecimento. Assim, associou a longevidade dos camponeses da Bulgária ao consumo de leite fermentado (GORDON, 2008; JANCOVIC et al., 2010). A partir de então, pesquisas acerca das propriedades e funcionalidade de micro-organismos vivos em alimentos vem confirmando que probióticos desempenham um importante papel nas funções imunológicas, digestivas e respiratórias, e que podem ter um efeito significativo sobre o alívio de doenças infecciosas.

Dentre os inúmeros benefícios atribuídos à ingestão de probióticos os que mais se destacam são: controle e estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (SAAD, 2006; LEE e SALMINEN, 2009). No entanto, é importante ressaltar que não há nenhuma espécie que proporcione todos os benefícios propostos, os benefícios à saúde são muito específicos de cada micro-organismo (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

A modulação e recomposição da microbiota intestinal, e conseqüentemente, prevenção de doenças intestinais, é sem dúvida o efeito benéfico da terapia com probiótico mais estudado. A ação mais provável destas cepas nesta modulação é decorrente da inibição de bactérias patogênicas, por meio da competição por nutrientes, liberação de ácidos orgânicos, competição pela aderência ao epitélio intestinal ou ainda pela produção de bacteriocinas capazes de impedir o

desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis conseqüentemente, inibindo a produção de toxinas ou invasão das células epiteliais (SAAD, 2006; LEE e SALMINEN, 2009).

Outro benefício em evidência é a capacidade do probiótico alterar a resposta imune do hospedeiro. Paineau et al. (2008) relataram a produção de imunoglobulina como resposta imune à vacinação da cólera em humanos adultos que ingeriram até  $2 \times 10^{10}$  UFC de bactérias probióticas e relataram um aumento significativo nas concentrações séricas de imunoglobulina (Ig).

Ho et al. (2011) constataram que os níveis totais de IgA e IgG foram significativamente mais elevados no soro de animais que consumiram cepas potencialmente probióticas durante 28 dias quando comparados ao grupo controle. Estes autores observaram que a ingestão de probióticos estimulou a imunidade local com a produção de imunoglobulina, impedindo a infecção por bactérias patogênicas como a *Salmonella typhimurium*.

Benefícios relacionados à prevenção de doenças decorrentes da oxidação celular também tem sido relatado na literatura científica. Amaretti et al. (2013) caracterizaram o potencial antioxidante de cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e revelaram que, quando administrada em doses de pelo menos  $10^8$  UFC/dia, estas bactérias podem contribuir para prevenir e controlar várias doenças associadas com o estresse oxidativo.

Apesar do aumento constante nas pesquisas, os mecanismos pelos quais os probióticos exercem os efeitos benéficos ainda não estão bem elucidados. Contudo, alguns fatores podem estar associados a tais efeitos: produção de ácidos orgânicos (diminuição do pH), competição com patógenos por sítios de ligação, atividade

antagonista sobre patógenos por meio da produção de compostos antimicrobianos, produção de enzimas (bile sal hidrolase,  $\beta$ -galactosidase), síntese e aumento da disponibilização de nutrientes (hidrólise de proteínas e lipídios), estímulo de células imunomodulatórias, redução da atividade de enzimas que ativam a carcinogênese e inibição do crescimento ou apoptose de células tumorais (VASILJEVIC e SHAH, 2008; VENTURA et al., 2009).

No passado, o trato gastrointestinal humano foi considerado a principal fonte potencial de bactérias probióticas (ESPINOZA E NAVARRO, 2010). Atualmente, a comunidade científica tem chamado a atenção para diferentes matrizes alimentares, tanto de origem lácteas como não lácteas, e vem caracterizando a microbiota láctica autóctone destes alimentos como cepas potencialmente probióticas.

Todorov et al. (2008) identificaram propriedades probióticas de cepas isoladas de boza, uma bebida produzida a partir de cereais fermentados. Balcázar et al. (2008) caracterizaram as propriedades probióticas de bactérias lácticas oriundas da microbiota de peixes. Cebrian et al. (2011) caracterizaram o potencial probiótico de cepas isoladas de queijos de ovelha.

Vitali et al. (2012) determinaram o potencial probiótico de um grande número de cepas de bactérias isoladas de frutos e vegetais crus. Botta et al. (2014) e Saito et al. (2014), em estudos recentes, identificaram novas cepas probióticas na microbiota de azeitonas e cacau, respectivamente. Santos et al. (2015), por sua vez, avaliaram o potencial probiótico de *Lactobacillus* isolados de queijos de coalho do Ceará.

Dentre os micro-organismos reconhecidos como probióticos, destacam-se os pertencentes ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL). Tais bactérias, além de apresentarem benefícios relacionados às características sensoriais, tecnológicas,



nutricionais e de segurança dos alimentos, têm sido cada vez mais estudadas por suas propriedades benéficas à saúde (BURITI e SAAD, 2007) sendo consideradas atualmente a classe mais representativa dos micro-organismos probióticos. Espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* merecem destaque por estarem entre as cepas que mais apresentam potencial probiótico (HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002; LEE e SALMINEN, 2009).

### 3.2 Bactérias ácido lácticas

Bactérias ácido lácticas são um grupo de micro-organismos com várias características em comum: são gram positivas, são imóveis, não esporulam, apresentam catalase negativa, não possuem citocromos, são incapazes de hidrolisar a gelatina e de produzir sulfeto de hidrogênio (LEROY e DE VUYST, 2004; JAY et al., 2005; KÖNIG E FRÖHLICH, 2009). Caracterizam-se por possuírem o ácido láctico como o principal produto final decorrente da fermentação da glicose (KÖNIG E FRÖHLICH, 2009). Os principais representantes deste grupo são: *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Paralactobacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactoshaepa*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY et al., 2005).

BAL apresentam-se na forma de cocos ou bastonetes. Os cocos possuem forma esférica, entre 0,5 e 2 µm, apresentam-se em pares, tétrades ou cadeias de número variado. Os gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e *Enterococcus* estão dispostos em pares ou cadeias. *Leuconostoc* forma células lenticulares dispostas em pares ou cadeias, enquanto que *Pediococcus* e *Tetragenococcus* formam células dispostas em tétrades (ALEXON, 1998).

Por sua vez, o gênero *Lactobacillus* compreende bacilos que possuem comprimento variável e podem ser curvados, curtos, corineiformes ou cocobacilos (GUGLIELMOTTI, 2003). Inclui cerca de 80 espécies reconhecidas, embora tenham sido transferidas para o gênero *Weissella*. A divisão clássica dos *Lactobacillus* está baseada em suas características fermentativas: 1- obrigatoriamente homofermentativos; 2- heterofermentativos facultativos e 3- obrigatoriamente heterofermentativos (AXELSSON, 2004).

São capazes de produzir um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, contribuindo significativamente na modificação gradativa da estrutura e do aroma dos alimentos fermentados (KÖNIG E FRÖHLICH, 2009).

Estes micro-organismos também contribuem para a segurança microbiológica dos alimentos impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis. Produzem ácidos orgânicos, majoritariamente ácido lático, o qual promove a acidificação do alimento a um pH próximo a 4 e são capazes de produzir uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo ácidos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocinas (ROSS et al., 2002; THARMARAJ E SHAH, 2009).

Guedes Neto et al. (2005) comprovaram a atividade antimicrobiana frente a cepas patogênicas de bactérias lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal e industrial de Pernambuco. Em um estudo semelhante, Freitas et al. (2013) também avaliaram cepas de BAL oriundas de queijo coalho da Paraíba e observaram que 95% delas apresentaram halos de inibição sobre *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

BAL estão amplamente distribuídas na natureza, o que torna possível isolá-las em diferentes ambientes, desde matrizes alimentares, como produtos lácteos, carnes, vegetais, pão de massa azeda e vinho, até superfícies de mucosas humanas, como cavidade oral, vagina e trato gastrintestinal de animais e humanos (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000; SCHROETER & KLAENHAMMER, 2009). Entretanto, produtos lácteos em geral continuam sendo a principal fonte de bactérias probióticas.

Neste sentido, diversos esforços têm surgido no sentido de caracterizar BAL, oriundas de queijos, quanto ao seu potencial benéfico à saúde de homens e animais. Zago et al. (2011) identificaram propriedades benéficas em noventa e oito culturas de bactérias lácticas isoladas de queijos italiano e argentinos. Costa et al. (2013) caracterizaram o potencial probiótico de BAL isoladas de queijo-minas artesanal da Serra da Canastra.

Em um estudo recente, Santos et al. (2015) identificaram propriedades benéficas de BAL isoladas de queijos Coalho do Ceará e constataram que queijos, especialmente os artesanais, podem ser uma excelente fonte de bactérias benéficas.

### **3.3 Queijo de Coalho**

O queijo de Coalho é um dos produtos lácteos mais tradicionais do Nordeste brasileiro. É produzido há mais de 150 anos principalmente nos estados de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará. Atualmente, está amplamente difundido em todo o território brasileiro, sendo consumido tanto na forma natural, assado ou frito, como em preparações culinárias (NASSU et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2007).

De acordo com a instrução normativa nº30 da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) o queijo de Coalho é obtido pela coagulação do leite, por ação

do coalho ou de enzimas coagulantes apropriadas, complementado ou não pela ação de bactérias ácido lácticas selecionadas. Inicialmente, era fabricado pela adição de coalho animal presente em pedaços do estômago de animais ruminantes jovens (mocó, preá, cabrito, bezerro) ao leite. Este fato, provavelmente, lhe conferiu a denominação de “queijo de Coalho” (AQUINO, 1983).

É um queijo de consistência semi dura e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma, também ligeiramente ácido, que lembra massa de queijo coagulada. (BRASIL, 2001). Sua textura “borrachuda”, que não derrete ao ser assado e seu sabor ácido suave são algumas características bastante apreciadas pelos consumidores (CARVALHO et al., 2005).

Possui grande importância socioeconômica, com expressiva participação na renda e geração de emprego. É comercializado após sete dias de armazenamento a 10°C (BRASIL, 2001) tendo alto valor comercial, visto que sua tecnologia de produção é simples e o rendimento é alto (NASSU, 2006).

A legislação estabelece que o leite utilizado na elaboração de queijos deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 2001). Contudo muitos produtores rurais utilizam o leite cru e o produzem sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, resultando em um produto com uma microbiota muito específica, a qual está relacionada com a região de origem da matéria-prima e sua tecnologia de fabricação (CAVALCANTE et al., 2007).

Apesar de ser uma fonte de micro-organismos indesejáveis do ponto de vista de segurança alimentar (FEITOSA et al., 2008; MARIANO et al., 2008; FREITAS FILHO et al., 2009), o queijo de coalho também é uma excelente fonte de BAL. Tais

bactérias contribuem tanto para o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis do queijo como com sua segurança microbiológica, impedindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas (GUEDES NETO et al., 2005; FREITAS et al., 2013). Além destas propriedades atribuídas à microbiota autóctone de queijos, BAL podem ainda apresentar muitos benefícios à saúde (BURITI e SAAD, 2007; LEE e SALMINEN, 2009).

Entretanto, a utilização de BAL probióticas no desenvolvimento de alimentos funcionais só é possível após sua caracterização. Estudos que abrangem desde a identificação das cepas e sua diversidade, passando pela investigação de suas características tecnológicas e funcionais, resistência aos processos de conservação e armazenamento, bem como seu desempenho na elaboração dos produtos desejados são fundamentais neste processo de caracterização (UGARTE et al., 2006; MATHARA et al., 2008; VINDEROLA et al., 2008).

### **3.4 Caracterização de probióticos**

Em geral, do ponto de vista da segurança alimentar, bactérias lácticas são consideradas seguras. Por este motivo têm sido utilizadas como cepas probióticas em uma grande diversidade de produtos disponíveis no mercado. Contudo, tais micro-organismos devem ser usados com precaução em certos grupos de pacientes, particularmente recém-nascidos prematuros ou com deficiência imune (BOYLE et al., 2006).

É importante ressaltar que para ser utilizado com segurança em alimentos funcionais, a cepa probiótica deve apresentar algumas características importantes. Devem ser capazes de sobreviver às barreiras encontradas no trato gastrintestinal,

tolerar o baixo pH do suco gástrico e resistir a ação da bile e das secreções pancreáticas; não devem transportar genes transmissores de resistência a antibióticos, assim como resistir a fagos (HOLZAPFEL e SHILLINGER et al., 2002). Devem ainda se manter viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte e possuir propriedades tecnológicas desejáveis (SALMINEN, 1998; VINDEROLA et al., 2002).

Além destas características já citadas, é interessante que uma bactéria probiótica seja capaz de colonizar, mesmo que transitoriamente, o intestino humano (MOMBELLI e GISMONDO, 2000), participando da microbiota e exercendo atividades benéficas (MATHARA et al., 2008). Adicionalmente, características fisiológicas como habilidade de desconjugar sais biliares e ação antagonista frente a patógenos intestinais estão entre propriedades desejáveis para serem considerados como probióticos.

Ensaio *“in vitro”* e *“in vivo”* com modelos animais, são fundamentais para fornecer dados importantes sobre as características de micro-organismos potencialmente probióticos, sendo recomendados pela FAO/WHO (2002). Testes abrangendo a resistência às barreiras do trato gastrintestinal, capacidade de adesão, atividade antibacteriana, produção de enzimas e resistência a antibióticos vem sendo cada vez mais utilizados por autores em várias pesquisas.

### **3.4.1 Resistência às barreiras do trato gastrintestinal**

O fornecimento de bactérias probióticas com o objetivo de alterar a flora intestinal estabelecida em crianças e indivíduos adultos é um processo mais complexo do que se supunha, pois, estes micro-organismos se deparam, logo de início, com a estabilidade do ecossistema do trato gastrointestinal (TGI).

O TGI humano é considerado um ambiente bastante complexo (SANDERS, 2011; BUTEL, 2014). Permanece estéril até o nascimento do indivíduo e a primeira colonização ocorre após contato com a vagina da mãe, meio ambiente e microbiota fecal (ALDERBETH et al., 2000; BINNS, 2013). Quando a microbiota adulta se estabelece, mais ou menos aos 2-3 anos de idade, ela é relativamente estável em um mesmo indivíduo, mas ainda pode ser influenciada pela dieta, doenças, uso de medicamentos (principalmente antibióticos) e envelhecimento (BINNS, 2013).

Em geral, a microbiota intestinal pode ser dividida em dois grupos: microbiota resistente e microbiota transitória. No primeiro grupo estão micro-organismos considerados fixos, encontrados com regularidade em determinada área e idade do indivíduo; no segundo estão micro-organismos oriundos do meio ambiente, em geral não patogênicos, que permanecem no intestino por horas, dias ou semanas e são considerados de pouca importância (SANDERS, 2011; BINNS, 2013).

Micro-organismos probióticos participam da microbiota intestinal de forma temporária, embora alguns deles possam pertencer a espécies que também são organismos colonizadores nativos. Alguns probióticos, embora não todos, também são capazes de aderir às células intestinais, se replicar e persistir no intestino, pelo menos temporariamente, mas desaparecem alguns dias após a interrupção de sua ingestão (BINNS, 2013).

Devido a sua complexidade, o TGI humano possui inúmeras barreiras que podem ser consideradas como mecanismo de defesa do organismo frente a micro-organismos indesejáveis (SANDERS, 2011). Entretanto, levando em consideração que para que uma cepa probiótica possa exercer seus efeitos benéficos ela precisa sobreviver à passagem pelo TGI humano e estar presente em quantidade suficiente no intestino, a superação destas barreiras pode ser considerada um importante

critério na seleção de probióticos (VINDEROLA e REINHEIMER, 2003; HUANG e ADAMS, 2004).

Após serem ingeridas, o primeiro obstáculo encontrado pelas bactérias é o estômago. Neste ambiente, aproximadamente 2,5 L de suco gástrico a um pH de 2,0 é secretado diariamente e, apesar de ser fundamental para o início da digestão dos alimentos, o baixo pH deste suco torna-se uma grande barreira, visto que poucas são as que conseguem sobreviver a este ambiente ácido. Ainda assim, no estômago de um adulto saudável, pode haver até  $10^3$  bactérias para cada mililitro (mL) de conteúdo gástrico, sendo os principais habitantes os lactobacilos, enterococos, helicobactérias e bacilos (BINNS, 2013).

As condições adversas do intestino delgado também são uma dificuldade que bactérias probióticas devem superar. Nesta etapa tais micro-organismos entram em contato com sais biliares e pancreatina que, em geral, são tóxicos para as bactérias (HUANG e ADAMS, 2004; BINNS, 2013).

Tendo em vista o exposto, diversos estudos relacionados à resistência de probióticos ao trânsito gástrico têm sido conduzidos, tanto com suco gástrico simulado quanto com sucos gástricos de humanos ou de animais.

Pitino et al. (2010) investigaram, com testes “*in vitro*”, a capacidade de seis cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, oriundas de queijo, sobreviverem ao trato gastrointestinal superior humano. Estes autores observaram que todas as cepas testadas mostraram elevada taxa de sobrevivência, tanto durante digestão gástrica, como na duodenal, e concluíram que o ácido lático produzido pelas cepas pode auxiliar nesta resistência.



Zago et al. (2011) observaram que cepas de *Lactobacillus plantarum*, oriundas de queijos, mostraram uma boa adaptação ao suco gástrico simulado, no entanto, eles apresentaram de moderada a baixa tolerância à bile.

Por outro lado, Capra et al. (2014) relataram uma diminuição da viabilidade celular de cepas de *Lactobacillus* após a incubação em suco gástrico simulado, obtendo, no final das condições simuladas do TGI, contagens celulares variando entre  $10^3$  e  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, o que representou uma queda de 3 a 5 ordens logarítmicas.

### **3.4.2 Capacidade de adesão**

A adesão às células epiteliais do intestino pela bactéria probiótica é considerada um pré-requisito para a colonização (mesmo que transitória) do intestino do hospedeiro. É também um critério importante na seleção de cepas probióticas, uma vez que a adesão evita sua eliminação imediata, prolongando sua permanência no intestino e favorecendo sua ação relativa aos efeitos benéficos (KOS et al., 2003; COLLADO et al., 2007). Acredita-se ainda que esta propriedade esteja relacionada ao aumento da habilidade de estimulação do sistema imune (SCHILLINGER et al., 2005).

Bactérias são capazes de aderir em diferentes partes da superfície da mucosa intestinal: células epiteliais, camada de muco e/ou matriz extracelular. As adesinas destacam-se como compostos mediadores da adesão. São classificadas de acordo com o alvo da mucosa intestinal, com sua localização e com a forma em que se encontram ancoradas na superfície bacteriana (VÉLEZ et al., 2007).

Vários mecanismos estão envolvidos na adesão de micro-organismos às células epiteliais do intestino (VINDEROLA e REINHEIMER, 2003). Algumas características físico-químicas das células, entre elas a natureza hidrofóbica da

superfície dos micro-organismos, têm sido associadas à ligação das cepas à mucosa intestinal (KIELY e OLSON, 2000; DEL RE et al., 2000; VINDEROLA e REINHEIMER, 2003). A capacidade de adesão da bactéria a diferentes hidrocarbonetos tem sido avaliada como uma forma de estimar a habilidade de uma cepa em aderir a células epiteliais (KIELY e OLSON, 2000; VINDEROLA et al., 2003)

Vinderola e Reinheimer, (2003) e Todorov et al. (2008) avaliaram a capacidade de bactérias lácticas em aderir ao n-hexadecano e verificaram que o percentual de hidrofobicidade celular das cepas alcançou níveis de aproximadamente 32 e 30%, respectivamente. Por outro lado, utilizando o mesmo hidrocarboneto, Zago et al. (2011) obtiveram índices de até 80% na hidrofobicidade celular das cepas lácticas avaliadas, indicando uma maior probabilidade de adesão às células epiteliais.

Por conseguinte, a capacidade de se autoagregar e coagregar também representam mecanismos importantes relacionados à aderência celular, pois podem formar barreiras que previnem a colonização por cepas patogênicas (DEL RE et al., 2000). Mesmo não estando bem elucidada, a habilidade da cepa probiótica em se autoagregar também tem sido relatada como uma propriedade importante na aderência às células epiteliais do intestino (COLLADO et al., 2007). Micro-organismos que se coagregam com outras bactérias, por exemplo, com patógenos, também são interessantes no ponto de vista da segurança, e podem ter grandes vantagens sobre os que não se agregam e que são facilmente removidos do ambiente intestinal.

### **3.4.3 Atividade antagonista**

Em geral, bactérias patogênicas são importantes agentes causadores de doenças. Desta forma, é desejável que BAL com potencial probiótico proteja o

hospedeiro contra bactérias patogênicas sendo essa uma característica de grande interesse para sua seleção (SAAD, 2006).

Esse efeito protetor, em geral, relaciona-se à competição por nutrientes com inibição da produção e/ou ação de toxinas (DE VUYST & LEROY, 2007; CHEIKHYOUSSEF et al., 2008), produção de substâncias antibacterianas como: peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído, substâncias antimicrobianas de natureza protéica, denominadas bacteriocinas (SUSKOVIC et al., 2010), decréscimo de pH do meio resultante da produção de ácidos (PIARD et al., 1999) inibição da adesão dos patógenos à mucosa intestinal, (CZERUCKA e RAMPAL, 2002), modulação da microbiota do intestino ou do sistema imune do hospedeiro (BUTEL, 2014) e estímulo do peristaltismo e da maturação e renovação das células epiteliais do cólon (McFARLAND, 2000).

A atividade antagonista vem sendo bastante estudada e tem sido descrita em vários estudos relacionados às cepas potencialmente probióticas. Tharmaraj e Shah (2009) avaliaram, utilizando diferentes técnicas, a atividade inibitória de bactérias probióticas contra bactérias patogênicas e deteriorantes e observaram que ácidos orgânicos (ácido acético, láctico, fórmico, propiônico, butírico, ácido benzóico e fenilático) foram responsáveis pela inibição detectada. Tais autores concluíram que que bactérias formadoras de esporos foram inibidas com maior intensidade quando comparadas às não formadoras de esporos.

Tejero-Sariñena et al. (2012) investigaram as propriedades antimicrobianas de 15 cepas probióticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Bacillus* contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas, eles observaram que a maioria das cepas foram capazes de produzir compostos ativos com propriedades antagonistas contra *Salmonella*

*Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium difficile*. Estes autores concluíram, após neutralizar os sobrenadantes livre de células, que um dos principais mecanismos de inibição foi a produção de ácidos orgânicos a partir da fermentação da glicose e consequente redução do pH.

Capra et al. (2014) avaliaram 10 cepas de *Lactobacillus* e observaram que todas apresentaram alguma atividade inibitória contra quatro enteropatógenos, *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Em relação à natureza do agente, estes autores também concluíram que a inibição pode ser atribuída ao ácido produzido pelas cepas ou a um composto que necessita de um ambiente ácido para exercer a sua função.

Botta et al. (2014) relataram que a capacidade de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* foi um fator relevante na seleção de cepas de *Lactobacillus plantarum* como candidatas à probióticas.

#### **3.4.4 Atividade beta galactosidase**

A enzima beta galactosidase ( $\beta$ -gal) é responsável pela hidrólise da lactose, o principal carboidrato do leite, em glicose e galactose, que são absorvidas através do epitélio intestinal (VASILJEVIC e JELEN, 2001; TROELSEN, 2005; HEYMAN, 2006). Esta enzima está presente em regiões da membrana interna do intestino delgado de mamíferos jovens, incluindo o ser humano. Sua baixa atividade causa desconfortos descritos pelo termo “intolerância à lactose” cujos sintomas variam desde dores abdominais e diarreia, náuseas, flatulência até inchaço após a ingestão de lactose (VASILJEVIC e JELEN, 2001).

Indivíduos intolerantes a este açúcar optam, muitas vezes, por excluir o leite e seus derivados de sua dieta. Contudo, atualmente, sabe-se que a terapia com bactérias lácticas produtoras da enzima  $\beta$ -gal pode auxiliar nestes casos

(VINDEROLA e REINHEIMER, 2003). Entretanto, é importante ressaltar que a efetividade das cepas, de forma a atender à propriedade funcional de alívio inerente ao desconforto da intolerância à lactose, é dependente de alguns fatores, tais como: quantidade de  $\beta$ -gal produzida com conseqüente liberação no TGI, concentração celular no produto, e o nível de enzima que permanece ativa após passagem pelo estômago (GRANATO et al., 2010).

A presença de atividade  $\beta$  - galactosidase em diferentes BAL tem sido constantemente relatada na literatura científica, e isto não é surpreendente, uma vez que a maioria das BAL crescem bem em meio à base de leite (SANTOS et al., 2015)

Por serem consideradas seguras, tais bactérias produzem enzimas que podem ser utilizadas sem purificação (VASILJEVIC e JELEN, 2001) este fato impulsiona cada vez mais a indústria de alimentos na produção e utilização de  $\beta$ -gal oriundas de BAL (XANTHOPOULOS, 1999; HE et al., 2008).

Em 1972, Jeffrey Miller observou que a enzima  $\beta$ -gal era capaz de reconhecer o composto sintético o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) como um substrato, produzindo galactose e o-nitrofenol, composto de cor amarela. Este pesquisador percebeu que quando o ONPG está em excesso em relação à enzima, a produção de o-nitrofenol por unidade de tempo é proporcional à concentração de  $\beta$ -galactosidase. Assim, concluiu que a coloração amarela da reação poderia ser utilizada para determinar a concentração da enzima. Em função disto, desde então, ensaios de ONPG /  $\beta$ -Gal são referidos como ensaios "Miller", e uma quantidade normalizada de atividade  $\beta$ -Gal é uma "unidade Miller".

Vinderola et al. (2003) reportaram a ausência ou baixos valores da enzima  $\beta$  - galactosidase para cepas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus*,

enquanto que para as bifidobacterias os valores de atividade da enzima variaram entre 147 e 860 unidades Miller.

Zago et al. (2011) por sua vez, avaliaram a produção de  $\beta$ -gal por noventa e oito culturas de *L. plantarum* isoladas de queijos italiano e argentinos e observaram que uma cepa produziu até 1.062,14 unidades Miller da enzima.

Gheytanchi et al. (2010) estudaram a produção de  $\beta$ -gal por cepas de *Lactobacillus* oriundos de leite e queijos e observaram que a produção enzimática foi detectada em 37% das culturas avaliadas. Santos et al. (2015) avaliaram a capacidade de oito cepas de *Lactobacillus* em produzir esta enzima e observaram que sete apresentaram resultado positivo.

Sumathy et al. (2012) extraíram e purificaram enzima  $\beta$ -galactosidase produzida por *Lactobacillus*, oriundos de leite e queijos indianos, para utilizarem, posteriormente, na melhoria de produtos alimentícios.

### **3.4.5 Produção de bile sal Hidrolase**

A ingestão de bactérias probióticas pode constituir uma alternativa viável para o auxílio no controle e prevenção de problemas relacionados a altos níveis de colesterol (MANZONI et al., 2008). Entretanto, os mecanismos pelos quais os probióticos afetam as concentrações de colesterol ainda não estão bem elucidados. Uma das hipóteses que têm sido propostas inclui a desconjugação dos sais biliares pela enzima Hidrolase de sais biliares ou Bile sal hidrolase (BSH) (ROSSI et al., 2000; MANZONI et al., 2008).

Os sais biliares são os principais componentes da bile, são sintetizados a partir do colesterol pelo fígado, secretados como conjugados de glicina ou taurina no duodeno (onde facilitam a absorção de gordura) e conservados em condições

normais por recirculação entero-hepática (NORIEGA et al., 2006; BEGLEY et al., 2006).

Bactérias probióticas, produtoras da enzima BSH, podem desconjugar estes sais. Por serem menos solúveis, os sais biliares desconjugados são menos absorvidos no lúmen intestinal e mais excretados nas fezes. Ocorre, então, o aumento da demanda de colesterol para a síntese de novos sais biliares, de forma a repor aqueles perdidos pelas fezes, consequentemente reduzindo o colesterol sérico (LIONG e SHAH, 2005; BEGLEY et al., 2006). Estes sais desconjugados também são menos eficientes na solubilização e absorção de lipídios no intestino (MANZONI et al., 2008).

Além destes benefícios atribuídos à BSH, alguns autores também sugerem que a atividade de desconjugação desempenha um papel na manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal visto que, essa proteína pode auxiliar bactérias lácticas a sobreviverem ao estresse biliar intestinal (DE SMET et al., 1995). Diante disso, a capacidade de produzir esta enzima é uma propriedade desejável em bactérias probióticas.

Zago et al. (2011) relataram que 27 cepas de *Lactobacillus plantarum* oriundas de queijos italianos e argentinos demonstraram a capacidade de hidrolisar tanto glicodesoxicolato de sódio quanto o taurodesoxicolato de sódio. Por outro lado, Guglielmotti et al. (2007) ao avaliarem a capacidade de cepas de *Lactobacillus delbruecki* isoladas de fermento láctico comercial em desconjugar sais biliares de taurocolato e taurodesoxicolato de sódio observaram que as cepas não foram capazes de desconjugá-los.

### **3.4.6 Resistência a antibióticos**

BAL possuem uma longa e segura história de utilização na produção e consumo de alimentos fermentados e bebidas sendo consideradas, de modo geral, GRAS. Existem poucos relatos na literatura científica acerca de reações adversas resultantes da ingestão desses micro-organismos (DOUGLAS e SANDERS, 2008; FARNWORTH, 2008). No entanto, a possibilidade de transmissão de resistência a antibióticos associados aos plasmídeos também tem sido uma característica bastante considerada na caracterização e seleção de novos probióticos (FARNWORTH, 2008).

A capacidade de um micro-organismo sobreviver à exposição a antibióticos, por si só, não é considerada fator de virulência, entretanto, infecções com micro-organismos resistentes podem complicar a evolução das doenças e colocar em risco todo o tratamento (LEVY e MARSHALL, 2004)

Em uma população bacteriana, a resistência a antibióticos pode ocorrer principalmente de duas formas: mutação de um gene inerente à bactéria ou obtenção de um gene de resistência de outro micro-organismo. As mutações, que podem causar mudanças genéticas em várias regiões do genoma, desempenham apenas um menor papel no desenvolvimento de resistência (TEUBER et al., 1999; LEVY e MARSHALL, 2004).

BAL usadas como culturas iniciadoras para a produção de alimentos podem conter, possivelmente, genes de resistência a antibióticos que podem vir a ser transferidos para micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes. Por este motivo, a ausência destes genes de resistência a antibióticos é, portanto, um importante critério de segurança utilizado na seleção de cepas (LEVY e MARSHALL, 2004)



A maioria dos estudos acerca de resistência de BAL à antibiótico estão relacionados às cepas do gênero *Enterococcus*. Bactérias deste gênero resistentes à vancomicina surgiram na última década como principais responsáveis de infecções nosocomiais (MATHUR e SINGH, 2005). Entretanto, dados sobre resistência de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* probióticos têm surgido com intensidade nos últimos anos.

D'Aimmo et al. (2007) avaliaram a resistência a antibióticos de 23 cepas de *Lactobacillus*, 21 *Bifidobacterium* e 10 culturas de *Streptococcus thermophilus* isoladas a partir de produtos lácteos e farmacêuticos, e observaram que todas as cepas testadas foram sensíveis a oito antibióticos, mas resistentes a outros seis.

Por outro lado, Liu et al. (2009) ao avaliarem a resistência a antibióticos de cepas probióticas de bactérias lácticas isoladas também de alimentos e medicamentos comercializados, concluíram que genes de resistência estavam presentes em diferentes espécies de cepas probióticas, o que representa uma ameaça para a segurança alimentar.

### **3.5 Alimentos probióticos/funcionais**

Apesar da aderência do micro-organismo probiótico ao TGI, sua permanência ocorre apenas enquanto a suplementação é mantida (BINNS, 2013). Com isso, a administração constante de bactérias probióticas, a fim de obtenção de resultados inerente aos efeitos benéficos, é de fundamental importância.

Este fato, associado a crescente busca por uma vida mais saudável tem impulsionado a pesquisa por cepas probióticas com potencial tecnológico para a elaboração de diferentes alimentos funcionais. Como resultado, o número e o tipo de alimentos probióticos e bebidas que estão disponíveis para os consumidores, e

comercializado com apelos aos benefícios à saúde, tem aumentado consideravelmente (FAO/WHO, 2001).

Um grande percentual das pesquisas realizadas com culturas probióticas no Brasil visam desenvolver alimentos probióticos tipicamente consumidos pela população brasileira ou priorizar o aproveitamento de matérias-primas locais e de subprodutos da fabricação de outros alimentos. Nesse sentido, já foram elaborados iogurtes, bebidas lácteas, sorvetes e sobremesas adicionadas de frutas tropicais e regionais (DE ALMEIDA et al., 2008, PAULA et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2009; FERRAZ et al., 2012), bem como diversos tipos de queijos (SANTOS et al., 2008; SOUZA et al., 2008; SOUZA e SAAD, 2009) incluindo o queijo de Coalho (GARCIA et al., 2012). Entretanto, de modo geral, os iogurtes e leites fermentados continuam sendo os produtos probióticos mais estudados, produzidos e comercialmente disponíveis.

É importante ressaltar que em queijos e iogurtes, as cepas probióticas são geralmente empregadas associadas a outras bactérias, principalmente as do fermento láctico. Dessa forma, torna-se importante, também, verificar se a interação entre elas resulta ou não em impacto sobre as características do produto final, particularmente sob o aspecto sensorial (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Para o processamento de produtos probióticos faz-se necessário uma adequada seleção de cepas (VINDEROLA e REINHEIMER, 2003). Um fator importante a ser levado em consideração é a sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício que para apresentar efeitos fisiológicos no consumidor deve alcançar populações acima de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> (SHAH, 2000; BETORET et al., 2003). Segundo Charteris et al. (1998) para que populações de  $10^6$  a  $10^7$  UFC. g<sup>-1</sup> cheguem

ao intestino e atuem fisiologicamente, é necessário consumir cerca de 100g do produto com populações de  $10^8$  a  $10^9$  UFC. g<sup>-1</sup>.

---

## Referências Bibliográficas

---

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERBETH, I., CERQUETTI, M., POILANE, I., WOLD, A.E., COLLINGON, A. Mechanisms of colonization and colonization resistance of the digestive tract. *Microbial Ecology of health and disease*, v.12, p. 223–239, 2000

ALEXON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology, In: SALMINEN, S. VON WRIGHT, A (Ed.) *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 2nd ed, New York: Marcel Dekker, p. 1-72, 1998

AMARETTI, A.; DI NUNZIO, M.; POMPEI, A.; RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; BORDONI, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.97, p.809–817, 2013

AQUINO, F.T.M. Produção de queijo de coalho no estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento. 1983.74 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S.; Wright, A.; Ouwehand, A. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3ª ed. New York: Marcel Dekker; p.1-66, 2004

BALCÁZAR, J.L.; VENDRELL, D.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; MUZQUIZ, J. L.; GIRONES, O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, v. 278, p.188-191, 2008.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 3, p. 1729–1738, 2006.

BETORET, N.; PUENTE, L.; DÍAZ, M.J.; PAGÁN, M.J.; GARCÍA, M.J.; GRAS, M.L.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; FITO, P. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, v.56, p.273-277, 2003.

BINNS, N. Probiotics, prebiotics and the gut microbiota. Bruxelas: International Life Sciences Institute - ILSI Europe, 2013

BOTTA C., LANGERHOLC T., CENCIC, A., COCOLIN L. In Vitro Selection and Characterization of New Probiotic Candidates from Table Olive Microbiota. *Plos One*, v. 9, 2014

BOYLE, R. J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; TANG, M. L. K. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 83, p. 1256-1264, 2006.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 26 de julho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo de Coalho. Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Disponível em: < [http://www.agais.com/normas/leite/queijo\\_coalho.htm](http://www.agais.com/normas/leite/queijo_coalho.htm) > Acesso em: 10 dez. 2015.

BURITI, F.C.A., SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v. 57, n.4, p. 373-380, 2007.

BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2014

CAPRA, M. L.; TIBALDO, M.M.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.A.; QUIBERONI, A. Technological and probiotic characterisation of *Lactobacillus*

*casei/paracasei* strains and their phage-resistant mutants. International Dairy Journal, v.37, p.39-47, 2014

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. Revista do Instituto Cândido Tostes, v. 60, n. 345, p. 221-224, 2005.

CAVALCANTE, J.F.M.; ANDRADE, N.J.; FURTADO, M.M.; FERREIRA, C.L.; PINTO, C.L.; ELARD E. Processamento do queijo Coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. Ciência Tecnologia de Alimentos, v.27 n.1 p.205-214, 2007

CEBRIAN, R.; BAÑOS, A.; VALDIVIA, E.; PÉREZ-PULIDO R.; MARTÍNEZ-BUENO M.; MAQUEDA, M.; Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. Food Microbiology, v. 30, p.59-67, 2011

CHARTERIS, W.P., P.M. KELLY, L. MORELLI AND K. COLLINS. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial population. International Journal Food Microbiology, v.35, p.1-27, 1998.

CHEIKHYOUSSEF, A.; POGORI, N.; CHEN, W.; ZHANG, H. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. International Journal of Food Microbiology, v. 125, p. 215–222, 2008.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods. Journal of Microbiological Methods, v. 71, p.71-74, 2007

COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACÚRCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.F.S.; NUNES, A.C. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.65, n.6, p.1858-1866, 2013

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. Microbes and Infection, v.4, n.7, p.733-739, 2002.

D'AIMMO, M. R.; MODESTO, M.; BIAVATI, B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. International Journal of Food Microbiology, v. 115, p.35-42, 2007

DE ALMEIDA, M.H.B.; ZOELLNER, S.; CRUZ, A.G.; MOURA, M.R.L.; CARVALHO, L.M.J.; FREITAS, M.C.J.; SANTANA, A.S. Potentially probiotic açai yoghurt. International Journal of Dairy Technology, v.61, n.2, p.178-182, 2008.

DE SMET, I., VAN HOORDE, L., VANDE WOESTYNE, M., CHRISTIAENS, H., VERSTRAETE, W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology, v. 79, p.292–301, 1995

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Food Applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, v. 13, p.194–199, 2007.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. Letters in Applied Microbiology, v. 31, p.438–442, 2000

DOUGLAS, L.C.; SANDERS, M.E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. Journal of the American Dietetic Association, v.108, p.510-521, 2008



DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 5, p. 861-870, 2001.

ESPINOZA, R. Y.; NAVARRO, Y. G. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, v. 27, p. 1–11, 2010

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001. Disponível em: [ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf). Acessado em 15 jan. 2015.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotic in Food, Ontario, Canada, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acessado em 18 jan. 2015.

FARNWORTH, E.R. The evidence to support health claims for probiotics. *Journal of Nutrition*, v.138, p.1250S-1254S, 2008.

FEITOSA, T.; BRITO, J. R. F.; BORGES, SOUZA, M. F.; M. A. N.; SILVA, A. B.; MARIANO, B. C. C.; SILVA, R. S.; LIMA C. P.; CARVALHO, A. K. F.; CHINELATE, G. C. B.; BARROS, L. D.; LIMA, E. C.; PINHEIRO, T. F.; Incidência de Patógenos e Caracterização Físico-química do Queijo de Coalho Artesanal e Industrial. CD do Simpósio IAFP América Latina – Resumos, 2008

FERRAZ, J.; CRUZ, A.; CADENA, R.; FREITAS, M.; PINTO, U.; CARVALHO, C.; FARIA, J.; BOLINI, H. Sensory acceptance and survival of probiotic bacteria in ice cream produced with different overrun levels. *Journal of Food Science*, v. 71, n. 1, p. 524-528, 2012

FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; OLIVEIRA, H. B.; ANGELO, J. H. B.; BEZERRA, J. D. C. Avaliação da qualidade do queijo “Coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. *EXTENSIO - Revista Eletrônica de Extensão*, Santa Catarina, v. 6, n. 8, p. 35-49, 2009

FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A. E. R.; MACIEL, J. F. Characterization of lactic acid bacteria in coalho cheese and antagonism to some pathogenic food-related bacteria. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v.72 n.2, p.131-7, 2013

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, v.66, n.5, p.365-378, 1989

GARCIA, E.F.; OLIVEIRA, M.E.G.; QUEIROGA, R.C.R.E.; MACHADO, T.A.D.; SOUZA, E.L. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 63, n.8, p. 947–956, 2012

GHEYTANCHI, E.; HESHMATI, F.; SHARGH, B. K.; NOWROOZI, J.; MOVAHEDZADEH, F. Study on b-galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *African Journal of Microbiology Research*, v. 4, n.6, p.454-458, 2010

GORDON S. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *European Journal of Immunology*, v.38, p. 3257–3264, 2008

GRANATO, D., BRANCO, G. F., NAZZARO, F., CRUZ, A. G., FARIA, J. A. F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.9, p. 292-302, 2010

GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, v.57, n.2, p.245-250, 2005

GUGLIELMOTTI, D. M. Fagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: caracterización y descripción de su interacción con sus cepas sensibles. 2003, 198f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia Química. Universidade Nacional do Litoral, Santa Fé – Argentina, 2003

GUGLIELMOTTI, D. M., MARCÓ, M. B., GOLOWCZYC, M., REINHEIMER, J. A., QUIBERONI, L. Q., Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal*, v.17, p.916-925, 2007

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. *Lactic acid bacteria in health and disease 1*. Amsterdam: Elsevier Applied Science, p.151-170, 1992

HE, T.; PRIEBE, M.G.; ZHONG, Y.; HUANG, C.; HARMSSEN, H.J.; RAANGS, G.C.; ANTOINE, J.M.; WELLING, G.W.; VONK, R.J. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose intolerant subjects. *Journal of Applied Microbiology*, v.104 n.2 p.595-604, 2008

HEYMAN, M.B. The Committee on Nutrition. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Journal of Pediatrics*, v. 118, p.1297-1286, 2006

HO, C-Y.; CHEN, C-Y; CHEN, Y-C; TSAI CC. Effects of multistrain lactic acid bacteria with probiotic properties on enhancements of IgA, IgG levels and anti-*Salmonella Typhimurium* invasion activity. *Hiromitsu Journal*, v. 63 p.156-173, 2011

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. *Food Research International*, Amsterdam, v.35, n.2-3, p.109-116, 2002.

HUANG, Y.; ADAMS, M.C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal Food Microbiology*, v. 91 n. 3 p.253–260, 2003

JANKOVIC´, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA. E. E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21 p.175–181, 2010.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. *Modern Food Microbiology* 7th edition. Springer Science + Business Media. New York, NY, 2005

KAILA, M.; ISOLAURI E.; SOPPI E.; VIRTANEN E.; LAINE S.; ARVILOMMI H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatric Research*, v.32, p.141-144, 1992.

KIELY, L.J.; OLSON, N.F. The physicochemical surface characteristics of *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology*, v. 17, p. 277–291, 2000

KÖNIG, H. & FRÖHLICH, J. Lactic acid bacteria. In: König, H., Uden, G. & Fröhlich, J. (eds). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag, Berlin. p. 3-29, 2009

KOS, J.; ŠUŠKOVIC, S.; VUKOVIC, M.; ŽIMPRAGA, S.; FRECE, J.; MATOSIĆ, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p.981–987, 2003.

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, Inc. 2009

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, v.15, p.67-78, 2004

LEVY, S.B., MARSHALL, B., Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, v. 10, p.S122–S129, 2004

LILLY, D.; STILLWELL, R.H. Probiotics growth - promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v.147, p.747-748, 1965

LIONG, M. T. AND SHAH, N. P. Acid and Bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal Dairy Science*, v. 88 p. 55-66, 2005

LIU, C.; ZHANG, Z.-Y.; DONG, K.; YUAN, J.-P.; GUOP, X.-K. Antibiotic Resistance of Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Marketed Foods and Drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, v.22, p. 401-412, 2009

LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

MANZONI, M.S.J.; CAVALLINI, D.C.U.; ROSSI, E.A. The effects of probiotics on blood lipids. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v.19, n.3, p. 351-360, 2008.

MARIANO, B. C. C.; SILVA, R. S.; LIMA C. P.; CARVALHO, A. K. F.; CHINELATE, G. C. B.; BARROS, L. D.; LIMA, E. C.; PINHEIRO, T. F.; Incidência de Patógenos e Caracterização Físico-química do Queijo de Coalho Artesanal e Industrial. CD do Simpósio IAFP América Latina – Resumos, 2008

MARTINS, F. dos S.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Estudo do potencial de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v.5, 2005.

MATHARA, J.M., SCHILLINGER, U., GUIGAS, C., FRANZ, C., KUTIMA, P.M., MBUGUA, S.K., SHIN, H.-K., HOLZAPFEL, W.H. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. From traditional maasai fermented milk products in Kenya. International Journal of Food Microbiology, v. 126, p. 57-64, 2008.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. International Journal of Food Microbiology, v.105, p.281–295, 2005.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. International Dairy Journal, v.12, p.173-182, 2002.

MCFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. Microbial Ecology in Health and Disease, p.193-207, 2000.

METCHNIKOFF, E. The prolongation of life. London: William Heinemann, 1907.

MILLER, J. H. Experiments in Molecular Genetics. p. 352-355, 1972

MOMBELLI, B., GISMONDO, M.R., The use of probiotics in medicinal practice. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 16, p. 531–536, 2000

NASSU, R.T.; MACEDO, B.A.; LIMA, M.H.P. Queijo de Coalho. Coleção Agroindústria Familiar. Embrapa Informação Tecnológica. v.1, p.40. Brasília, DF, 2006. Disponível em:<  
<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/117913/1/00077390.pdf>>. Acesso em: 25 de jan. de 2015.

NORIEGA, L.; CUEVAS, I.; MARGOLLES, A.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G. Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile. *International Dairy Journal*, v. 16 p. 850–855, 2006

PAINEAU, D.; CARCANO, D.; LEYER, G.; DARQUY, S.; ALYANAKIAN, M.A.; SIMONEAU, G.; BERGMANN, J.F.; BRASSART, D.; BORNET, F.; OUWEHAND, A.C. Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 53 p. 107-113, 2008

PAGNINI, C.; SAEED, R.; BAMIAS, G.; ARSENEAU, K. O.; PIZARRO, T. T.; COMINELLI, F. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.107, n.1, p 454 -459

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health*, n.29, p.4-8, 1974

PASCHOAL, V., NAVES, A., FONSECA, A. *Nutrição Clínica Funcional: Dos princípios à prática Clínica*. 1a Ed. revisada. São Paulo: VP editora; 2010.

PAULA, C.M. de; PORTELA, M.C.C.; NASCIMENTO, G.O.C. do; PEREIRA, S.C.; PEREIRA, J.O.P.; SANTOS, K.M.O. Desenvolvimento de sorvete potencialmente probiótico de leite de cabras adoçado com mel de abelhas africanizadas. In: *Anais do I Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA Bahia*, 2009. Salvador: SBCTA, 2009. v. 1

PIARD, J-C.; LE LOIR, Y.; POQUET, I.; LANGELLA, P. Bactérias lácticas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.2, n.8, p.80-84, 1999

PITINO, I.; RANDAZZO, C.L.; MANDALARI, G.; LO CURTO, A.; FAULKS, R.M.; LE MARC, Y.; BISIGNANO, C.; CAGGIA, C.; WICKHAM, M.S.J.; Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract: static and dynamic digestion systems. *Food Microbiology*, v. 27, p.1121-1127, 2010

PLÉ, C.; BRETON, J.; DANIEL, C.; FOLIGNÉ, B. Maintaining gut ecosystems for health: Are transitory food bugs stowaways or part of the crew? *International Journal of Food Microbiology*, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.015>

ROSS, R. P; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, p. 3-16, 2002.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; UEIJI, I.S.; SQUINZARI, M.M.; SILVA JUNIOR S.I.; VALDEZ, G.F. Effects of a novel soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 74, p. 213-216, 2000

SAAD, S. M. I.; Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 1, 2006

SAITO, V.S.T.; DOS SANTOS, T.F.; VINDEROLA, C.G.; ROMANO, C.; NICOLI, J.R.; ARAUJO, L.S.; COSTA, M.M.; ANDRIOLI, J.L.; UETANABARO, A.P.T. Viability and Resistance of Lactobacilli Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yogurt. *Journal of Food Science*, v. 79, n. 2, p. 208 – 213, 2014

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, p. 563-572, 1998.



SANDERS, M.E. Impact of probiotics on colonizing microbiota of the gut. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 45, n. 3, p115-119, 2011.

SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; ROCHA, C. R. C.; NASCIMENTO, J. C. F.; SOUZA LOPES, A. C.; BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G.; DE MELO FRANCO, B. D. G.; TODOROV, S. D. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. *Annals of Microbiology*, v. 64, p. 1463-1471, 2015

SANTOS, K.M.O.; EGITO, A.S.; BENEVIDES, S.D.; ALVES, R.R.N.; SAAD, S.M.I. Elaboração de queijo de cabra maturado potencialmente probiótico utilizando *Lactobacillus acidophilus*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS EM PRODUTOS LÁCTEOS. Campinas: ITAL, 2008. 1CD

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W.H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, v.15, p.1289-1297, 2005

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, n.2, p.361S-364S, 2001

SCHROETER, J.; KLAENHAMMER, T. Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 292, p. 1–6, 2009.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, v.83, n.4, p.894-907, 2000

SOUZA, C.H.B.; BURITI, F.C.A.; BEHRENS, J.H.; SAAD, S.M.I. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, p.871–877, 2008

SOUZA, C.H.B.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. LWT - Food Science and Technology, v.42, n.2, 2009

SUMATHY, R.; VIJAYALAKSHMI, M.; DEECARAMAN, M. A study on  $\beta$ -galactosidase of *Lactobacillus* sp from milk products and its applications. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, v.3 n.4, p. 138 – 148, 2012

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; BEGANOVIC, J.; PAVUNC, A. L.; HABKANIC, K.; MATOSIC, S. Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. Food Technology and Biotechnology, v. 48, n. 3, p. 296–307, 2010.

TEJERO-SARIÑENA, S.; BARLOWB, J.; COSTABILE, A.; GIBSON, G.G.; ROWLAND, I. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. Anaerobe, v. 18 p. 530-538, 2012

TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van Leeuwenhoek, v.76, p.115-137, 1999

THARMARAJ, N.; SHAH, N. P. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. International Food Research Journal v. 16 p. 261-276, 2009

TODOROV, S.D.; BOTES, M.; GUIGAS, C.; SCHILLINGER, U.; WIID, I.; WACHSMAN, M.B.; HOLZAPFEL, W.H.; DICKS, L.M.T. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology, v.104, p.465-477, 2008.

TROELSEN, J.T. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. Journal Biochimica Biophysica Acta, v. 1723 p. 19-32, 2005

UGARTE, M.B., GUGLIELMOTTI, D., GIRAFFA, G., REINHEIMER, J., HYNES, E. Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard argentinean cheese: genetic characterization and resistance to biological barriers. *Journal of Food Protection*, v. 69, n. 12, p. 2983-2991, 2006

VASCONCELOS, B.G.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Influence of the addition of probiotics and inulin on sensory acceptance of frozen açai (*Euterpe oleracea* Mart) dessert. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.45, supl.1, p.19, 2009

VASILJEVIC, T.; JELEN, P. Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and products using thermophilic lactic acid bacteria. *J. Innov. Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 2 p. 75-85, 2001

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 714– 728, 2008.

VÉLEZ, M. P.; DE KEERSMAECKER, S.C.J.; VANDERLEYDEN, J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, v. 276, p.140–148, 2007

VENTURA, M.; O'FLAHERTY, S.; CLAEISSON, M. J.; TURRONI, F.; KLAENHAMMER, T. R.; SINDEREN, D. V.; O'TOOLE, P. W. Genome-scale analyses of health promoting bacteria: probiogenomics. *Nature Reviews - Microbiology*, v. 7, p. 61-73, 2009

VINDEROLA, C.G.; COSTA, G.A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER J.A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal* Volume 12, pages 579–589, 2002

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, v.36, p.895-904, 2003

VINDEROLA, G.; CAPELLINI, B.; VILLARREAL, F.; SUÁREZ, V.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LTW – Food Science and Technology*, v. 41, n.9, p. 1678-1688, 2008

VITALI, B.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C. G.; SPISNI, E.; MACCAFERRI, S.; BRIGIDI, P.; GOBBETTI, M.; DI CAGNO, R. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiology* v. 31, p. 116-125, 2012.

XANTHOPOULOS, V.; ZTALIOU, I.; GAIER, W.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Differentiation of *Lactobacillus* isolates from infant faeces by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Journal of Applied Microbiology*, v. 87 p. 743-749, 1999

XIE, C.; LI, J.; WANG, K.; LI, Q.; CHEN, D. Probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea in older patients: A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease* v.13, p. 128 – 134, 2015.

ZAGO, M.; FORNASARI, M.E.; CARMINATI, D.; BURNS, P.; SUÁREZ, V.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; GIRAFFA, G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, v. 28, p. 1033 – 1040, 2011

---

Capítulo 3

Artigos Derivados da

Tese

---

## 5. ARTIGOS DERIVADOS DA TESE

A seguir serão apresentados os artigos derivados da tese submetidos para periódicos na área.

O primeiro artigo intitulado “**Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from coalho cheese from Brazil**” foi submetido à revista Journal of Biotechnology

O Segundo artigo intitulado “**Technological properties of lactic acid bacteria probiotic candidate isolated from coalho cheese from Brazil**” foi submetido à revista Food Control

## CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM COALHO CHEESE FROM BRAZIL

Cristiane Pereira de Lima<sup>1</sup>; Ana Paula Uetanabaro<sup>2</sup>; Giselle Maria Pereira Dias<sup>3</sup>; Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares<sup>3</sup>; Laura Maria Bruno<sup>4</sup>. Ana Lucia Figueiredo Porto<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal Baiano - IFBAIANO, Uruçuca - BA - Brazil;

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Ilhéus - BA – Brazil;

<sup>3</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife - PE - Brazil;

<sup>4</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Fortaleza - CE - Brazil

### ABSTRACT

The aim of this study was to characterize, with tests "in vitro", the probiotic potential of 24 lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from artisanal Coalho cheese from Pernambuco, Brazil. The gastrointestinal tract resistance (TGI), antimicrobial activity against intestinal pathogens, autoaggregation and coaggregation capacity, cell hydrophobicity,  $\beta$ -galactosidase activity, activity deconjugate bile salts for the production of bile salt hydrolase (BSH), sensitivity to antibiotics were evaluated. Of the 24 strains, 22 remained viable to simulated TGI. Among these, six were able to overcome all barriers with a reduction of only one log cycle. Two LAB (128 and 155) inhibited the growth of *Listeria monocytogenes* and two (64 and 174) inhibited *Escherichia coli*. The autoaggregation rate ranged from 27% to 96% and the strains were able to coaggregate with *Staphylococcus aureus* and *E. coli* reaching levels between 58% and 47%, respectively. The hydrophobicity percentage ranged from 5% to 57%. Four strains (46, 60, 106 and 128) were able to produce BSH. One LAB (106) was able to produce up to 604 Miller units of  $\beta$ -galactosidase. All strains were sensitive to five antibiotics and only two (37 and 98) were resistant to vancomycin (30 $\mu$ g) and norfloxacin (10g). The evaluated LAB showed promising probiotic characteristics. Eight strains were selected for further studies. Searches involving the technological potential of strains are being performed to investigate the possible use of these microorganisms into a functional product.

Key words: Dairy products, coalho cheese, probiotics.

## 1. INTRODUCTION

The word 'probiotics' originates from the Greek word 'for life'. According to FAO/WHO guidelines probiotics are defined as live organisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. This concept refers to the viable microorganisms that promote or support a beneficial balance of the autochthonous microbial population of the gastrointestinal tract (GIT) (Goktepe et al., 2006). The resistance to enteric pathogens, aid in lactose digestion, anti-colon cancer effect, small bowel bacterial overgrowth, and immune system modulation are some of the beneficial actions of probiotics bacteria (Lee and Salminen, 2009).

Certain criteria need to be met by a bacterium to qualify as a probiotic: be harmless for ingestion (safe), able to colonize the gut epithelium and, especially, able to resist harsh conditions found in the gastrointestinal tract (gastric acidity, bile salts, pepsin, pancreatin, and other enzymes) (Saad, 2006; Lee and Salminen, 2009). Therefore, the knowledge of these characteristics is important for the evaluation of possible positive and negative effects of probiotic consumption (Saarella et al., 2000).

In the past, the GIT was considered the main potential source of probiotic bacteria (Espinoza and Navarro, 2010). However, the scientific community has focused attention on fermented foods and recognized the autochthonous lactic microbiot of different foods with probiotic potential. Thus, the search of new probiotic strains, derived from dairy (Vinderola e Reinheimer, 2003; Cebrian et al., 2011; Zago et al., 2011) and non-dairy (Vitali et al., 2012; Botta et al., 2014; Saito et al., 2014) is justified by the possibility of detection strains with benefits to human health and with good technological performance.

Coalho cheese is a semi-hard cheese, typically produced and widely consumed in the Northeast of Brazil (Cavalcante et al., 2007). Several studies have isolated autochthonous lactic acid bacteria (LAB) in this cheese (Freitas et al., 2013; Santos et al., 2015) searching for strains with technological and/or probiotic features since most probiotic bacteria belong to LAB group. The main representatives of the LAB are *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, and *Weissella* (Jay, 2005). However, the *Lactobacillus* strains are characterized by large amount of research on their probiotic potential.



Thus, the aims of our research were to characterize the probiotic potential of 24 autochthonous strains of LAB isolated from Coalho cheese produced to Pernambuco state, Brazil.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Bacterial strains and culture conditions

LAB strains were isolated from artisanal Coalho cheese produced in the Pernambuco state, Brazil, at stored (-80°C) in Man Rogosa Sharpe (MRS, Oxoid) broth supplemented with 15% (v/v) glycerol. Prior to assays, strains were transferred to MRS broth and cultivated for 37°C/24h at least three times in aerobic conditions.

### 2.2. Resistance to simulated gastrointestinal

To verify the strains tolerance to GIT a sequence of tests simulating gastrointestinal conditions were used according to Burns et al., (2011) with modifications. LAB were inoculated into saliva solution ( $\text{CaCl}_2$  0.22 g L<sup>-1</sup>, NaCl 16.2 g L<sup>-1</sup>, KCl 2.2 g L<sup>-1</sup> and  $\text{NaHCO}_3$  1.2 g L<sup>-1</sup>) containing bovine pepsin 0.3% w/v (Sigma-Aldrich). Immediately, after mixture, the pH was quickly lowered to 2.0, with HCl 5N and incubated in a water bath for a period of 90 min at 37°C. After simulated saliva-gastric digestion, 1 mL of sample was centrifuged at 4.000 g, 5 min, 5°C, the supernatant were removed, the pellet was washed twice with phosphate buffered saline (PBS) buffer (pH 7.4) and resuspended to the original volume in 1% (w/v) bovine bile (Sigma-Aldrich) at pH 8.0. Cell suspension was incubated in a water bath for 10 min/37°C. After this incubation, a volume was centrifuged, the supernatant removed, and the pellet was washed as described above and resuspended to the original volume in 0.3% (w/v) bovine bile 0.1% (w/v) pancreatin (Sigma-Aldrich) at pH 8.0. Again, cell suspension was incubated in a water bath at 37°C/90min. Cell viability was monitored before the beginning of the first test and at the end of each stage by plating on MRS agar and incubation at 37°C/48h. The test was performed in triplicate.

### 2.3. Antimicrobial activity

Antimicrobial activity of LAB against intestinal pathogens (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 35218) was evaluated by the well-diffusion agar assay according to Vinderola et al. (2008) with modifications. Cell-free supernatants (CFS) of LAB were obtained by centrifugation of overnight cultures (12000g, 5min, 5°C), and sterilization by filtration through a 0.22mm pore filter (Millipore). Tubes with 20 mL of nutrient agar (Merck) (for *Salmonella typhi*, *S. aureus* and *E. coli*), or Brain heart infusion (BHI) agar (Merck) (for *L. monocytogenes*), melted and cooled to 45°C, were inoculated (2%, v/v) with pathogenic cultures (OD<sub>560</sub> 0.8), vigorously homogenized and poured onto Petri dishes. Wells of 10mm in diameter were made in the agar layer of plates containing pathogens, and 180µL of the CFS from each strain were placed in a well. Plates were incubated overnight at 37°C and the diameters of the inhibition halos were measured.

### 2.4. Autoaggregation and coaggregation with pathogens strains.

Autoaggregation and coaggregation assays were performed according to Kos et al., (2003) modified as follows. Cell suspension of each LAB (approximately 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>) was prepared to determine autoaggregation and coaggregation. Tubes containing only the LAB and tubes with LAB and pathogenic bacteria (*S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 35218) were vigorously mixed (10 seconds) and then left at room temperature (20°C) for 5 hours. An aliquot of cell suspension was picked up every each time and absorbance (OD<sub>600</sub>) was measured. The autoaggregation percentage is expressed as  $1 - (A_t/A_0) * 100$ , where  $A_t$  represents the absorbance at time  $t = 1, 2, 3$  or  $4$  h and  $A_0$  the absorbance at  $t = 0$ . The percentage of coaggregation was calculated using the equation of Handley et al., (1987) as  $[1 - 2A_{mix}/(A_{probio} + A_{pathog})] \times 100$ , where  $A_{probio}$  and  $A_{pathogen}$  represented each of the two strains in the control tubes and  $A_{mix}$  denoted the mixture.

## 2.5. Hydrophobicity

The cell hydrophobicity was determined according to Vinderola and Reinheimer (2003). Cultures of the strains were harvested in the stationary phase by centrifugation (12000g, 5min, 5°C), washed twice in 50mM of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.5) buffer and resuspended in the same buffer. The cell suspension was adjusted to an A<sub>560nm</sub> value of approximately 1.0 (OD<sub>560</sub> 1.0) with the buffer and 3 ml of the bacterial suspensions were put in contact with 0.6ml of n-hexadecane (Merck Schuchardt, Germany) and vortexed for 120s. After separating the two phases, the aqueous phase was carefully removed and the A<sub>560nm</sub> was measured. The decrease in the absorbance of the aqueous phase was taken as a measure of the cell surface hydrophobicity (H %), which was calculated with the formula  $H \% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$ , where A<sub>0</sub> and A are the absorbance before and after extraction with n-hexadecane, respectively. Assays were performed in triplicate.

## 2.6. β-galactosidase activity

β-galactosidase activity (β-gal) in whole cells was determined according to the method of Miller (1972) modified by Vinderola and Reinheimer (2003). Overnight cultures of strains were harvested in the stationary phase by centrifugation (12000g, 5min, 5°C), washed twice in 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.0), inoculated (1% v/v) in MRS-lac broth and incubated at 37°C for 24h. After incubation period, cells were harvested and washed twice as previously described and A<sub>560nm</sub> was adjusted to approximately 1.0 (OD<sub>560</sub> 1.0) with the same buffer. One milliliter of the cell suspension was permeabilized with 50μL of toluene/acetone (1:9 v/v) solution, vortexed for 7 min and immediately assayed for β-galactosidase activity. An aliquot of 100 μl of the permeabilized cell suspension was placed in a tube and 900 μl of phosphate buffer and 200μl of o-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside (ONPG, Sigma) (4 mg ml<sup>-1</sup>) were added. Tubes were placed into a water bath (37°C) for 15 min. Then, 0.5 ml of 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added to each tube to stop the reaction. Absorbance values at both 420 and 560nm were recorded for each tube. Enzymatic activity (β-gal; Miller units) was calculated as follows:  $1000x [(A_{420} * 1.75 * A_{560}^b) / (15min * 1ml * A_{560}^a)]$ , where A<sub>560</sub><sup>a</sup> was the absorbance just before assay and A<sub>560</sub><sup>b</sup> was the absorbance value of the reaction mixture.

## 2.7. Bile salt deconjugation ability

The activity of the strains to produce bile salt hydrolase (BSH) was determined according to Zago et al., (2011). Bile salt plates were prepared by adding 0.5% (w/v) of sodium salts (Sigma) of taurocholic acid (TC), taurodeoxycholic acid (TDC), glycocholic acid (GC) and glicodeoxycholic acid (GDC) to MRS agar containing 0.37 g/l CaCl<sub>2</sub>. The strains were streaked on the media and the plates were anaerobically (Anaerocult® A - Merck Millipore) incubated at 37°C for 72 h. The presence of halos around colonies or white opaque colonies indicated BSH activity. *Enterococcus faecium* ATCC 6569 was used as BSH-positive strain. The inoculum of each strain in MRS without supplementation was included as negative control.

## 2.8. Antibiotic resistance

Disc diffusion method was used to evaluate the antibiotic susceptibility of LAB. Tests were done according to the criteria of the National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997) with modifications. Cells were grown in MRS broth at 37°C for 18h to obtain a density of approximately 10<sup>7</sup> cells/ml. Cell suspension were inoculated in MRS agar plates with the aid of a sterile “swab”. Antibiotic discs were dispensed on to the media and incubated at anaerobic conditions at 37°C for 24h. Seven discs (LABORCLIN®) of antibiotics were tested: ampicillin (AM 10µg), erythromycin (E 15µg), vancomycin (VA 30µg), chloramphenicol (C 30µg), tetracycline (TE 30µg) streptomycin (S 300µg) norfloxacin (NOR 10µg). Inhibition-zone diameters were measured after incubation and susceptibility is expressed in terms of resistance (R), moderate susceptibility (MS), and susceptibility (S), based in CLSI guidelines M100- S15 for the standard strains (NCCLS). Each experiment was performed in triplicate.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Resistance to simulated gastrointestinal

LAB strains evaluated showed high resistance to the combined stress at the various steps of the simulated gastrointestinal tract. All strains survived to simulated gastric juice and exposure to pH 2.5 and duodenal juice simulated (Table 1). However, 22 LAB remained viable after the passage to simulated GIT conditions. Six strains (15, 16, 37, 126, 143 and 174) were able to overcome all barriers with a reduction of until one log cycle (Figure 1).

Several authors have reported the resistance to TGI of strains isolated from different sources. Vitali et al. (2012) reported that 17 of the 48 (35%) autochthonous lactic acid bacteria from raw fruits and vegetables survived under simulated gastric and intestinal conditions maintained high cell densities (decreased from  $10^9$  to  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>). In a recent research, Saito et al. (2014) concluded that strains of lactobacilli isolated from the fermentation of cocoa survived the barrier of simulated TGI and *Lactobacillus fermentum* showed higher resistance than *Lactobacillus plantarum* to the simulated gastrointestinal digestion at pH 3, losing only approximately one log order of cell viability. Pitino et al. (2010) also observed good capacity of the probiotics strains to survive and grow during digestion and concluded that the lactic acid production, probably produced from probiotic strains as end product of sugar, can assist resistance of the strains.

In our study, major decreases in the viability of strain cells (around 4 log orders) were registered after the incubation with bile, with cell counts at the end of the simulated GIT conditions between  $10^3$  and  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Guglielmotti et al. (2007) also reported poor bile resistance of commercial strains, in the presence of 0.3% bile strains grew only from 3.4% to 15.1% in comparison to the control.

To exhibit their beneficial effects, probiotic bacteria need to reach its final destination, it is necessary to be tolerant to acid and bile salts (Lee and Salminen, 2009). Thus, ability to survive the stress of GTI is the first requirement for a probiotic bacterium. Results obtained in the present study provide information on principal factors affecting the viability of the tested strains, such as the initial pH of the stomach and its decrease during gastric digestion.

### 3.2. Antimicrobial activity

Cell-free supernatants from two microorganisms (strains 128 and 155) showed antimicrobial activity against *L. monocytogenes* ATCC 7644. The inhibitory zones was 5.3 mm (strain 128) and 8.1 mm (155). Other two (strains 64 and 174) inhibited the growth of *E. coli* ATCC 35218. The inhibition were 4.2 mm (64) and 6.3 mm (174). *Salmonella typhi* ATCC 6539 and *S. aureus* ATCC 25923S was not inhibited by LAB evaluated.

Development of mechanisms to survive in competition with other microorganisms in the complex GIT is a desirable feature in probiotic strain. Guedes Neto et al. (2005) also observed in your research antagonistic activity of the lactic acid bacteria against pathogens isolated from artisanal and industrial “coalho” cheese samples, as well as against pathogenic strains from other sources. Vinderola et al. (2008) reported inhibition zones in plates with pathogenic microorganisms, *Salmonella* and *L. monocytogenes* were the most sensitive since they were clearly inhibited by 52% of the probiotics strain evaluated.

LAB strains, as probiotic agents, to interfere with pathogens by different mechanisms associated with competition for nutrients and production of antimicrobial substances (Balcázar et al., 2008; Lee and Salminen, 2009). The inhibition observed in our study probably was organic acid production, such as lactic acid or acetic acid, requiring further studies to indicate the cause of inhibition.

### 3.3. Autoaggregation and coaggregation.

LAB evaluated showed autoaggregation percentage ranging from 27.27% (strain 99) to 96.43% (strain 155) (Table 2). Strains tested showed the best coaggregation result with *S. aureus*, where reached levels of 58.33% of coaggregated bacteria (strain 42), for *E. coli* the best result of coaggregation was 47.83% with strain 46 (Table 1).

Our results are similar to results reported by several studies with high percentage of autoaggregation and moderate coaggregation. Janković et al. (2012)

investigated the aggregation and coaggregation ability of three potential probiotic strains of *Lactobacillus plantarum* and observed that after 24 hours of broth cultivation, the autoaggregation rate was at least 80% and coaggregation with *E. coli*, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* was 41,5%, 40,5%, 37,4%, respectively. Balakrishna, (2013) evaluated the adhesion and aggregation abilities of four potential probiotic *Lactobacillus* strains isolated from guppy and observed aggregating immediately of three strains, reaching 96% and forming a precipitate and resulting in a clear solution. However, these strains were able of aggregate only 27% with *Flavobacterium* sp.

On other hand, Saran et al. (2012) evaluated *Lactobacillus* strains obtained from the National Collection of Dairy Cultures (NCDC) and reported sedimentation rate of strains with level 35-38% after 3h incubation and 40-43% after incubation of 5h.

Autoaggregation of probiotic strains is the first step for adhesion to intestinal epithelial cells and has been considered a prerequisite for colonization in the gastrointestinal system (Kos et al., 2003; Janković et al., 2012). Moreover, bacteria with co-aggregation abilities may form a barrier preventing colonization by pathogenic microorganisms (Del Re et al., 2000; Collado et al., 2007; Todorov et al., 2008).

### 3.4. Hydrophobicity

LAB evaluated presented levels of hydrophobicity ranged from 5.13% (strain 155) to 57.61% (strain 15) (Table 2). Guglielmotti et al. (2007) found similar results and reported cell hydrophobicity *Lactobacillus* strains ranged from 6.5 to 62.5%. Vinderola et al. (2008) also investigated the cellular hydrophobicity of bacteria of the same genus and values reported by these authors ranged 15 to 53%.

Cell surface hydrophobicity is a nonspecific mechanism associated to complex process of adhesion to different surfaces (Kos et al., 2003; Lee and Salminen, 2006, Todorov et al., 2008). This feature may affect autoaggregation and consequently adhesion of bacteria to the intestinal mucosa. So, is an important prerequisite for probiotics to control the balance of the intestinal microbiota, to successful colonization and, thereafter, beneficial effects will last longer in gastrointestinal tract (Kos et al., 2003). The adhesion of microorganisms to the hexadecane is a way to estimate the ability of a strain to adhere to epithelial cells (Vinderola et al., 2008).

### 3.5. $\beta$ -galactosidase activity

A total of 20 strains tested were able to produce  $\beta$ -galactosidase enzyme. The  $\beta$ -galactosidase values found ranged 2 to 604 Miller units (strain 46) (Table 2). The results found in our study were higher than those found by other researchers. Shukla et al. (2014) reported that *Leuconostoc mesenteroides* evaluated showed  $\beta$ -galactosidase activity with 94.24 Miller. On the other hand, the  $\beta$ -galactosidase activity values observed for strains evaluated were lower than those previously reported by Vinderola et al. (2003) and by Gheyntanichi et al. (2010) where highest enzymatic value was observed.

Ingesting probiotic microorganisms producing this enzyme would aid in solution of the problems of discomfort that occurs after digestion of lactose in the intestine.

### 3.6. Bile salt deconjugation ability

Strains evaluated presented halos around colonies after growth in MRS-GDCA (106 and 128) and white opaque colonies after growth in MRS-TDCA (46, 60, 106 and 128), evidencing the ability to hydrolyze the sodium glycodeoxycholate and sodium taurodeoxycholate, respectively. All microorganisms evaluated were able to grow in the presence of sodium taurodeoxycholate, taurocholic acid and glycocholic acid. However, five strain not show full resistance to sodium glycodeoxycholate (Table 1).

Zago et al., (2011) reported similar results in your study. All strains evaluated for these authors demonstrated the ability to hydrolyze the sodium glycodeoxycholate and sodium taurodeoxycholate.

The bile salt hydrolase (BSH) activity leads to lower blood serum cholesterol levels and has been detected in Lactic acid bacteria in several researches (Tanaka et al., 1999; Vinderola and Reinheimer, 2003; Liong and Shah, 2005). In addition, conjugated bile salts are considered toxic and the deconjugation of bile salts to primary bile salts can be a detoxification mechanism of important to bacterial



associated to the human GIT such probiotics (De Smet et al., 1995) Thus, probiotic strains may have a major role to play in the cholesterol lowering mechanism.

### 3.7. Antibiotic resistance

All strains tested were susceptible (S) to five antibiotics tested: ampicillin (AM 10 µg), erythromycin (E 15 µg), chloramphenicol (C 30 µg), tetracycline (TE 30 µg) and streptomycin (S 300 µg). Only two strains (37 and 98) were resistant (R) to vancomycin (VA 30 µg) and norfloxacin (NOR 10 µg) (Table 2).

Resistance to the antibiotics is in accordance with the findings of Cebeci and Gurakan, (2002) and Liu et al., (2007). These authors also reported that LAB evaluates were resistant to vancomycin. However, there has been no indication that vancomycin resistant bacteria can transfer this resistance to other bacteria, but this possibility has to be taken into consideration (D'aimmo et al., 2007).

Antibiotic resistance has become an increasingly common characteristic in microorganisms. The indiscriminate use of antibiotics in human and veterinary medicine may promote and encourage the occurrence this resistance (Robredo et al., 2000). Knowledge of susceptibilities to antibiotics of potential probiotic strains is necessary to ensure the safety of these microorganisms, although this feature may change frequently.

### 3.8. Selection of candidate probiotic strains

The selection of strains was based on the results obtained in the tests and compared to the results found in studies of other authors. Resistance to gastrointestinal tract, antimicrobial activity against pathogens, hydrophobicity values above 40%, autoagregação levels above 75%, coaggregation with pathogens above 40%, β-galactosidase production over 50 Miller units, BSH production, and sensitivity to antibiotics were considered for selection. A total of 24 strains evaluated, eight BAL showed four or more of these criteria and were selected for further studies. Among these eight strains, two stood out and were selected for the development of a functional product.

#### 4. CONCLUSION

The results of this research indicate that the evaluated LAB showed promising characteristics to be selected as probiotic strains. Eight strains were selected for further trials involving the possible use of this microorganism into a functional product. Two stood out and were selected for the development of a functional product. Strain 15 was chosen because of its resistance to gastric barriers. On the other hand, strain 106 was also selected for being able to deconjugate bile salts, high percentages of autoaggregation and coaggregation, and  $\beta$ -galactosidase production. Studies involving the technological potential of all strains are being performed. The strains shall be subjected to *in vivo* tests for comparison of results.

## 5. REFERENCES

1. Balakrishna, A. (2003) In vitro Evaluation of Adhesion and Aggregation Abilities of Four Potential Probiotic Strains Isolated from Guppy (*Poecilia reticulata*). Brazilian archives of biology and technology, volume 56, issue 5, pages 793-800
2. Balcázar, J.L.; Vendrell, D.; Blas, I.; Ruiz-Zarzuola, I.; Muzquiz, J. L.; Girones, O. (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture, volume 278, pages 188-191
3. Botta, C., Langerholc T., Cencic A., Cocolin L. (2014) In Vitro Selection and Characterization of New Probiotic Candidates from Table Olive Microbiota. Plos One, volume 9, issue 4, pages 1 - 15
4. Burns, P.; Vinderola, G.; Reinheimer, J.; Cuesta, I.; Reyes-Gavilán C. G.; Ruas-Madiedo, P. (2011) Technological characterization and survival of the exopolysaccharide-producing strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 193 and its bile-resistant derivative 193+ in simulated gastric and intestinal juices. Journal of Dairy Research, volume 78, pages 357-364
5. Cavalcante, J.F.M.; Andrade, N.J.; Furtado, M.M.; Ferreira, C.L.L.F.; Pinto, C.L.O.; Elard, E. (2007) Processamento de queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. Ciência e Tecnologia de Alimentos, volume 27, issue1, pages 205-214
6. Cebeci, A.; Gurakan, C. (2002) Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiology, volume 20, pages 511-518

7. Cebrián, R.; Baños, A.; Valdivia, E.; Pérez-Pulido R.; Martínez-Bueno M.; Maqueda, M.; (2011) Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*, volume 30, pages 59-67
8. Collado, M. C.; Meriluoto, J.; Salminen, S. (2007) Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, volume 71, pages 71-74
9. D'aimmo, M. R.; Modesto, M.; Biavati, B. (2006) Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, volume 115, pages 35-42
10. De Smet, I.; Van Hoorde, L.; Vande Woestyne, M.; Christiaens, H. Verstraete, W. (1995), Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, volume 79, pages 292–301
11. Del Re, B.; Sgorbati, B.; Miglioli, M.; Palenzona, D. (2000) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, volume 31, pages 438–442
12. Espinoza, Y. R.; Navarro Y.G. (2010) Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* volume 27, pages 1–11
13. FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada (April 30 and May 1, 2002).

14. Freitas, W. C.; Travassos, A. E. R; Maciel. J. F. (2013) Characterization of lactic acid bacteria in coalho cheese and antagonism to some pathogenic food-related bacteria. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, volume 72, issue 2, pages 131-7
15. Gheyntanchi, E.; Heshmati, F.; Shargh, B. K.; Nowroozi, J.; Movahedzadeh, F. (2010) Study on b-galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *African Journal of Microbiology Research*, volume 4, issue 6, pages 454-458
16. Goktepe, I.; Juneja, V.K.; Ahmedna, M. (2006) *Probiotics in food safety and human health*. Boca Raton: Taylor & Francis, 494p.
17. Guedes Neto, L.G.; Souza, M.R.; Nunes, A.C.; Nicoli, J.R.; Santos, W.L.M. (2005) Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, volume 57, issue 2, pages 245-250
18. Guglielmotti, D. M.; Briggiler Marco', M.; Golowczycb, M.; Reinheimer, J. A.; Quiberoni, A. del L. (2007) Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal*, volume 17, pages 916–925
19. Janković, T.; Frece, J.; Abram, M.; Gobin, I. (2012) Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of sanitary*, volume 6, issue 1, pages 19 – 24
20. JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. *Modern Food Microbiology* 7th edition. Springer Science + Business Media. New York, NY, 2005

21. Kos, B.; Kovic J. S.; Vukovic, S.; Impraga, M. S.; Frece, J.; Matos, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, volume 94, issue 981-987
22. Lee, K.Y. and Salminen, S., (2009) *Handbook of probiotics & prebiotics* 2nd ed. New Jersey: John Wiley and sons, pp. 177-540.
23. Liong, M.T.; Shah, N.P. (2005) Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *International Dairy Journal*, volume 15, pages 391–398
24. Liu, C.; Zhang, Z.-Y.; Dong, K.; Yuan, J.-P.; Guop, X.-K. (2009) Antibiotic Resistance of Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Marketed Foods and Drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, volume 22, pages 401-412
25. Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. New York, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory.
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1997.
27. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS document M100-S15. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 8th ed, NCCLS: Wayne; 2004

28. Pitino, I., Randazzo, C.L., Mandalari, G., Lo Curto, A., Faulks, R.M., Le Marc, Y., Bisignano, C., Caggia, C., Wickham, M.S.J., (2010) Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract: static and dynamic digestion systems. *Food Microbiology*, 27, pages 1121-1127
29. Robredo, B., Singh, K.V., Baquero, R., Murray, B.E., Torres, C., (2000) Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *International Journal Food Microbiology*, volume 54, pages 197–204
30. Saad, S. M. I. (2006) Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, volume 42, issue 1
31. Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J. and Matilla S. T. (2000) Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, volume 84, pages 197-215
32. Saito, V.S.T.; dos Santos, T.F.; Vinderola, C.G.; Romano, C.; Nicoli, J.R.; Araujo, L.S.; Costa, M.M.; Andrioli, J.L.; Uetanabaro, A.P.T. (2014) Viability and Resistance of Lactobacilli Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yogurt. *Journal of Food Science*, volume 79, issue 2, pages 208 – 213
33. Santos, K. M. O.; Vieira, A. D. S.; Rocha, C. R. C.; Nascimento, J. C. F.; Souza Lopes, A. C.; Bruno, L. M.; Carvalho, J. D. G.; De Melo Franco, B. D. G.; Todorov, S. D. (2015) Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. *Annals of Microbiology*, volume 64, pages 1463-1471
34. Saran, S; Bisht, M.S.; Singh, K.; Teotia, U.V.S. (2012) Comparing Adhesion Attributes of two Isolates of *Lactobacillus Acidophilus* for Assessment of

35. Shukla, R.; Iliev, I.; Goyal, A. (2014) *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 as probiotic and its dextran with anticancer properties. Journal Bioscience Biotechnology, volume 3, pages 79-87
36. Tanaka, H.; Doesburg, K.; Iwasaki, T.; Mierau, I. (1999) Screening of Lactic Acid Bacteria for Bile Salt Hydrolase Activity. Journal Dairy Science, volume 82, pages 2530–2535
37. Todorov, S. D.; Botes, M.; Guigas, C.; Schillinger, U.; Wiid, I.; Wachsman, M.B.; Holzapfel, W.H.; Dicks, L.M.T. (2008) Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology. volume 104, issue 465–477, pages 455 - 477
38. Vinderola, G.C.; Reinheimer, J.A. (2003) Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research international, volume 36, pages 895-904
39. Vinderola, G.; Capellini, B.; Villarreal, F.; Suárez, V.; Quiberoni, A.; Reinheimer, J. (2008) Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. LWT – Food Science and Technology, volume 41, issue 9, pages 1678-1688
40. Vitali, B.; Minervini, G.; Rizzello, C. G.; Spisni, E.; Maccaferri, S.; Brigidi, P.; Gobbetti, M.; Di Cagno, R. (2012) Novel probiotic candidates for humans



isolated from raw fruits and vegetables. Food Microbiology, volume 31, pages 116-125

41. Zago, M.; Fornasari, M.E.; Carminati, D.; Burns, P.; Suárez, V.; Vinderola, G.; Reinheimer, J.; Giraffa, G. (2011) Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. Food Microbiology, volume 28, pages 1033 – 1040

## 6. Figures

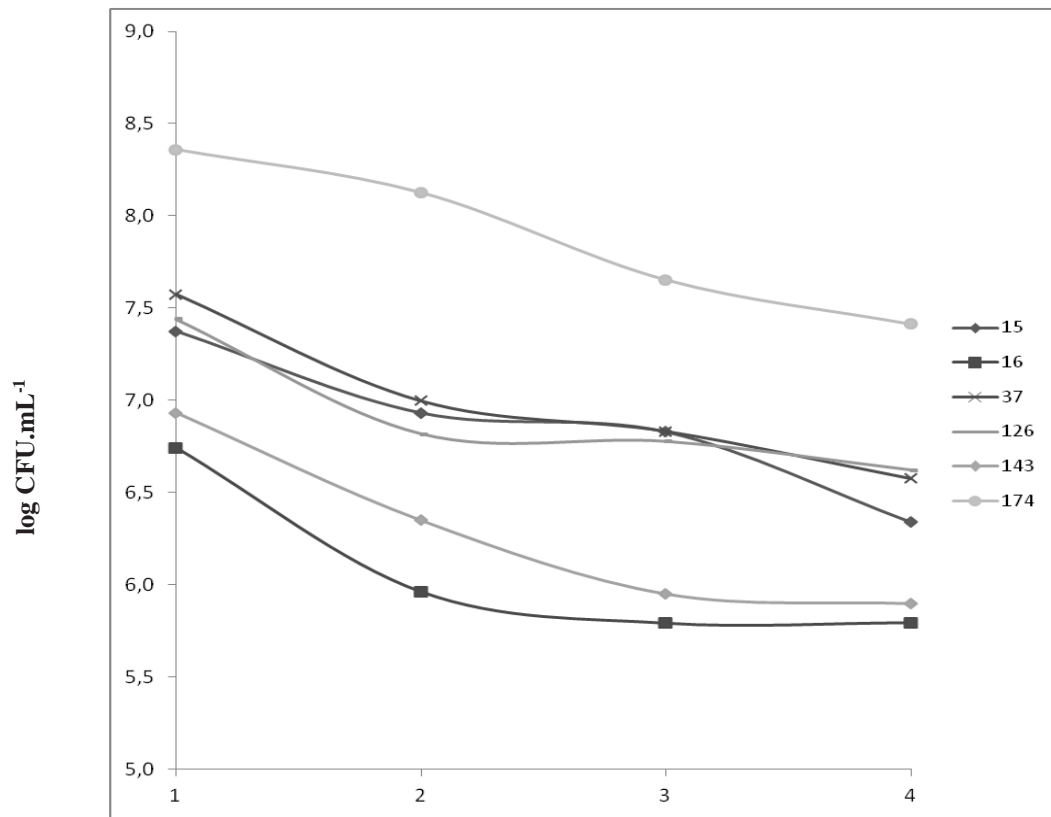


Figure 1– Cell counts ( $\log \text{CFU.mL}^{-1}$ ) of LAB in initial count (1) after simulated gastric digestion at pH 2.0 in saliva gastric exposure (2), after exposure to duodenal juice simulated (3), and after exposure to ileo juice simulated (4). Values are means of 3 replicates.

## 7. Tables

**Table 1:** Counts (log CFU.mL<sup>-1</sup>) of LAB in simulated TGI (Values are means ( $\pm$ SD) of 3 replicates). Growth and deconjugation of bile salts.

Strain	Counts (log CFU) in simulated TGI <sup>a</sup>					Deconjugation of bile salts <sup>c</sup>			
	1	2	3	4	$\Delta$ log cfu <sup>b</sup>	TDC	GDC	TC	GC
15	7.4	6.9	6.9	6.4	1.0	g	g	g	g
16	6.7	6.0	5.8	5.8	0.9	g	g	g	g
17	6.4	4.6	3.9	3.6	2.8	g	g	g	g
37	7.6	7.0	6.8	6.6	1.0	g	-	g	g
40	7.7	6.5	4.6	4.4	3.3	g	g	g	g
42	6.9	5.6	5.0	4.9	2.0	g	g	g	g
46	7.9	5.9	4.8	4.7	3.2	+	g	g	g
60	7.9	4.8	4.1	3.9	4.0	+	g	g	g
64	8.1	6.7	4.0	3.8	4.3	g	g	g	g
68	7.9	6.4	4.5	4.1	3.8	g	-	g	g
76	8.0	6.7	4.8	4.2	3.8	g	g	g	g
98	7.6	3.8	1.3	0.0	7.6	g	g	g	g
99	7.4	5.7	5.0	4.1	3.3	g	g	g	g
106	7.6	6.9	5.6	5.1	2.5	++	+	g	g
110	6.7	5.6	4.0	3.1	3.0	g	g	g	g
117	7.6	3.0	3.1	3.0	4.6	g	g	g	g
126	7.4	6.8	6.8	6.6	0.8	g	g	g	g
128	6.7	5.5	4.6	3.5	3.2	+	+	g	g
143	6.9	6.3	5.8	5.9	1.0	g	g	g	g
145	7.6	5.8	3.8	3.1	4.5	g	g	g	g
147	8.0	3.9	1.6	0.0	8.0	g	-	g	g
155	7.9	4.9	4.7	3.1	4.8	g	-	g	g
158	7.1	5.4	3.6	3.1	4.0	g	g	g	g
174	8.4	8.1	7.7	7.3	0.9	g	g	g	g

**a:** 1: Cell counts initial; 2: after simulated gastric digestion at pH 2.0 in saliva gastric exposure; 3: after exposure to duodenal juice simulated; 4: after exposure to ileo juice simulated  
**b:** range between the initial and final count (after exposure to simulated TGI) **c:** TC: sodium taurocholate. TDC: sodium taurodeoxycholate. GC: sodium glycocholate. GDC: sodium glicodeoxycholato; —: no growth; g: growth; +: growth and bile salt deconjugation; ++: growth and strong bile salt deconjugation

**Table 2:** Probiotics characteristics for lactic acid bacteria (mean±standard deviation, n=3)

Strain	%H <sup>a</sup>	Autoaggregation <sup>b</sup>	Coaggregation <sup>c</sup>		β Gal <sup>d</sup>	Antibiotic resistance <sup>e</sup>						
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		S	C	E	AM	TE	VA	NOR
15	57.61 ± 2.13	61.23 ± 2.81	34.13 ± 1.37	36.74 ± 3.10	6.34 ± 0.88	S	S	S	S	S	S	S
16	45.91 ± 3.80	89.92 ± 1.36	46.67 ± 0.00	27.78 ± 6.94	1.67 ± 0.33	S	S	S	S	S	S	S
17	39.05 ± 2.06	76.39 ± 2.64	35.16 ± 4.68	28.19 ± 0.33	72.90 ± 7.91	S	S	S	S	S	S	S
37	5.83 ± 0.51	75.53 ± 2.51	44.43 ± 4.01	28.19 ± 0.33	21.39 ± 6.43	S	S	S	S	S	R	R
40	8.53 ± 0.97	72.96 ± 0.69	36.00 ± 0.00	52.22 ± 1.92	2.00 ± 0.72	S	S	S	S	S	S	S
42	39.44 ± 2.07	77.95 ± 3.61	49.76 ± 4.14	58.33 ± 4.22	2.62 ± 0.53	S	S	S	S	S	S	S
46	49.18 ± 3.24	81.87 ± 0.63	47.83 ± 0.00	56.04 ± 1.90	604.88 ± 33.25	S	S	S	S	S	S	S
60	51.13 ± 1.64	88.00 ± 1.53	46.30 ± 3.21	24.52 ± 3.19	131.44 ± 9.87	S	S	S	S	S	S	S
64	31.22 ± 2.90	83.43 ± 1.52	41.90 ± 1.65	30.66 ± 0.19	5.11 ± 0.42	S	S	S	S	S	S	S
68	9.94 ± 2.36	88.45 ± 2.06	15.74 ± 5.61	46.02 ± 2.75	9.32 ± 0.41	S	S	S	S	S	S	S
76	52.20 ± 0.78	75.81 ± 1.47	53.19 ± 2.05	44.42 ± 1.99	0.54 ± 0.19	S	S	S	S	S	S	S
98	9.56 ± 1.87	49.19 ± 0.70	29.72 ± 2.65	15.83 ± 2.67	3.94 ± 1.62	S	S	S	S	S	R	R
99	7.70 ± 0.63	27.27 ± 0.37	7.94 ± 5.50	23.75 ± 0.60	44.88 ± 6.52	S	S	S	S	S	S	S
106	23.23 ± 2.07	76.27 ± 2.11	39.11 ± 3.47	49.97 ± 1.56	219.72 ± 8.53	S	S	S	S	S	S	S
110	45.92 ± 2.10	86.54 ± 2.20	48.76 ± 3.62	43.30 ± 2.90	41.62 ± 1.62	S	S	S	S	S	S	S
117	47.46 ± 2.82	92.13 ± 5.16	40.21 ± 6.01	19.01 ± 2.36	51.22 ± 3.87	S	S	S	S	S	S	S
126	10.99 ± 0.90	75.68 ± 3.77	14.07 ± 5.13	53.63 ± 2.51	38.84 ± 1.94	S	S	S	S	S	S	S
128	26.63 ± 1.42	84.07 ± 1.07	24.85 ± 4.20	45.38 ± 2.39	31.93 ± 0.36	S	S	S	S	S	S	S
143	10.46 ± 1.80	90.12 ± 1.57	7.89 ± 2.82	20.58 ± 1.00	0.00 ± 0.00	S	S	S	S	S	S	S
145	6.73 ± 2.24	92.48 ± 3.19	30.16 ± 2.75	15.49 ± 2.32	0.90 ± 0.57	S	S	S	S	S	S	S
147	4.93 ± 0.77	77.02 ± 2.79	44.97 ± 0.84	46.38 ± 3.05	3.83 ± 0.23	S	S	S	S	S	S	S
155	5.13 ± 0.64	96.43 ± 3.97	39.12 ± 5.08	17.83 ± 0.31	14.33 ± 0.58	S	S	S	S	S	S	S
158	6.13 ± 0.99	93.65 ± 1.72	47.62 ± 4.12	45.07 ± 3.39	0.32 ± 0.31	S	S	S	S	S	S	S
174	5.86 ± 1.60	88.58 ± 1.72	13.13 ± 2.40	24.21 ± 0.69	25.11 ± 5.25	S	S	S	S	S	S	S

a: Hydrophobicity percentage. b: Autoaggregation percentage; c: Coaggregation percentage

d: β-galactosidase activity in Miller units. e: S - streptomycin (300 µg); C - chloramphenicol (30 µg); E - erythromycin (15 µg); AM - ampicillin (10 µg); TE - tetracycline (30 µg); VA - vancomycin (30 µg); NOR - norfloxacin (10 µg) S: sensible R : Resistant

# TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA PROBIOTIC CANDIDATE ISOLATED FROM COALHO CHEESE FROM BRAZIL

Cristiane Pereira de Lima<sup>1</sup>; Ana Paula Uetanabaro<sup>2</sup>; Giselle Maria Pereira Dias<sup>3</sup>; Maria de Fátima Borges<sup>4</sup>; Josué de Souza Oliveira<sup>1</sup>; Laura Maria Bruno<sup>4</sup>; Ana Lucia Figueiredo Porto<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal Baiano - IFBAIANO, Uruçuca - BA - Brazil;

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Ilhéus - BA – Brazil;

<sup>3</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife - PE - Brazil;

<sup>4</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Fortaleza - CE - Brazil

## ABSTRACT

The search of new probiotic strains of sources different for use in fermented products is currently an important topic with industrial and commercial impacts. To use microorganisms for this purpose its important know their technological properties and evaluate their survival in the food used as a vehicle after processing and during its shelf life. The aim of this study was to characterize the technological potential of 24 lactic acid bacteria (LAB) candidate probiotic isolated from “Coalho” cheese produced in the Pernambuco state, Brazil and evaluate their survival in the yogurt. Kinetics of acidification, viability in sour milk, resistance to additives and aroma compounds and the interaction with starter strains were evaluated. LAB with best results were selected and used in yogurt produced the pilot level, with monitoring of pH and cell viability, for thirty days under refrigeration at 4°C. All strains were good acid producing and 39% were considered rapid acid producers. All strains maintained good viability in acidified milk. No additive was able to inhibit the growth of any strain. Two LAB were inhibited by metabolites of a commercial starter culture. Two bacteria inoculated in yogurt were able to resist the manufacturing process and the cold storage while maintaining viable cell number in the range  $10^6$ - $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup>, allowing its use with probiotic purpose.

Key words: yogurt, coalho cheese, functional food, cell viability

## 1. INTRODUCTION

In recent years, there has been a growing interest worldwide in lactic acid bacteria search (LAB) isolated from different sources to be used as probiotics resulting in a significant success in development of various products containing probiotic bacteria (ANTUNES et al., 2007; PATEL et al., 2008; RANADHEERA et al., 2012).

Probiotics are defined as live microorganisms when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host (FAO/WHO, 2001). To qualify as a probiotics, certain criteria need to be met by a bacterium: a bacterial strain must be harmless for ingestion, adhere to mucosal membrane and must be able to colonize the gut epithelium. Additionally, the probiotic microorganisms should survive the gastrointestinal stress factors such the acid and bile salt concentration, and maintain their functionality within the host (HOLZAPFEL e SHILLINGER et al., 2002; VERNA E LUCAK, 2010).

According to Talwalkar et al. (2004), to those populations  $10^6$ - $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> to reach and act physiologically intestine, it is necessary to consume about 100g of product with populations  $10^8$ - $10^9$  UFC.g. In Brazil, the legislation states that the minimum viable quantity of probiotic culture should be also between  $10^8$  and  $10^9$  CFU per daily portion of product (ANVISA, 2008). Therefore, viability of probiotic products (the minimum viable probiotic cells in each gram or milliliter of product until the time of consumption) is a very important feature.

However, in general these organisms often show poor viability in fermented products and their viability during processing, storage and transportation is the major challenge associated with the use of probiotic cultures in the development of functional foods. Thus, for the processing of probiotic products is important select strains technologically suitable for the incorporation into food products: be resistant to food processing, able to grow/survive at high levels in the products during their shelf life and survive after consumption (VINDEROLA et al., 2008; LEE AND SALMINEN, 2009). Furthermore, from a food processing perspective, it is desirable that such strains are suitable for large-scale industrial production (STANTON et al., 2003) and be able to be incorporated into foods without producing off-flavours or textures (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

In this sense, several researches have been carried out with the objective of to characterize the technological potential and monitoring the survival of the probiotic bacteria added to the different fermented foods (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; PAPAMANOLI et al., 2003; CHAMMAS et al., 2006; RUIZ-MOYANO et al., 2008). Thus, the aim of this work was to evaluate technological properties of lactic acid bacteria candidate probiotic isolated from coalho cheese from Pernambuco state, Brazil and evaluate their survival in the yogurt.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Microorganisms and growth conditions

A total of 24 LAB strains, previously selected, were studied. They were isolated from artisanal Coalho cheeses produced in the Pernambuco state, Brazil and frozen stored (-80°C) in Man Rogosa Sharpe (MRS, Oxoid) broth supplemented with 15% (v/v) glycerol. Before the assays, LAB strains were cultured twice in de MRS at 37°C for 24 h, under aerobic condition. These microorganisms were previously available for probiotic potential.

### 2.2. Milk acidification kinetics

Milk acidification kinetics was determined in accordance to Briggiler-Marco´ et al. (2007). LAB strains was inoculation (2% v/v) of in sterile, reconstituted, commercial, dry skim milk (10%, w/v, Difco) followed by incubation for 24h at 34°C. After repeating this procedure three times, the pH values were measured (model TECNOPON mPA 210 pH meter).

### 2.3. Viability of LAB strains in milk acidified with lactic acid

The effect of lactic acid on cell viability was investigated as described by Vinderola et al. (2008). Strains were harvested in the stationary phase by centrifugation (centrifuge vision scientific Co - Korea) at 12,000g for 5 min at 5°C, washed twice in 50mm K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.5) and resuspended in the same buffer.

The cell suspensions were inoculated (1.5% v/v) in test tubes containing 10 mL of reconstituted skim milk (10%, w/v, Difco) previously acidified with lactic acid at pH 5 and 4. Growth in skim milk without changes of pH served as control. The samples were cold-stored (5°C) for 4 weeks. To evaluate the LAB viability during cold storage, cell enumeration was performed by determination of CFU mL<sup>-1</sup> by plating on MRS agar at days 0 and 30.

#### 2.4. Influence of additives on strain growth.

The effect of additives on LAB growth was performed by the growth-in-liquid-medium assay according to Vinderola et al., (2002). Overnight broth cultures were inoculated (2%) in test tubes containing 3mL of culture medium (MRS, Oxoid) plus the additives at the concentrations prescribed by legislation (BRAZIL, 2007). The relative growth of each strain (after 24 h incubation at 37°C) was expressed as the percentage of the optical density (O.D.<sub>600</sub>) (spectrophotometer anthos Zenyth 200 rt) of control culture (culture in MRS without additives). Values of a relative growth lower than 30% or higher than 70% were considered negative or positive results, respectively. Values of a relative growth ranging within these limits were regarded as weak. The food additives used in this study were Fruit preparations (strawberry, plum, red fruits); Dye (cochineal carmine); Thickener / stabilizer (xanthan gum); Flavoring (strawberry, coconut) Sweetener (Sodium cyclamate), all obtained in Gemacom®.

#### 2.5. Detection of Bacterial Interactions

Interactions among selected strains and commercial cultures commonly used in dairy products manufacture (TA-040 with *Streptococcus thermophilus* (Danisco) and YF-L812 with *St. thermophilus*, and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Chr. Hansen)) were investigated by the well-diffusion agar assay according to Vinderola et al. (2008). Cell-free supernatants (CFS) of LAB were obtained by centrifugation of overnight cultures (12000g, 5 min, 5°C), and sterilization by filtration through a 0.22-mm pore filter (Millipore). Twenty milliliters of MRS agar (Oxoid) melted and tempered at 45°C were vigorously mixed with



200µl of an overnight culture of commercial cultures, and poured into Petri dishes. Wells of 10 mm in diameter were made in the agar layer, and 180µl of the CFS of each LAB was placed into each well. The plates were incubated aerobically overnight at 37°C. Interaction among the CFS of the strains and commercial cultures was also evaluated using the same method. Assays were performed in triplicate.

## 2.6. Experimental yogurt

Experimental yogurt was made with the same commercial cultures of the tested strain of LAB. The bacteria was selected according to the results of in vitro tests and assayed individually as adjunct cultures in yogurt making experiments at pilot plant scale with monitoring of pH and cell viability, over thirty days under refrigeration.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

In our study, 24 LAB were investigated for their technologically relevant properties. These microorganisms had been previously evaluated for probiotic properties including gastrointestinal tract resistance, antagonistic activity against pathogens, autoaggregation and coaggregation with pathogens, hydrophobicity, β-galactosidase activity, bile salt hydrolase activity and antibiotic resistance.

Overall, probiotic microorganism should be technologically compatible with the food manufacturing process of interest. In this study, we evaluated the resistance to yogurt processing.

### 3.1. Milk acidification kinetics

All LAB evaluated were able to grow and acidify the milk, as expected considering their source. The strains were classified as fast or slow according to the final pH values reached by their milk cultures after 24 h at 34°C. Nine LAB (15, 126, 68, 40, 46, 117, 92, 64, 60) were considered rapid acid producers, as they acidified milk to pH<5.3 after 6 h of incubation (Figure 1).

Rapid acidification is a desirable characteristic in the selection of LAB to be employed in starter cultures, which are responsible for accelerating and steering the fermentation process. After 24 h incubation, 20 LAB reduced the pH of the milk to < 5.3.

Our results are similar to results reported by several studies. Georgieva et al. (2009) also observed in your research, after 24 h of incubation, seven strains (30%) were classified as fast, cultures of which had a final pH value of 3.73. Santos et al. (2015), in a recent study, also reported LAB isolated from Coalho cheese with good ability to grow in milk. In accordance with this author, probiotic bacteria are usually added to fermented food products as adjunct cultures, but they may have an additional role as a coculture with the starter.

### 3.2. Viability of LAB strains in milk acidified with lactic acid

All strains evaluated maintained good viability in acidified milk (pH 4.0 and 5.0) after of cold storage. In relation to the counts at time 0, at pH 4 and 5, final counts (after 4 weeks), was observed very low decreases in population and even small increases. The highest decrease, of 0.5 log CFU mL<sup>-1</sup>, was recorded for the population of strains 16, 17 and 128 at pH 4.0, According to Vinderola et al. (2008), decreases in cell counts lower than 0.8 log CFU mL<sup>-1</sup> are considered low. On other hand, some strains showed significant growth during incubation period with increasing in the cell number. At pH 5 was observed an increase of up to 0.4 log CFU mL<sup>-1</sup> for eight strains (16, 99, 110, 117, 126, 143, 145 and 155) and At pH 4.0, six LAB (37, 99, 143, 145, 155, and 158) showed an increase of up to 0.3 log CFU mL<sup>-1</sup> (Table 2).

Georgieva et al. (2009) also determined the viability of *Lactobacillus plantarum* in skim milk during 60 days of cold storage and reported a populations ranging from 6.8 to 7.5 log CFU mL<sup>-1</sup> until 28 days. Zacarías et al. (2011) reported that after 4 weeks of refrigerated storage at pH 4.5, final counts of *Bifidobacterium* strain availed ranged from 8.2 to 9.1 log CFU mL<sup>-1</sup>.

On other hand, Vinderola et al. (2002) reported that cell viability during cold storage in acidified milk was satisfactory for *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus casei* group strains. For *Lactobacillus acidophilus*

and *Bifidobacterium*, the decreases in cell counts at pH 5 were negligible. However, decreases up to 6.2 and 7.6 log orders, respectively, were observed at pH 4.

Probiotic bacteria are normally used as adjunct cultures for the production of fermented food (VINDEROLA, DE LOS REYES- GAVILÁN, REINHEIMER, 2009). Thus, tolerance to lactic acid and growth in lower pH is a desirable feature in microorganisms used in this process.

### 3.3. Influence of additives on strain growth

The additives used in this study are commonly used in the processing of yogurt. At the concentrations tested, no additive was able of interfering with the growth of LAB used in this study. Was observed a growth ranging from 71 to 110% compared to the control (without the additive). Moreover, a significant growth was measured for all strains evaluated in the presence of some food additives used.

All LAB evaluated increased growth in the presence of sweeteners. The lowest indices of growth was observed for the flavor coconut. In the presence of the additive, the growth of strains varied in levels of 73-94 % (Table 1). In accordance to Vinderola et al. (2008), the values of relative growth higher than 70 % can be considered positive results.

Vinderola et al. (2002) investigated growth of lactic acid bacteria in the presence of additives used in the dairy industry and also reported that sweeteners (acesulfame and aspartame), at the concentration normally used in fermented dairy drinks were not inhibitory for lactic acid bacteria evaluated.

De Nadra et al. (2007) also reported that strains of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* was able to grow in the presence of saccharin, cyclamate at low sweetener concentrations, and concluded that microorganism could utilize cyclamate and aspartame as an energy and carbon source.

In general, the use of additives is one of the factors affecting survival microorganisms in the final product. Some additives added to flavor food during processing can interact with bacteria present favoring or hindering their growth.

Other used to prolong the shelf life of foods prevent the development of undesirable microorganisms, but can also affect startup or probiotic bacteria used in the manufacturing process (GOMES, TEIXEIRA, AND MALCATA, 1998; VINDEROLA et al., 2011).

#### 3.4. Detection of Bacterial Interactions

It was observed that the cell-free supernatants of the tested commercial starter cultures YF-L812 (Chr. Hansen) presented an inhibitory effect on the growth of two LAB studied (strain 155 and 46). The same behavior was observed to the cell-free supernatants of four LAB that presented a slight inhibitory effect on the growth of the starter cultures TA-040 (Danisco). On the other hand, no effect was observed to other strains (Table 2).

Vinderola et al. (2008) also reported that strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis* were inhibited by the cell-free supernatant of *Lactobacillus* spp. isolated from feces of newborn infants, attributing the effect to the acidic character of the supernatant. Santos et al. 2015 observed that the cell-free supernatants of the tested commercial starter cultures presented no effect on the growth of the studied *Lactobacillus* spp. strains. On the other hand, the cell-free supernatants of all *Lactobacillus* spp. strains presented a slight inhibitory effect on the growth of the starter cultures.

Microbial interactions, such antagonism, among starter and probiotics cultures may generate undesirable changes in the composition of the bacterial flora during the manufacture and cold storage of fermented dairy products (Vinderola et al., 2008). Thus, the strains were inhibited or inhibited starter cultures should not be used together in one product.

#### 3.5. Experimental yogurt

Two LAB were used in a functional product based on technology and probiotic properties previously tested. Strain 15 was chosen because, besides having good technological characteristics, has high resistance to gastric barriers

(evaluated previously). Strain 106, also selected, had good technological characteristics and was able to desconjugate bile salts, high percentages of autoaggregation and coaggregation, and  $\beta$  - galactosidase production, (evaluated previously).

LAB used as adjunct cultures in the preparation of yogurt remained viable throughout the storage period. Viable cell counts ranged  $10^8$ - $10^7$  CFU/g for strain 15, a decrease of only one logarithmic cycle. On the other hand, the variation of strain 106 had two cycles ( $10^8$  to  $10^6$  CFU/g).

The pH of the yogurt with strain 15 added to the formulation ranged from 4.6 (time 0) to 4.3 (time 30), while the yogurt made with strain 106 pH ranged from 4.6 to 4.4 after 30 days storage at 4°C. These results show resistance of the LAB strains to the processing and storage, confirming the results of other tests and allowing its use with probiotic purposes.

Ranadheera et al. (2012) evaluated the cell viability probiotics microorganisms in yogurt stored at 4°C for 4 weeks. After this period, cell counts in yogurts were  $10^8$  CFU/g (*Propionibacterium jensenii*),  $10^7$  CFU/g (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) and  $10^6$  CFU/g (*Lactobacillus acidophilus*). These authors concluded that the addition of fruit juice appeared to support the viability of lactobacilli, with higher microorganism numbers observed in fruit yogurts than in plain yogurt throughout the shelf life. On other hand, Shakeri et al. (2006) noted a decline in viable population of *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* but an increase in counts of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* during storage of yoghurt containing sweet buttermilk.

#### 4. CONCLUSION

The present study estimated technologically relevant properties of 24 probiotic candidate LAB, isolated from artisanal Coalho cheeses. The results indicate that the evaluated LAB showed promising characteristics and tolerance to industrial conditions. The strains selected for use into a functional product presented good technological characteristics. Other strains shall be subjected to tests probiotic product.

## 5. REFERENCES

1. ANTUNES, A.E.C.; MARASCA, E.T.G.; MORENO, I.; DOURADO, F.M.; RODRIGUES, L.G.; LERAYER, A.L.S. (2007) Desenvolvimento de buttermilk probiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Volume 27, issue 1, Pages 83-90
2. ANVISA (2008). Brazilian agency of sanitary surveillance. Food with health claims, new foods/ingredients, bioactive compounds and probiotics. Available from [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)
3. BRIGGILER-MARCO M.; CAPRA M.L.; QUIBERONI A.; VINDEROLA G.; REINHEIMER J.A.; HYNES E. (2007) Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: in vitro characterization and performance in two model cheese. *Journal of Dairy Science*, volume 90, pages 4532–4542
4. BRAZIL. (2007) Ministry of Agriculture Livestock and Supply. Normative Instruction N° 46 dated October 23th, 2007. Technical regulation of identity and quality of milk fermented.
5. CHAMMAS, G. I.; SALIBA, R.; CORRIEU, G.; BÉAL, C. (2006) Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk “laban”. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 110, pages 52–61
6. DE NADRA, M.C., ANDUNI, G.J., FARÍAS, M.E. (2007) Influence of artificial sweeteners on the kinetic and metabolic behavior of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Food Protection* Volume 70, Issue 10, Pages 2413-2416

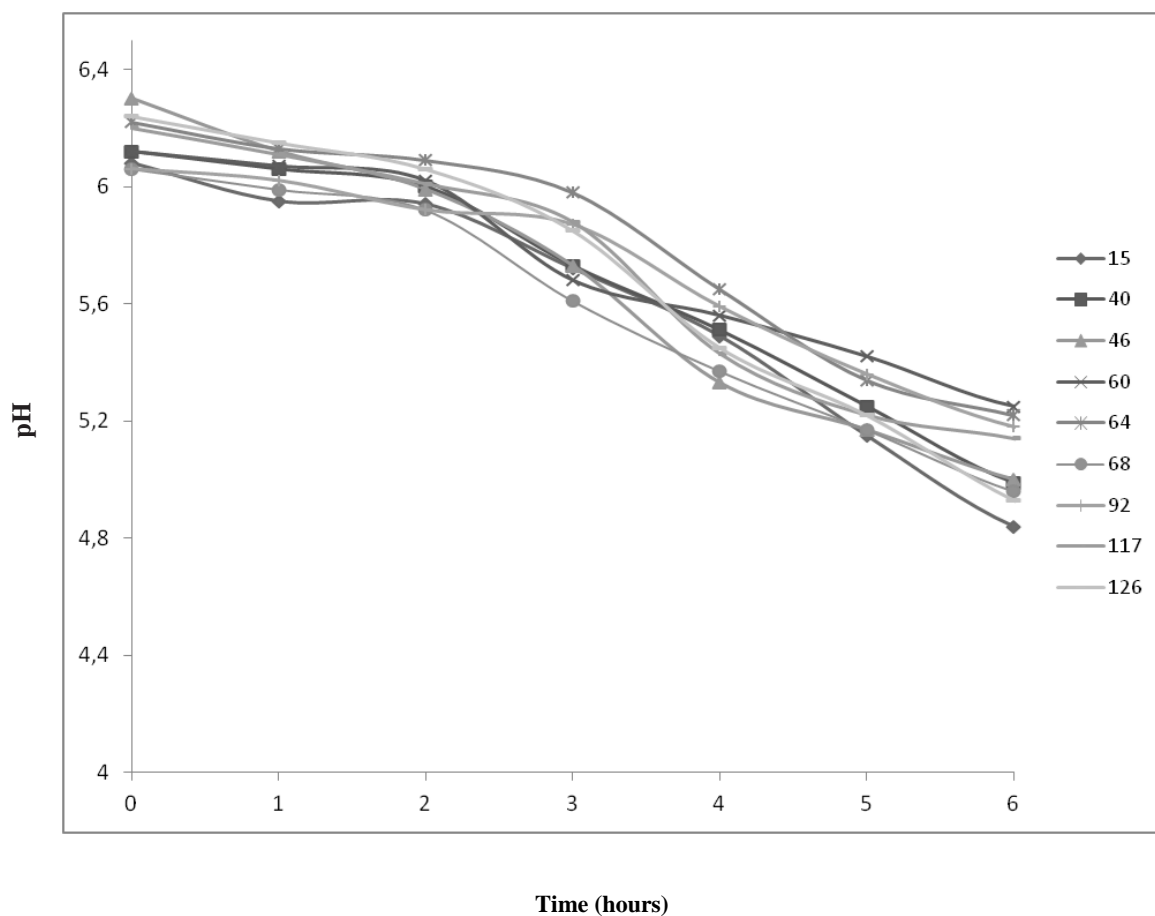
7. FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2001) Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001. Disponível em: [ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf). Acessado em 15 jan. 2015.
8. GEORGIEVA R, ILIEV I, HAERTLÉ T, CHOBERT J-M, IVANOVA I, DANOVA S. (2009) Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Dairy Journal*, volume19, pages 696–702
9. GOMES, A. M. P.; TEIXEIRA, M. G.; MALCATA, F. X. (1998) Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in milk: sodium chloride concentration and storage temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*, volume 22, issue 3, pages 221-240
10. HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. (2002) Introduction to pre and probiotics. *Food Research International*, Amsterdam, v.35, n.2-3, p.109-116
11. LEE, Y.K; SALMINEN, S. (2009) *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, Inc. 2009
12. PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P. (2003) Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. Volume 65, pages 859–867



13. PATEL, P., PAREKH, T., SUBHASH, R. (2008) Development of probiotic and symbiotic chocolate mousse: A functional food. *Biotechnology Volume 7, Issue 4, Pages 769-774*
14. RANADHEERA, C. S.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S.K. (2012) Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chemistry, Volume 135, Issue 3, Pages 1411-1418*
15. RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; BENITO, M. J.; NEVADO, F. P.; CÓRDOBA, M. G. (2008) Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science, Volume 80, pages 715–721*
16. SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; BURITI, F. C. A.; NASCIMENTO, J. C. F.; MELO M. E. S.; BRUNO, L. M.; BORGES M. F.; ROCHA, C. R. C.; LOPES, A. C. S.; MELO, F. B. D. G.; TODOROV S. D. (2015) Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Science & Technology, Volume 95, Issue 2, pages 209-230*
17. SHAKERI, M., SHAHIDI, F., MORTAZAVI, A., MAHALLATI, M.N. AND TOSSI, S.B. (2006) Evaluation of buttermilk effect on physico-chemical, microbial and organoleptic properties of probiotic yoghurt”, *Journal of Agricultural Science and Technology, Volume 20, pages 185-95*
18. STANTON, C., DESMOND, C., COAKLEY, M., COLLINS, J. K., FITZGERALD, G., & ROSS, R. P. (2003) Challenges facing development of probiotic containing functional foods. In E. R. Farnworth (Ed.), *Handbook of fermented functional*

19. TALWALKAR, A., MILLER, C. W., KAILASAPATHY, K., & NGUYEN, M. H. (2004) Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, Volume 39, issue 6, pages 605-611
20. VERNA, E.C.; LUCAK, S. (2010) Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. Volume 3, issue 5, pages 307-19
21. VINDEROLA G, CAPELLINI B, VILLARREAL F, SUÁREZ V, QUIBERONI A, REINHEIMER J (2008) Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LTW– Food. Science Technology* Volume 41, pages 1678–1688
22. VINDEROLA, C.G.; COSTA, G.A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER J.A. (2002) Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal* Volume 12, pages 579–589
23. VINDEROLA, G.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C.; REINHEIMER, J. (2009) Probiotics and prebiotics in fermented dairy products,” in *Contemporary Food Engineering* pages 601–634
24. ZACARÍAS, M.F.; BINETTI, A; LACO, M; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. (2011) Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. *International Dairy Journal*. Volume 21, pages 548-555

## 6. Figures



**Figure 1– LAB considered rapid acid producers, as they acidified milk to pH<5.3 after 6 h of incubation. Values are means of 3 replicates.**

## 7. Tables

**Table 1:** Percentage growth in the presence of the additive compared to the control (mean±standard deviation, n=3)

Strain	Fruit preparations			Dye	Thickener / stabilizer	Flavoring		Sweetener
	Strawberry	Plum	Red fruits	Cochineal carmine	Xanthan gum	Coconut	Strawberry	Sodium cyclamate
15	99.42 ± 1.73	98.25 ± 1.65	108.19 ± 3.19	110.53 ± 2.70	107.60 ± 0.88	82.46 ± 3.19	104.68 ± 3.22	107.48 ± 2.39
16	107.84 ± 3.87	93.73 ± 5.61	86.27 ± 1.62	83.92 ± 1.37	108.63 ± 0.33	79.61 ± 0.19	109.80 ± 2.45	106.67 ± 2.38
17	106.54 ± 3.21	92.52 ± 2.05	98.60 ± 6.52	107.48 ± 3.11	107.48 ± 7.91	91.79 ± 2.75	99.53 ± 0.88	103.00 ± 2.16
37	106.62 ± 5.59	102.65 ± 4.87	109.60 ± 8.53	104.30 ± 2.20	107.62 ± 6.43	73.84 ± 6.94	79.80 ± 1.11	100.66 ± 3.59
40	107.85 ± 7.98	96.86 ± 4.33	109.95 ± 1.62	102.62 ± 5.16	100.52 ± 3.19	92.48 ± 1.62	92.67 ± 1.54	110.99 ± 8.49
42	109.89 ± 7.10	93.96 ± 4.48	109.34 ± 3.87	108.24 ± 3.77	107.14 ± 0.19	81.87 ± 2.36	107.14 ± 0.70	103.85 ± 2.33
46	100.95 ± 6.17	99.37 ± 4.36	89.21 ± 1.94	87.30 ± 1.07	91.11 ± 2.75	89.21 ± 2.51	95.24 ± 0.37	105.58 ± 1.97
60	109.15 ± 4.79	88.41 ± 2.97	94.51 ± 3.21	93.90 ± 2.39	84.76 ± 6.94	85.06 ± 2.39	88.41 ± 2.67	100.91 ± 2.54
64	106.37 ± 4.72	109.56 ± 4.29	105.58 ± 2.65	100.00 ± 6.17	110.36 ± 0.33	93.22 ± 2.66	105.18 ± 0.60	107.97 ± 2.20
68	100.50 ± 2.81	107.00 ± 2.33	106.50 ± 5.61	103.00 ± 4.79	106.00 ± 0.41	90.00 ± 2.85	94.50 ± 1.56	106.37 ± 2.55
76	108.02 ± 7.05	97.86 ± 2.28	93.58 ± 2.05	108.56 ± 4.72	100.00 ± 0.19	91.79 ± 2.30	103.74 ± 3.87	108.02 ± 2.28
98	108.60 ± 6.09	98.14 ± 5.36	109.31 ± 2.33	72.78 ± 0.58	74.50 ± 1.62	90.99 ± 1.56	102.87 ± 1.94	110.74 ± 2.39
99	106.98 ± 1.64	97.46 ± 2.66	103.49 ± 7.91	90.16 ± 0.31	102.54 ± 6.52	86.03 ± 2.65	106.03 ± 3.21	107.30 ± 2.38
106	100.00 ± 1.99	100.34 ± 2.85	105.48 ± 6.43	105.48 ± 5.25	109.93 ± 8.53	91.86 ± 5.50	107.53 ± 1.65	107.14 ± 2.16
110	106.67 ± 2.30	107.78 ± 2.30	103.33 ± 1.72	108.89 ± 7.10	100.00 ± 1.62	92.22 ± 0.31	105.00 ± 0.23	107.14 ± 3.59
117	100.00 ± 2.30	107.57 ± 1.56	107.57 ± 5.13	105.95 ± 2.36	101.62 ± 3.87	93.51 ± 5.25	102.16 ± 0.58	108.11 ± 7.10
126	109.09 ± 3.89	105.26 ± 2.90	89.00 ± 2.13	109.57 ± 2.51	104.31 ± 1.94	89.47 ± 0.00	105.74 ± 0.31	106.70 ± 6.17
128	107.31 ± 6.19	106.15 ± 2.36	106.54 ± 4.20	92.69 ± 2.39	101.92 ± 0.36	94.54 ± 2.36	99.23 ± 0.70	102.69 ± 4.79
143	99.29 ± 3.87	98.23 ± 1.57	93.97 ± 2.82	108.51 ± 1.00	105.67 ± 2.14	90.07 ± 1.00	105.67 ± 0.37	109.93 ± 4.72
145	99.22 ± 3.16	110.47 ± 4.01	110.47 ± 2.88	110.47 ± 2.32	107.36 ± 2.51	92.84 ± 0.64	103.88 ± 2.67	108.53 ± 1.62
147	81.55 ± 2.16	78.64 ± 0.00	84.47 ± 1.33	90.78 ± 3.05	85.44 ± 2.39	93.17 ± 0.99	86.41 ± 1.07	110.47 ± 6.52
155	95.64 ± 2.75	100.93 ± 4.14	82.87 ± 7.91	74.45 ± 0.31	82.55 ± 1.00	91.59 ± 1.60	72.59 ± 3.19	108.19 ± 8.53
158	72.22 ± 1.99	108.33 ± 1.83	99.60 ± 6.43	108.73 ± 3.39	105.16 ± 2.32	93.02 ± 2.81	110.71 ± 2.22	107.57 ± 1.62
174	74.12 ± 2.67	100.78 ± 1.72	107.84 ± 3.19	110.20 ± 0.69	108.24 ± 3.05	92.55 ± 1.94	103.92 ± 4.11	108.51 ± 0.89

**Table 2:** Technological properties of LAB evaluated

Strain	Viability <sup>a</sup> ( $\Delta$ log cfu /mL) in acidified milk at		Inhibition of <sup>c</sup>			
			CFS commercial starter cultures <sup>d</sup>		CFS strains evaluated <sup>e</sup>	
	pH4	pH5	YFL 812	TA-040	YFL 812	TA-040
15	0.20	0.31	-	-	-	-
16	0.53	0.01 <sup>b</sup>	-	-	-	-
17	0.55	0.28	-	-	-	-
37	0.26 <sup>b</sup>	0.35	-	-	-	-
40	0.26	0.17	-	-	-	-
42	0.37	0.16	-	-	-	0.96
46	0.14	0.31	1.05	-	-	-
60	0.08	0.23	-	-	-	-
64	0.27	0.41	-	-	-	-
68	0.40	0.25	-	-	-	0.88
76	0.46	0.22	-	-	-	-
98	0.04	0.04	-	-	-	0.93
99	0.37 <sup>b</sup>	0.39 <sup>b</sup>	-	-	-	-
106	0.39	0.11	-	-	-	-
110	0.34	0.12 <sup>b</sup>	-	-	-	-
117	0.35	0.02 <sup>b</sup>	-	-	-	0.98
126	0.32	0.30 <sup>b</sup>	-	-	-	-
128	0.52	0.05	-	-	-	-
143	0.09 <sup>b</sup>	0.32 <sup>b</sup>	-	-	-	-
145	0.12 <sup>b</sup>	0.15 <sup>b</sup>	-	-	-	-
147	0.09	0.12	-	-	-	-
155	0.25 <sup>b</sup>	0.18 <sup>b</sup>	1.20	-	-	-
158	0.03 <sup>b</sup>	0.15	-	-	-	-
174	0.26	0.04	-	-	-	-

a Difference between counts at time 0 and after 30 days of cold storage (4°C) in milk acidified with lactic acid at different pH values (mean of two determinations).

b Increase in viable cell counts c. Inhibition halo diameter (cm) (mean of three determinations).

d. Interaction among cell free supernatant (CFS) of the strains and commercial cultures e. Interaction among the CFS of the commercial cultures and strains

---

Capítulo 5  
Conclusões e  
Perspectivas futuras

---

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Em geral, bactérias lácticas apresentam grande potencial de aplicação na indústria de alimentos e, atualmente, inúmeros benefícios à saúde têm sido a elas atribuídas. A busca e caracterização de BAL com potencial probiótico, oriundas de fontes ainda pouco pesquisada como o queijo Coalho artesanal, foi o principal foco deste estudo. As Bactérias lácticas estudadas apresentaram resultados satisfatórios quanto ao seu potencial probiótico e tecnológico. Análises relacionadas à resistência ao TGI, atividade antimicrobiana, capacidade de agregação, produção da enzima  $\beta$ -galactosidase e BSH, resistência a antibióticos das 24 cepas evidenciaram diferenças entre as cepas, resultando em interessantes perspectivas para o trabalho. De forma geral, os testes “in vitro” foram válidos para apontar cepas como potenciais candidatas a aplicações probióticas. Duas BAL foram utilizadas em um iogurte feito em escala piloto: LAB 15, por sua boa resistência ao TGI simulado e LAB 106 por ser capaz de desconjugar sais biliares, altos percentuais de autoagregação e coagregação e produção de  $\beta$  – galactosidase. Ambas apresentaram boa resistência ao processamento. Outras seis cepas (42, 46, 60, 76, 117, 128) destacaram-se nos testes e podem ser utilizadas em testes futuros. Contudo, a continuidade nas pesquisas para evidenciar resultados obtidos, é fundamental.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

As perspectivas para futuros estudos estão baseadas nos resultados deste trabalho e na possibilidade de aprofundamento em alguns pontos importantes:

- Identificação molecular de todas as bactérias ácido lácticas avaliadas;
- Melhor investigação do potencial probiótico das cepas, como adesão “in vitro” a células Caco-2, atividade antioxidante, e atividade antimicrobiana frente a outros micro-organismos patogênicos;
- Comprovação do potencial probiótico das cepas com a realização de ensaios “in vivo”;
- Utilização das cepas probióticas em produtos funcionais com pesquisa de aceitação sensorial;



