



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DO
SEMIÁRIDO**

Washington Luiz Gonçalves de Almeida Júnior

**Seleção de Bactérias do Ácido Lático (BAL) autóctones de
leite caprino com potencial probiótico e avaliação
funcional em queijo caprino artesanal**

Petrolina

2015

Washington Luiz Gonçalves de Almeida Júnior

**Seleção de Bactérias do Ácido Lático (BAL) autóctones de
leite caprino com potencial probiótico e avaliação
funcional em queijo caprino artesanal**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito da obtenção do título de – Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dra. Francesca Silva Dias Nobre
Co-orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Petrolina

2015

	Almeida Júnior, Washington Luiz Gonçalves
A447p	Seleção de Bactérias do Ácido Lático (BAL) autóctones de leite caprino com potencial probiótico e avaliação funcional em queijo caprino artesanal / Washington Luiz Gonçalves de Almeida Júnior. -- Petrolina, 2015.
	113f.: il.; 29 cm
	Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, 2015.
	Orientador (a): Dra. Francesca Silva Dias Nobre.
	Referências.
	1. Leite Caprino – probióticos. 2. Atividade antibacteriana. 3. Microbiológico. 4. Patógenos. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.
	CDD 637.17

Catálogo pelo Sistema integrado de Bibliotecas da UNIVASF.
Bibliotecário (a): Maria Betânia de S. da Silva - CRB4-1747

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DO
SEMIÁRIDO

FOLHA DE APROVAÇÃO
Para Dissertação

Washington Luiz Gonçalves de Almeida Júnior

Seleção de Bactérias do Ácido Lático (BAL) autóctones de
leite caprino com potencial probiótico e avaliação
funcional em queijo caprino artesanal

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Veterinárias, pela Universidade Federal do Vale
do São Francisco.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

Banca examinadora

Francesca Silva Dias Nobre, Doutorado em Microbiologia Agrícola, UNIVASF.

Mateus Matiuzzi da Costa, Doutorado em Biologia Celular e Molecular, UNIVASF.

Luciana Cavalcanti de Azevedo, Doutorado em Química, IF - SERTÃO.

Dedico primeiramente a Deus, a minha mãe amada,
a toda minha família, a minha noiva, a sua família e aos
meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas, ao dom da vida, e por me proporcionar todos os dias a força da conquista dos meus sonhos.

A minha mãe, por todo apoio e força no dia a dia. A sua sabedoria me fez chegar até aqui.

A toda a minha família por todo apoio.

A minha noiva pelo incentivo diário e pela paciência. Bem como a toda sua família.

A minha orientadora Francesca pela oportunidade e todo conhecimento adquirido.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial, Jane e Íris por todo o apoio e dedicação diária.

Aos professores da pós-graduação em Ciências Veterinárias pelo incentivo e conhecimento adquirido.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação.

De uma forma geral a todos que contribuíram para essa realização.

RESUMO

O uso de produtos lácteos associados a micro-organismos vivos, os probióticos, em queijo caprino é uma alternativa para aumentar o valor nutricional e ainda contribuir para a inocuidade do produto, beneficiando os pequenos produtores da região semiárida do Vale do São Francisco. Com o grande desenvolvimento da indústria de alimentos funcionais e a necessidade de novos produtos derivados do leite de cabra, foi proposta a seleção de Bactérias do Ácido Lático (BAL) com potencial probiótico *in vitro* e avaliação de sua ação antagonista a patógeno em queijo. Bactérias do Ácido Lático foram isoladas de leite caprino cru coletado nos municípios do Vale do São Francisco e para seleção de isolados com propriedades tecnológicas e probióticas, os seguintes testes *in vitro* foram conduzidos: simulação ao Trato Gastrointestinal (TGI), atividade hemolítica, susceptibilidade a antimicrobianos, antagonismo a bactérias patogênicas, triagem da produção de Exopolissacarídeos (EPS), produção de gás, avaliação da atividade proteolítica, produção de diacetil e tolerância ao NaCl. Posteriormente, os isolados foram discriminados através da Análise de Componentes Principais (ACP), identificados genotipicamente e inoculados em queijo artesanal. Três tipos de queijos de cabra (1, 2 e controle) foram elaborados para avaliar a ação antagonista de BAL selecionadas frente *Escherichia coli*. Foram conduzidos nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 dias, análises microbiológicas e físico-químicas. No estudo os isolados UNIVASF CAP 14 e 20 foram diferenciados pela sobrevivência ao pH 2 e pancreatina, resistência ao NaCl e a atividade antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*. UNIVASF CAP 4 e 29 foram caracterizadas pela resistência ao suco intestinal e atividade antibacteriana contra *Salmonella Typhi* e *Listeria monocytogenes*. UNIVASF CAP 27, 38, 43 e 139 apresentaram produção de diacetil, atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. UNIVASF CAP 35 e 138 foram caracterizados por atividade proteolítica, produção de EPS, atividade antibacteriana contra *E. coli* e *Shigella flexneri*. Como resultado, nesta pesquisa, os dez isolados UNIVASF CAP 4, 14, 20, 27, 29, 35, 38, 43, 138, 139 aumentaram a segurança microbiológica do queijo caprino frente a *E. coli*.

Palavras-chave: inibição a patógenos, *E. coli*, propriedades de segurança

ABSTRACT

The use of dairy products associated with living microorganisms, probiotics, in goat cheese is an alternative to increase the nutritional value and contribute to the safety of the product, benefiting of smallholders in semiarid region of the San Francisco Valley. Due to the great development of functional food industry and the need for new products derived from goat was proposed selection of Lactic Acid Bacteria (LAB) with probiotic potential *in vitro* and evaluation of their antagonistic action on the pathogen cheese. Lactic Acid Bacteria were isolated from raw goat milk collected in the municipalities of San Francisco Valley and to selection of isolates with probiotic and technological properties, the following *in vitro* tests were conducted: the simulation to the Gastrointestinal Tract (GIT), haemolytic activity, antimicrobial susceptibility, antagonistic to pathogenic bacteria, screening for Exopolysaccharide (EPS) production, gas production, assessment of proteolytic activity, diacetyl production and tolerance to NaCl. Subsequently, the isolates were discriminated by Principal Component Analysis (PCA), genotypically identified and inoculated in artisan cheese. Three types of goat cheese (1, 2 and control) were prepared to evaluate the antagonistic action selected BAL against *Escherichia coli*. Microbiological and physical-chemical analyzes were conducted at times 0, 5, 10, 15 and 20 days. In the study the isolates UNIVASF CAP 14 and 20 were differentiated by survival up to pH 2 and pancreatin, resistance to NaCl and antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae*. UNIVASF CAP 4 and 29 were characterised by resistance to intestinal juice and antibacterial activity against *Salmonella Typhi* and *Listeria monocytogenes*. UNIVASF CAP 27, 38, 43 and 139 exhibited diacetyl production, antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. UNIVASF CAP 35 and 138 were characterised by proteolytic activity, EPS production, antibacterial activity to *E. coli* and *Shigella flexneri*. As a result, in this survey, the ten isolated UNIVASF CAP 4, 14, 20, 27, 29, 35, 38, 43, 138, 139 improved microbiological safety of goat cheese against *E. coli*.

Key-words: inhibition pathogens, *E. coli*, safety properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Figura 1. Análise de Componente Principal (ACP), com base nos dados de características probióticas de 50 isolados de BAL. Os sete primeiros componentes explicaram 62,50% da variância total; entre eles, PC1 e PC2 explicou 16,26% e 12,70% da variância total, respectivamente..... p. 74

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Seleção de BAL em diferentes matrizes alimentares para potencial uso probiótico..... p. 18

Tabela 2: Efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro e os mecanismos de estirpes probióticas relatados em estudos científicos..... p. 32

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Número de isolados de BAL (total de 50) tolerantes ao pH 2, fluido pancreático, bile (2%) e suco intestinal..... p. 70

Tabela 2: Susceptibilidade dos isolados de BAL aos antimicrobianos e número de antimicrobianos testados..... p. 71

Tabela 3: Atividade antibacteriana dos isolados de BAL contra oito patógenos e número de patógenos inibidos por isolado..... p. 72

Tabela 4: Produção de exopolissacarídeos (EPS), gás, diacetil, atividade proteolítica e tolerância ao NaCl dos 50 isolados de BAL..... p. 73

Tabela 5: Contagem de *E. coli* e BAL, valores de pH e lactose em queijo sem (queijo 1) e com (queijo 2) coquetel de BAL UNIVASF CAP durante 20 dias de armazenamento a 4°C..... p. 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP.....	Análise de Componente Principal
APC.....	Ágar Padrão para Contagem
BAL.....	Bactérias do Ácido Lático
BSH.....	Hidrolase de Sais Biliares
CRISPR.....	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas
CS.....	Cultura Secundária
CU.....	Colite Ulcerativa
DC.....	Doença de Crohn
EFSA.....	Autoridade de Segurança Alimentar Européia
FAO.....	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
GRAS.....	Geralmente Consideradas como Seguros
IBGE.....	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ME.....	Membrana Externa
MRS.....	Man, Rogosa e Sharpe
NADH.....	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
PA.....	Placa de Ágar
PBS.....	Tampão Fosfato Salino
RMD.....	Resistência a Múltiplas Drogas
SOD.....	Superóxido Dismutase
TGI.....	Trato Gastrointestinal
TSA.....	Ágar Triptona de Soja
UFC.....	Unidade Formadora de Colônias
WHO.....	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

	RESUMO.....	5
	ABSTRACT.....	7
	LISTA DE FIGURAS.....	9
	LISTA DE TABELAS.....	10
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
1	INTRODUÇÃO.....	12
2	DESENVOLVIMENTO.....	14
2.1	CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	14
	Principais critérios de seleção de bactérias do ácido lático com potencial probiótico para utilização em produtos alimentares.....	14
	RESUMO.....	14
	ABSTRACT.....	15
2.1.1	INTRODUÇÃO.....	16
2.1.2	CRITÉRIOS DE SEGURANÇA.....	17
2.1.2.1	Origem.....	17
2.1.2.2	Patogenicidade.....	19
2.1.2.3	Fatores de Virulência.....	19
2.1.3	CRITÉRIOS TECNOLÓGICOS.....	22
2.1.3.1	Viabilidade durante o processamento e armazenamento.....	22
2.1.3.2	Resistência aos Fagos.....	24
2.1.3.3	Contribuição das propriedades sensoriais aos alimentos.....	25
2.1.4	CRITÉRIOS FUNCIONAIS.....	27
2.1.4.1	Tolerância ao TGI.....	27
2.1.4.2	A Adesão às Células Epiteliais do Intestino.....	29
2.1.5	CRITÉRIOS FISIOLÓGICOS DESEJÁVEIS.....	31
2.1.5.1	Intolerância à Lactose.....	32
2.1.5.2	Prevenção e Redução da Diarreia.....	33
2.1.5.3	A Prevenção da Doença Inflamatório do Intestino.....	34
2.1.5.4	Prevenção da Alergia.....	35
2.1.5.5	Probióticos e <i>Helicobater Pylori</i>	36
2.1.5.6	A Modulação do Sistema Imunológico.....	36

2.1.5.7	A Redução do Risco Associado com os Efeitos mutagênicos e carcinogênicos.....	37
2.1.5.8	Efeito antagonista a bactéria patogênica <i>E. coli</i>	38
2.1.6	CONCLUSÃO.....	39
2.1.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
2.2	CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO.....	60
	Caracterização e avaliação de bactérias lácticas isoladas a partir de leite de cabra.....	60
	RESUMO.....	60
	ABSTRACT.....	61
2.2.1	INTRODUÇÃO.....	62
2.2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
2.2.2.1	Amostras de leite cru e análises microbiológicas.....	63
2.2.2.2	Simulação de tolerância ao Trato Gastrointestinal (TGI).....	63
2.2.2.3	Caracterização dos fatores de virulência dos micro-organismos.....	64
2.2.2.4	Ágar-difusão em disco – Atividade antibacteriana.....	65
2.2.2.5	Produção de EPS por BAL.....	65
2.2.2.6	A produção de gás.....	66
2.2.2.7	Avaliação da atividade proteolítica.....	66
2.2.2.8	Produção de diacetil.....	66
2.2.2.9	Tolerância ao NaCl.....	66
2.2.2.10	A identificação dos isolados de BAL.....	67
2.2.2.11	Inibição de <i>Escherichia coli</i> em queijo de cabra artesanal.....	67
2.2.2.11.1	Enumeração bacteriana.....	68
2.2.2.12.2	Análises físico-químicas.....	68
2.2.2.12	Análise estatística	68
2.2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
2.2.3.1	Análises microbiológicas.....	69
2.2.3.2	Aspectos de segurança, tecnológicos e características probióticas dos isolados UNIVASF CAP.....	69
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
5	APÊNDICE.....	86

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura, no nordeste brasileiro, sempre foi uma atividade de grande relevância econômica e social, mas que ainda se caracteriza pela reduzida rentabilidade (CARTAXO et al., 2013). Torna-se uma das poucas atividades sustentáveis no semiárido, do ponto de vista ambiental, econômico e social. Mas, para tal, deve-se observar práticas recomendadas de manejo reprodutivo, manejo alimentar e manejo profilático, sendo de extrema importância para a economia de Pernambuco, pois se apresenta como alternativa na oferta de carne, pele, leite e seus derivados (SAMPAIO et al., 2009).

A produção de queijo de leite de cabra no nordeste brasileiro é uma forma rentável de utilização do leite caprino, sendo o queijo de coalho um alimento típico produzido em vários estados dessa região (QUEIROGA et al., 2013). O queijo coalho nordestino é obtido após a coagulação do leite com coalho ou enzimas coagulantes apropriadas que são, por vezes, complementadas com bactérias lácticas selecionadas (cultura iniciadora). Este queijo é, normalmente, comercializado após sete dias de armazenamento a 10 °C e tem alto valor comercial devido à simplicidade da tecnologia utilizada nesta produção, ao alto rendimento e à boa aceitação entre os consumidores (QUEIROGA et al., 2013; BRASIL, 2001).

Ausência da qualidade microbiológica em leite e queijo caprino, como a presença de *Escherichia coli*, é relatada por diversos autores na região nordeste brasileira (EUTHIER; TRIGUEIRO; RIVERA, 1998; CHAPAVAL et al., 2010; SILVA et al., 2013). Entre os indicadores comumente utilizados da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, encontram-se as contagens de coliformes. Esses micro-organismos são indicadores de contaminação fecal e do risco da presença de micro-organismos patogênicos, que podem causar toxinfecções no consumidor (GOTTARDI et al., 2008).

O valor funcional do leite de cabra pode ser potencializado por meio da fermentação por Bactérias do Ácido Lático (BAL) naturalmente presentes no produto que, quando selecionadas, têm propriedades probióticas. Segundo Tsai et al. (2008) algumas infecções intestinais podem ser prevenidas pela utilização de probióticos. Na literatura reportar-se ação antagonica frente à *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria* e *Helicobacter pylori* (ZHENG et al., 2014; AOUDIA et al., 2015; BLAJMAN et al., 2015; LÉONARD et al., 2015).

As BAL são bactérias Gram-positivas que convertem os hidratos de carbono em energia e ácido láctico, reduzindo o pH que contribui para a segurança do produto (SWETWIWATHANA; VISESSANGUAN, 2015).

Segundo Taboada et al. (2015), BAL podem ser utilizadas para a fabricação de queijos com características sensoriais típicas e com potenciais propriedades funcionais. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), probióticos são micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

O consumo de alimentos probióticos e prebióticos que promovam o bem-estar, a saúde e um risco reduzido de doenças vem aumentando em todo o mundo (SILVEIRA et al., 2015) e estima-se que mais de 500 produtos probióticos tenham sido incluídos no mercado global, ao longo da última década (ASHRAF; SHAH, 2011).

A América Latina, sozinha, é responsável por US\$ 45 bilhões ou 17% do mercado de alimentos e bebidas funcionais, sendo o Brasil responsável por movimentar US\$ 14,6 bilhões deste total. Em constante crescimento, em 2013 atingiu um índice de 9,9%. O continente representa um mercado chave para o setor. Populoso e apresentando bons índices econômicos, o Brasil lidera esta tendência, representando 44% do crescimento total latino-americano, seguido pelo México, com 17%, e Colômbia, com 7%, garantindo uma colocação entre os dez mercados que mais crescem no mundo (BRASIL, 2014). Esse aumento pode ser atribuído, principalmente, devido ao novo perfil de consumidores que, segundo Coman et al. (2012), demandam alimentos que diariamente contribuem para intensificar e/ou melhorar a sua saúde. Assim, a preparação de culturas iniciadoras funcionais, caracterizadas para a produção de queijos tradicionais, sob condições controladas, utilizando a tecnologia tradicional padronizada, é crucial para atender ao mercado (TERZIĆ-VIDOJEVIC et al., 2015).

Dessa forma, pesquisas são fundamentais para gerar produtos funcionais e seguros. Para a caprinocultura, a triagem e a seleção de micro-organismos autóctones de leite caprino com propriedades probióticas serão essenciais para ampliar e expandir o mercado, garantindo o fornecimento de novos derivados lácteos com qualidade microbiológica e de caráter funcional. Portanto, este estudo foi realizado com os objetivos de selecionar BAL autóctones de leite caprino com potencial probiótico e avaliar suas propriedades funcionais em queijo caprino artesanal.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

Publicado no Periódico African Journal of Microbiology Research, v. 9, n. 10, p. 671-686, 2015.

Principais critérios de seleção de bactérias do ácido lático com potencial probiótico para utilização em produtos alimentares

RESUMO

A utilização de Bactérias do Ácido Lático (BAL) em produtos alimentares vem impulsionando o mercado consumidor, devido ao potencial probiótico dessas bactérias, que caracteriza os alimentos com status de funcionais. A seleção de estirpes probióticas pode ocorrer a partir de diferentes matrizes alimentares e ambientes. No entanto, esses microorganismos devem ser seguros, mantendo as características que os tornam tecnologicamente, funcionalmente e fisiologicamente capazes de melhorar os alimentos e a saúde do hospedeiro. Caracterização de uma estirpe com potencial probiótico inclui conhecimento da sua origem, patogenicidade, infecciosidade, fatores de virulência, viabilidade e estabilidade durante o processamento e armazenagem, resistência aos fagos, contribuição com as propriedades sensoriais, tolerância ao trato gastrointestinal, adesão celular, propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas, atividade antagonista a patógenos gastrointestinais e imunomodulação. Efeitos fisiológicos desejáveis de estirpes probióticas incluem alívio a intolerância à lactose, prevenção e redução da diarreia, doença inflamatória intestinal e alergias. Neste contexto, este artigo revisa a literatura atual referindo-se aos principais critérios para a seleção de BAL com potencial uso probiótico em alimentos.

Palavras-chave: bactérias do ácido lático, seleção, segurança, alimentos funcionais.

ABSTRACT

The use of lactic acid bacteria (LAB) in different food products has been driving the consumer market due to the potential probiotic action of these bacteria, which raises the foods to the status of functional foods. A selection of potential probiotic strains can be obtained from different food matrices and environments. However, these microorganisms must be confirmed as safe while retaining characteristics that make them technologically, functionally and physiologically capable of benefitting the food and health of the host. Characterisation of a potential probiotic strain should include knowledge of the source, pathogenicity, infectivity, virulence factors, viability during processing, storage stability, phage resistance, contribution to sensory properties, tolerance within the gastrointestinal tract, cell adhesion, antimutagenic, anticarcinogenic and antagonistic activity against gastrointestinal pathogens and immunomodulation. Desirable physiological effects of probiotic strains include aiding in lactose intolerance and prevention and reduction of diarrhoea, inflammatory bowel disease and allergies. In this context, this paper reviews the current literature referring to principal criteria for the selection of LAB for potential use as probiotics in foods.

Key words: lactic acid bacteria, screening, safety, functional foods.

2.1.1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são definidos pela FAO/WHO como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal (FAO / WHO, 2002). O valor do consumo de BAL surgiu no início do século XX, quando Metchnikoff sugeriu que a ingestão desses micro-organismos vivos, presentes no iogurte, aumentou a longevidade do consumidor. Metchnikoff atribuiu os efeitos positivos observados sobre a saúde do hospedeiro a uma redução da população de bactérias deteriorantes e/ou produtoras de toxinas no trato digestivo (BURGAIN et al., 2014).

Atualmente, o interesse é crescente no desenvolvimento de novos alimentos que contêm micro-organismos probióticos (SIDIRA et al., 2015). Recentes estudos relacionados com inclusão de cultivo probiótico de BAL, em alimentos, pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* (COMAN et al., 2012; JENSEN et al., 2012; GREGORET et al., 2013; BABOT et al., 2014).

A maioria dos probióticos comercializados e os mais estudados foram isolados a partir de produtos lácteos e do Trato Gastrointestinal (TGI) humano. De fato, as estirpes de BAL já são utilizadas em muitos produtos lácteos probióticos (GARCÍA-RUIZ et al., 2014). No entanto, o uso comercial de gêneros como probióticos na alimentação requer triagem de micro-organismos e as estirpes selecionadas devem atender às necessidades de segurança, tecnológicas, funcionais e fisiológicas (MORELLI, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Os critérios de segurança de um probiótico incluem origem documentada, atividade metabólica e ausência de características como patogenicidade, infecciosidade e fatores de virulência, incluindo a resistência aos antibióticos (SAARELA et al., 2000; MUÑOZ-ATIENZA et al., 2014; RUBIO et al., 2014). Do ponto de vista tecnológico, culturas probióticas devem permanecer viáveis durante o processamento e apresentar estabilidade ao armazenamento, resistência aos fagos, e, ao mesmo tempo, contribuir para boas propriedades sensoriais dos produtos, como o perfil aromático (VASILJEVIC; SHAH, 2008; CHAMPAGNE et al., 2011). A fermentação pela cultura deve preservar, aumentar a qualidade e alterar benéficamente o sabor do alimento (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010), gerando um produto de maior valor agregado.

Como critério funcional, estirpes probióticas devem sobreviver à passagem ao TGI, portanto, ser capazes de tolerar as condições ácidas do estômago, resistir às enzimas digestivas e aos ácidos biliares no início do intestino delgado, aderir à superfície da mucosa

intestinal e, assim, assegurar benefícios clinicamente validados para a saúde dos consumidores (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; COTTER; HILL, 2003; JENSEN et al., 2012).

Os principais requerimentos fisiológicos desejáveis para culturas probióticas são antimutagenicidade, anticarcinogenicidade, atividade antagônica frente a patógenos gastrintestinais, promoção da imunomodulação e ação sobre o metabolismo da lactose e do colesterol (ZAGO et al., 2011; BURNS et al., 2012; REN et al., 2012) . Neste contexto, neste capítulo revisa-se a literatura atual referente aos critérios de seleção de BAL para potencial uso probiótico.

2.1.2 CRITÉRIOS DE SEGURANÇA

2.1.2.1. Origem

Para atuar como um micro-organismo probiótico seguro, uma estirpe deverá ser de espécie e gênero normalmente presentes no TGI humano (KOLOZYN-KRAJEWSKA; DOLATOWSKI, 2012). A seleção de uma estirpe apropriada para cada matriz alimentar é essencial. O primeiro quesito para a seleção de um probiótico é a determinação da sua classificação taxonômica, que pode dar uma indicação da origem, *habitat* e fisiologia da estirpe. Todas estas características têm consequências importantes sobre a seleção de novas estirpes (MORELLI, 2007).

As BAL, especialmente *Lactobacillus* e *Enterococcus*, são comumente utilizadas como probióticos (BARBOSA et al., 2010; TULUMOĞLU et al., 2014). São classificados como células procarióticas, não esporuladas, Gram-positivas, que têm como característica comum a produção de ácido lático como produto principal ou único da fermentação durante o metabolismo homofermentativo ou heterofermentativo (BALCIUNAS et al., 2013). Uma série de trabalhos científicos atuais relatam seleções de BAL de diferentes fontes (por exemplo, legumes, leite e carne) para potencial uso probiótico (Tabela 1).

Tabela 1. Seleção de BAL em diferentes matrizes alimentares para potencial uso probiótico.

Fonte	Micro-organismo	Produto elaborado	Referência
Queijo	<i>L. delbrueckii</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> e <i>Streptococcus thermophiles</i>	Queijo	Gaglio et al. 2014
Queijo Artesanal	<i>L. lactis</i> e <i>E. faecalis</i>	Queijo fresco	Coelho et al. (2014)
Tradicional leite fermentado de iaque	<i>E. durans</i> , <i>L. fermentum</i> e <i>L. paracasei</i>	Leite fermentado	Ao et al. (2012)
Queijo Siahmazgi	<i>L. plantarum</i>	Salame	Kargozari et al. (2014)
Carne	<i>L. plantarum</i>	Linguiça de cordeiro fermentada	Arief et al. (2014)
Salame	<i>L. curvatus</i>	Salame	De Souza Barbosa et al. (2015)
Linguiça suína	<i>L. plantarum</i>	Linguiça	Dias et al. (2013)
Salames fabricados artesanalmente	<i>L. curvatus</i>	Carne suína cozida	Rivas et al. (2014)
Presuntos secos curados chineses	<i>L. salivarius</i>	Carne suína fresca	Luo et al. (2013)
Azeitonas industrialmente fermentadas	<i>L. pentosus</i> e <i>L. plantarum</i>	Azeitonas verdes	Blana et al. (2014)
Kimchi	<i>L. brevis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> e <i>L. sakei</i>	Embutido fermentado	Paik e Lee (2014)
Alcaparra fermentada	<i>L. plantarum</i>	Alcaparra fermentada	Palomino et al. (2014)
Fezes infantis	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i>	Embutido Fermentado	Rubio et al. (2014)

Embora as BAL sejam, Geralmente, Consideradas Como Seguras (GRAS), a sua capacidade de produção de compostos tóxicos também deve ser levada em consideração. O gênero *Enterococcus* é membro da comunidade de BAL e o seu emprego ainda é controverso, devido à presença de genes virulência em algumas espécies. Por estas razões, há a

necessidade de avaliação de toxicidade e determinantes patogênicos para os potenciais micro-organismos empregados como probióticos (LANDETA et al., 2013).

2.1.2.2. Patogenicidade

Na seleção de micro-organismos para uso probiótico deve-se considerar que algumas espécies de BAL podem ser patogênicas e infectantes, causando doenças humanas, como cárie dentária, complicações reumáticas, endocardite infecciosa, septicemia e doença vascular. A identificação de características potencialmente patogênicas pode facilitar o uso de organismos para fins probióticos (HARTY et al., 1994). A maioria dos lactobacilos são classificados como não patogênicos e, por isso, a identificação de propriedades inerentes da estirpe correlacionada com potenciais riscos a saúde pode ser difícil. Vesterlund et al. (2007) sugeriram, ao estudar estirpes probióticas, que determinadas propriedades podem indicar um risco potencial à saúde em populações, dentre elas, fatores de virulência em patógenos "verdadeiros", ou seja, a habilidade para aderir ao colágeno humano tipo IV, fibrinogênio ou muco intestinal, α - ou β -hemólise, baixa indução da explosão respiratória em células polimorfonucleares e resistência à morte mediada pelo sistema complemento.

2.1.2.3. Fatores de virulência

Fatores de virulência bacteriana podem incluir proteínas secretadas (por exemplo, toxinas proteicas e enzimas) e estruturas de superfície celular (por exemplo, polissacarídeos capsulares e lipopolissacarídeos, proteínas da membrana externa) e de outras enzimas hidrolíticas que podem contribuir para a patogenicidade do micro-organismo. Muitos genes codificam as características de virulência (por exemplo, mecanismos de secreção, fagos, catalases, reguladores, etc.) que são também indiretamente envolvidos na patogênese e são igualmente importantes para que as bactérias estabeleçam o processo infeccioso (BROGDEN et al., 2000; CHEN et al., 2005). A identificação de genes de virulência em um potencial candidato a probiótico, é importante, uma vez que a possibilidade de transferência horizontal de outras bactérias tornou-se uma preocupação na indústria alimentar (PERIN et al., 2014).

A hemólise é um fator de virulência comum entre os agentes patogênicos, facilitando a disponibilidade de ferro para o micro-organismo e causando anemia e edema no hospedeiro (VESTERLUND et al., 2007). A reação hemolítica é observada em ágar sangue suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado. Uma zona clara de hidrólise em torno das colônias

é indicativo de β -hemólise, uma hidrólise parcial indica α -hemólise e a não reação indica γ -hemólise. A determinação da atividade hemolítica é exigida em reconhecimento da importância de garantir segurança, mesmo entre um grupo de bactérias com o status de GRAS (FAO/WHO, 2002). A ausência da atividade hemolítica deve ser um critério de seleção em estirpes iniciadoras para utilização nos produtos lácteos (GIRAFFA, 1995).

Em relação à segurança das estirpes probióticas, a resistência aos antibióticos é um aspecto que requer uma análise por causa das graves preocupações sobre o crescente nível de resistência devido ao uso regular na medicina humana (MONTEAGUDO-MERA et al., 2012). Os genes de resistência a antibióticos podem ser transferidos por algumas BAL, através de plasmídeos conjugativos, bacteriófagos ou transposons, para outros micro-organismos, por transferência horizontal. Este tipo de transferência ocorre, geralmente, entre bactérias no trato gastrointestinal, com o potencial de ocorrer entre espécies inócuas e agentes patogênicos prejudiciais. Se *Lactobacillus* benéficos apresentam genes de resistência a antibióticos, esses genes poderiam ser transferidos para outra microbiota, incluindo patógenos, colonizando o mesmo ambiente, ou seja, o TGI (SHAO et al., 2015).

Critérios de seleção para os micro-organismos probióticos devem incluir características de resistência intrínseca ou natural a antimicrobianos porque é codificado cromossomicamente e, portanto, não transmissível (ARGYRI et al., 2013). A resistência intrínseca de BAL a vários antibióticos pode ser parcialmente devido aos genes que codificam as bombas de efluxo de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) que expõem diferentes tipos de antibióticos e de outros produtos químicos (corantes, solventes orgânicos, detergentes, biocidas e produtos metabólicos) (MUÑOZ et al., 2014). Quatro mecanismos são reconhecidos por conferirem resistência intrínseca em bactérias para um determinado antibiótico: 1) inativação enzimática ou a alteração do antibiótico; 2) remoção do antibiótico por bombas de efluxo e de alterações de permeabilidade da Membrana Externa (ME); 3) alteração de locais alvos bacterianos; 4) rearranjo metabólico intracelular. A maioria destes mecanismos foi observados e estudados em várias bactérias, no entanto, não há estudos específicos destes mecanismos em probióticos (BAL ou *Bifidobacterium*) (SHARMA et al., 2014).

As bactérias probióticas não devem produzir substâncias nocivas durante as atividades metabólicas. É relevante determinar se as bactérias convertem os componentes dos alimentos ou secreções biológicas em substâncias secundárias que são potencialmente prejudiciais para o hospedeiro. Por exemplo, algumas bactérias intestinais atuam sobre proteínas e seus produtos digeridos produzem amoníaco, indóis, fenóis e aminas (ISHIBASHI; YAMAZAKI,

2001). Os produtos tóxicos, como aminas biogênicas, podem ser derivados da descarboxilação de aminoácidos livres que derivam do catabolismo de ácido lático, como, por exemplo, pelas enzimas descarboxilases de *Lactobacillus* spp. (PEREIRA et al., 2001). A ingestão excessiva dessas aminas biogênicas pode ter efeitos toxicológicos sobre a saúde humana, como hipotensão ou hipertensão, dor de cabeça, náuseas, reações alérgicas, palpitação cardíaca e hemorragia intracerebral e, até mesmo, a morte, em casos muito graves (SHALABY, 1996). No entanto, as estirpes de BAL selecionadas podem agir como removedores de aminas. Por exemplo, Zhang et al. (2013) utilizaram *Lactobacillus plantarum* para diminuir o acúmulo de aminas biogênicas em linguíça de carpa prateada e alcançaram uma redução significativa. Assim, a produção de aminas biogênicas deve ser considerada na seleção de micro-organismo probiótico, devido à potencialidade em desencadear distúrbios na saúde do hospedeiro (PEREIRA et al., 2001).

A capacidade do micro-organismo para produzir o D-ácido lático é relatada como um critério de seleção de estirpes probióticas. No entanto, as estirpes não devem produzir quantidades superiores a 2 g/L. O isômero D deste ácido não é hidrolisado pela enzima lactato desidrogenase humana e pode ser prejudicial à saúde, desencadeando respostas como acidose metabólica. Só as estirpes que produzem isômeros L-ácido lático devem ser selecionadas (AMMOR et al., 2007; RUIZ-MOYANO et al., 2009).

BAL desempenham um papel na redução da absorção de gordura pelo corpo, reduzindo o colesterol no soro por meio da atividade da enzima Hidrolase de Sais Biliares (BSH), responsável pela desconjugação de sais biliares na circulação entero-hepática (ANANDHARAJ; SIVASANKARI, 2014). Contudo, o metabolismo excessivo de sais biliares no intestino delgado humano pode ser prejudicial, pois, como os sais biliares secundários (desidroxilado) são citotóxicos e pró-carcinogênicos, podem induzir lesões celulares no intestino delgado (MARTEAU et al., 1995). Begley et al. (2006) relataram que a atividade BSH microbiana pode ter diversos impactos sobre o hospedeiro, sob a forma de funções digestivas alteradas, redução do colesterol, câncer/ativação de substâncias cancerígenas e formação de cálculos biliares. Considerando esse aspecto, a ausência ou a extensão limitada da capacidade de transformação de sais biliares por bactérias adicionadas aos alimentos são sugeridas como pré-requisitos para rotular um produto como GRAS (MARTEAU et al., 1995).

2.1.3. CRITÉRIOS TECNOLÓGICOS

2.1.3.1. Viabilidade durante o processamento e armazenamento

No Brasil, leites fermentados devem conter BAL e *Bifidobacterium* em uma população de, no mínimo, 10^7 e 10^6 UFC/g ou ml, respectivamente, durante o prazo de validade dos mesmos (BRASIL, 2007). Na preparação de alimentos fermentados, probióticos apresentam um crescimento ótimo a temperaturas entre 40-42°C e temperaturas acima de 45-50°C, durante o processamento, são prejudiciais à sua sobrevivência (TRIPATHI; GIRI, 2014). A viabilidade durante as operações de armazenamento e processamento, a sobrevivência durante o trânsito intestinal e os benefícios a saúde dos consumidores são os principais critérios para a seleção de estirpes de bactérias probióticas (TALWALKAR et al., 2004). O estado fisiológico das estirpes probióticas adicionadas a um produto também pode ser um importante fator que afeta a viabilidade da estirpe. Relacionada a esse fator, a indução de respostas de estresse em estirpes probióticas pode ter um efeito drástico sobre a capacidade das culturas para sobreviverem ao processamento (tais como criodessecagem e secagem por pulverização) e trânsito gástrico (ROSS et al., 2005).

Estresse ácido pode afetar significativamente a viabilidade de uma cultura (SHAH, 2000). Conseqüentemente, os produtos lácteos são preferidos para utilização como veículos de estirpes probióticas por aumentarem a sobrevivência microbiana no suco gástrico, provavelmente devido a um efeito protetor ou de tamponamento (ROSS et al., 2005). Em geral, as culturas de *Bifidobacterium* são menos tolerantes ao suco gástrico que as culturas de *Lactobacillus*. Tolerância a um ambiente ácido também é um bom pré-requisito de desempenho tecnológico em alimentos fermentados (ROSS et al., 2005; MATO et al., 2006).

Muitos outros fatores influenciam a viabilidade dos micro-organismos probióticos em produtos alimentares durante a produção, o processamento e o armazenamento. Estes fatores incluem parâmetros alimentares (oxigênio molecular, atividade de água, presença de sal, açúcar e produtos químicos como peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, aromatizante artificial e corantes), parâmetros de processamento (tratamento térmico, temperatura de incubação, taxa de resfriamento do produto, materiais de embalagem, métodos de armazenamento e escala de produção) e parâmetros microbiológicos (estirpes probióticas, taxa e proporção de inoculação) (TRIPATHI; GIRI, 2014).

O teor de oxigênio e potencial redox também são fatores importantes para a viabilidade das espécies probióticas (microaerófilas e anaeróbias), durante o armazenamento

(SHAH, 2000). Na presença de oxigênio, as bactérias lácticas são capazes de gerar mais peróxido de hidrogênio por meio de flavoproteínas contendo oxidases, como: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido (NADH) e Superóxido Dismutase (SOD), que fazem sob condições de baixa aerobiose (MILLER; BRITIGAN, 1997; KULISAAR et al., 2002).

Em geral, oxigênio afeta os probióticos em três formas: (i) é diretamente tóxico para algumas células, (ii) certas culturas produzem peróxidos tóxicos na presença de oxigênio e (iii) os radicais livres produzidos a partir da oxidação de componentes (por exemplo, gorduras) são tóxicos para as células probióticas (KORBKANDI et al., 2011; TRIPATHI; GIRI, 2014). Uma solução é a adição de ácido ascórbico (vitamina C), que pode atuar como um eliminador de oxigênio (SHAH, 2000).

Outro fator que pode afetar a viabilidade dos probióticos é o congelamento. A etapa de congelamento no processamento de alimentos é especialmente crítica, uma vez que afeta negativamente tanto a viabilidade quanto o estado fisiológico das bactérias. A redução da temperatura afeta a estrutura e as propriedades da membrana celular. Durante o congelamento, a fase líquida é modificada para a fase líquida-cristalina, reduzindo assim a fluidez da membrana. A formação de cristais de gelo induz danos mecânicos que levam à morte celular. Além disso, a cristalização da água leva a uma criocôncntração dos solutos, o que induz alguns danos osmóticos (MCGANN, 1978; FOSCHINO et al., 1996; BEAL et al., 2001). No entanto, a capacidade de BAL para sobreviver ao congelamento e ao armazenamento difere entre as estirpes (FONSECA et al., 2000).

Fonseca et al. (2000) demonstraram que pequenas células de *Enterococcus* são mais estáveis durante o congelamento e a liofilização, em comparação aos grandes bastonetes alongados de lactobacilos. Senz et al. (2015) relataram que os bastonetes curtos eram significativamente mais estáveis do que os bastonetes alongados durante a liofilização porque os danos da membrana celular aumentavam de acordo com a área de superfície celular, devido à formação de cristais de gelo durante o congelamento extracelular. A adição de vários compostos protetores para culturas probióticas pode melhorar a sua viabilidade durante a fabricação, os exemplos incluem a glicose, que fornece energia para as células após exposição ao ácido (CORCORAN et al., 2005) e crioprotetores, como glicerol ou inulina, para melhorar a capacidade de sobrevivência durante a liofilização (FONSECA et al., 2000; CARVALHO et al., 2004).

2.1.3.2. Resistência aos fagos

Bacteriófagos (fagos) são uma ameaça constante e importante para fermentações alimentares e, particularmente, fermentações lácteas, em que a infecção de culturas iniciadoras pode resultar em fermentação lenta, de baixa qualidade, produtos inconsistentes e falha por completo na fermentação (WHITEHEAD; COX, 1935; MAHONY; SINDEREN, 2014). Os fagos ao infectarem BAL fornecem alguns dos sistemas de modelos mais avançados de interações fago-hospedeiro (MAHONY; SINDEREN, 2014). Nos últimos anos, uma série de estratégias com base na diversidade de estirpes, mutantes bacteriófagos-insensível e plasmídeos que carregam mecanismos fago-resistência (BARRANGOU et al., 2007) foi concebida e implementada para minimizar tanto a presença de fagos na indústria de laticínios como seu impacto econômico sobre os processos de fermentação (BRIGGILER-MARCÓ et al., 2014).

As bactérias desenvolveram uma variedade de mecanismos de defesa naturais que têm como alvo diferentes etapas do ciclo de vida do fago, bloqueando a adsorção, impedindo a injeção de DNA, a restrição da entrada do DNA e os sistemas de infecção abortiva (BARRANGOU et al., 2007). Briggiler-Marcó et al. (2011) utilizaram duas metodologias para isolar bactérias resistentes aos fagos mutantes: os métodos de Placa de Ágar (PA) e da Cultura Secundária (CS). Caracterização do fenótipo de resistência a fagos, análise e caracterização genética de mutantes resistentes aos fagos identificaram um mutante MC4 que pode ser utilizado na fabricação de leite fermentado.

Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas (CRISPR) são locais hipervariáveis amplamente distribuídos em bactérias e *Archaea*, que fornecem imunidade adquirida contra elementos genéticos estranhos. CRISPR representam uma família de DNA que consiste, tipicamente, de repetições curtas e altamente conservadas, espaçadas por espaçadores chamados sequências variáveis e são, muitas vezes, adjacentes a genes *cas* (associados à CRISPR) (SOREK et al., 2008; HORVATH et al., 2009). O sistema CRISPR-*cas* pode, conseqüentemente, ser explorado como um mecanismo de defesa contra vírus e também potencialmente utilizado para reduzir a disseminação de elementos genéticos móveis e de aquisição de características indesejáveis, tais como genes de resistência a antibióticos e virulência. A partir de uma perspectiva de evolução do fago, as sequências de fagos integradas no *locus* CRISPR podem também proporcionar pontos de ancoragem suplementares para facilitar a recombinação durante infecções subsequentes de fagos, aumentando, assim, o conjunto de genes aos quais os fagos têm acesso (BARRANGOU et al.,

2007). *Locus* CRISPR parece ser uma característica distintiva em BAL, a partir da filogenia e genoma evolutivo. A capacidade do sistema CRISPR para proporcionar imunidade contra elementos genéticos estranhos é essencial e ativamente envolvida na propensão do micro-organismo sobreviver à predação pelo fago e adaptar-se ao ambiente natural (HORVATH et al., 2009).

2.1.3.3 Contribuição das propriedades sensoriais aos alimentos

BAL não são consideradas como bactérias fortemente proteolíticas, no entanto, uma parte do seu sistema proteolítico tem sido intensamente explorada nas últimas décadas, porque é essencial para o crescimento ótimo destes micro-organismos no leite (LOPEZ-KLEINE; MONNET, 2011). Variabilidade intra e interespecífica na produção de ácido, autólise e proteólise são comumente relatadas para as estirpes provenientes de fontes alimentares naturais (FRANCIOSI et al., 2009).

A proteólise é considerada um dos mais importantes processos bioquímicos envolvidos na fabricação de muitos produtos fermentados. Na fabricação do queijo, a proteólise da caseína desempenha papel crucial porque os aminoácidos resultantes da proteólise são os principais precursores de compostos aromáticos específicos, como vários álcoois, aldeídos, ácidos, ésteres e compostos de enxofre. O amargor, que resulta da acumulação de peptídeos hidrofóbicos (isto é, peptídeos ricos em prolina), torna-se um importante fator de preocupação, com a qualidade, na elaboração de queijos gouda e cheddar (SMUKOWSKI et al., 2003; SMIT et al., 2005; SAVIJOKI et al., 2006). A correlação entre a estirpe utilizada e o sabor de embutidos fermentados está estabelecida (SIDIRA et al., 2015). Sabor e odor são produzidos a partir de potenciais precursores, que podem ser produzidos por hidrólise e auto-oxidação de lípidos, proteólise e transformação de aminoácidos em compostos aromáticos e metabolismo de hidratos de carbono (AMMOR et al., 2007). Sah et al. (2014), em seu estudo com probióticos, verificaram que a alta atividade proteolítica gera peptídeos com propriedades antioxidantes e potenciais antimutagênicos. Triagem para proteinases, peptidases e atividades aminopeptidases é, portanto, recomendada.

Exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros com ampla distribuição na natureza. Sua ocorrência é bem documentada em todos os organismos (animais, plantas, fungos e bactérias) e estão envolvidos em várias funções biológicas, como armazenamento de energia (amido), constituição da parede celular (celulose) e comunicação celular (glicosaminoglicanos) (BADEL et al., 2011). EPS microbianos produzidos por BAL têm recebido maior atenção e

interesse devido ao seu *status* de GRAS (AHMED et al., 2013; LI et al., 2014). Os EPS podem ser utilizados como aditivos alimentares para melhorar a textura, o que favorece o desenvolvimento de novos produtos alimentares com uma melhor aparência, estabilidade e propriedades reológicas (DE VUYST et al., 2001).

Lactobacillus produzem moléculas de EPS em quantidades elevadas (>100 mg/L), predominantemente em meios contendo glucose. A atividade biológica e a viscosidade do EPS dependem do seu peso molecular, da composição de açúcar e da estrutura primária (KODALI et al., 2009). Os EPS podem desempenhar funções não só relacionadas às características tecnológicas. Por exemplo, Liu et al. (2010) e Nikolic et al. (2012) observaram que EPS secretado por bactérias probióticas, como *Bacillus licheniformis* e *Lactobacillus paraplantarum*, têm capacidade imunomoduladora, imunossupressora e anti-inflamatória. Efeitos antitumorais, redução do colesterol no sangue e aumento da colonização de bactérias probióticas no TGI também foram observados (WELMAN; MADDOX, 2003). EPS podem funcionar como parte de um mecanismo de defesa contra bacteriófagos, impedindo a sua adsorção (LAMOTHE et al., 2002).

BAL desenvolveram mecanismos para suportar várias concentrações de NaCl que, geralmente, envolvem a absorção ou a síntese de um número limitado de solutos (BREMER; KRAEMER, 2000). Ge et al. (2011) relataram que o estresse osmótico pode tornar-se o principal fator de inibição para o crescimento bacteriano e a fermentação. Reale et al. (2015) relataram que osmotolerância é um critério importante para a seleção de estirpes para aplicações tecnológicas a partir de estudo com *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*. Em particular, algumas estirpes isoladas de queijo e fezes humanas demonstraram boa tolerância a concentrações elevadas de NaCl, sendo importante a utilização em alimentos fermentados para pesquisar o seu desempenho tecnológico. Ammor et al. (2007) afirmaram que a capacidade da estirpe probiótica em competir com a microbiota natural do produto e realizar as atividades metabólicas está relacionada à sua taxa de crescimento e sobrevivência na matriz alimentar, destacando as elevadas concentrações de sal que variam de 2% a 15% no produto final.

A produção de gás por BAL pode ser necessária em alguns produtos, o *kefir* e em alguns queijos, como, por exemplo, gouda, edam e danbo (LEITE et al., 2013; PEDERSEN et al., 2013). A produção de gás pode aumentar o número e/ou o tamanho das olhaduras em queijos semiduros. Formação de olhaduras no queijo é um processo complexo influenciada por uma série de fatores, destacando a formação de gás, a difusão do gás, a presença de núcleos de formação de olhaduras, o pH e a elasticidade da massa do queijo, assim como os

parâmetros tecnológicos (FRÖHLICH-WYDER et al., 2013). Tammam et al. (2001) relataram que a produção anaeróbica de CO₂ por lactobacilos prevalece no queijo. Em contraste, BAL heterofermentativas não são adequadas para a produção de salame por causa da formação de grandes quantidades de dióxido de carbono, levando a orifícios de tamanhos diferentes no produto. Além disso, estas BAL produzem concentrações de ácido acético que causam um sabor picante desagradável (BUCKENHÜSKES, 1993; AMMOR et al., 2007).

Compostos aromáticos desempenham papel importante na percepção do sabor, determinando uma propriedade importante ao produto e para a escolha do consumidor (YEE et al., 2014). Diacetil (2,3-butanodiona) é um produto volátil do metabolismo do citrato produzido por bactérias do ácido lático e, quando unido ao ácido lático e aos efeitos de textura, melhora o perfil sensorial dos alimentos fermentados (RINCON-DELGADILLO et al., 2012; XIAO; LU, 2014). O diacetil também pode inibir micro-organismos patogênicos ao difundir-se pelas membranas bacterianas e interferir com as funções metabólicas essenciais (HOR; LIONG, 2014). Altos níveis de diacetil estão associados com um desequilíbrio de sabor, sabor amargo e aroma desagradável (CLARK; POTTER, 2007), mas é utilizado como ingredientes na formulação de muitos produtos alimentares, tais como queijo cottage, margarina, essências de óleo vegetal, queijo processado, creme de leite e para aumentar os níveis de aroma amanteigado que ocorre associado naturalmente à fermentação (RINCON-DELGADILLO et al., 2012).

2.1.4. CRITÉRIOS FUNCIONAIS

2.1.4.1. Tolerância ao TGI

Algumas BAL têm propriedades probióticas benéficas para a saúde humana. No entanto, o ácido gástrico e os sais biliares têm influências adversas na sobrevivência e na viabilidade dos probióticos ingeridos. A maioria dos micro-organismos tem baixa taxa de sobrevivência e viabilidade em condições ácidas, por exemplo, que ocorrem no ambiente gástrico humano, em que os valores de pH variam entre 1,5 e 3,5 (HUANG et al., 2014). Estirpes probióticas devem ser capazes de sobreviver a altas concentrações de lisozima na saliva humana, às condições de estresse ácido e enzimas digestivas (pepsina), ou seja, do estômago, e a bile no intestino delgado (CORZO; GILLIAND, 1999; MARCO et al., 2006; LIU et al., 2013).

Resistência a ácidos e tolerância à bile são considerados os critérios básicos para a triagem de potenciais estirpes probióticas (LIU et al., 2013; REN et al., 2014), e essas propriedades são o foco de vários trabalhos sobre o isolamento de potenciais estirpes probióticas. Por exemplo, as estirpes de *Lactobacillus* foram consideradas resistentes às condições ácidas para 3 horas, em pH 2,5, e as estirpes isoladas a partir de amostras de alimentos foram capazes de crescer a uma concentração de bile, simulando as concentrações normais do intestino humano, para períodos de incubação de até 4 horas (FEDERICI et al., 2014). *L. plantarum* N8, N9, ZL5 e *L. casei* ZL4 foram resistentes ao suco intestinal simulado (WANG et al., 2014). *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, em leite de cabra, apresentaram maior tolerância ao fluido gástrico simulado, quando testado em combinação, sugerindo um efeito sinérgico entre estirpes (RANADHEERA et al., 2014). *Lactobacillus fermentum*, *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* foram capazes de crescer no suco intestinal e, possivelmente, mostraram melhor resistência a ácidos biliares no início do intestino delgado (RUBIO et al., 2014).

A capacidade de lactobacilos sobreviverem ao baixo pH permanece controversa (REN et al., 2014). Os mecanismos que podem contribuir para uma resposta de tolerância ácido adaptativa incluem a indução de um novo sistema de homeostase do pH e a síntese de um novo conjunto de proteínas conhecidas como proteínas de estresse. As proteínas de estresse podem ser transitoriamente ou constitutivamente produzidas e contribuir para a resposta de tolerância ácido adaptativa. Proteínas induzidas após o choque térmico, incluindo as de classe chaperonina DnaK e GroEL, mostraram homologia com proteínas produzidas durante o choque ácido. Estas proteínas são capazes de re-enrolamento de proteínas desnaturadas pelo calor nos seus estados nativos e podem proteger as proteínas de desnaturação durante o estresse celular (FOSTER, 1993; SHAH, 2000). Além disso, a tolerância ao estresse ácido por micro-organismos envolve múltiplos genes e mecanismos de proteção e regulação (PATNAKIK et al., 2002; YE et al., 2013). Ye et al. (2013) relataram que uma técnica de amplificação de todo genoma propenso a erros obteve êxito para melhorar a tolerância ao estresse ácido por *L. pentosus*. Os possíveis mecanismos para aumento da tolerância ao ácido dos mutantes gerados incluíram diminuição da condutividade da membrana de prótons, aumento da extrusão de prótons ou aumento da capacidade de tamponamento do citoplasma.

A resistência a sais biliares é também uma propriedade importante para estirpes probióticas (FAO / WHO, 2002). Ren et al. (2014) afirmaram que estirpes mais tolerantes à bile são fortemente propícias a aliviar os sintomas de intolerância à lactose. Noh e Gilliland (1993) afirmaram que a permeabilidade das células de *L. acidophilus* aumentam na presença

de bile, permitindo, assim, que mais substrato entre nas células e, conseqüentemente, aumente a atividade de β -galactosidase das mesmas.

O estresse causado pela bile, geralmente, tem maior sensibilidade aos efeitos deletérios em bactérias Gram-positivas que em bactérias Gram-negativas. No entanto, a condição encontrada no ambiente externo, ou no hospedeiro anteriormente ao intestino delgado, irá determinar os efeitos da bile em uma estirpe. A exposição da bactéria a vários níveis de pH, temperatura e atmosfera modificada para crescimento pode melhorar a sua resistência aos efeitos deletérios da bile ou aumentar a sua susceptibilidade. A presença de alimentos no intestino pode também afetar a sobrevivência. Como as bactérias ficam em microambientes na matriz celular ou certos componentes alimentares se ligam aos ácidos biliares, não há exposição das bactérias com a bile, impedindo a ação tóxica. Pré-exposição das bactérias para baixos níveis de ácidos biliares pode aumentar a sua tolerância a níveis elevados. Pré-exposição a um estresse também pode conferir proteção contra outros estresses, um fenômeno chamado de adaptação cruzada. Muitas concentrações têm efeitos semelhantes sobre a fisiologia celular e podem também causar a indução do mesmo conjunto de proteínas de estresse. Sistemas de respostas ligados ao estresse podem, eventualmente, se sobrepor e serem interligados (BEGLEY et al., 2005). Portanto, a tolerância ao ácido e à bile em estirpes probióticas, provavelmente, envolve mecanismos semelhantes.

2.1.4.2. A adesão às células epiteliais do intestino

O processo de adesão probiótica envolve várias propriedades biofísicas e bioquímicas dos probióticos e das camadas de células epiteliais. Essas propriedades incluem interações eletrostáticas, forças passivas e estéricas, hidrofobia, capacidade de autoagregação e estruturas celulares específicas, como apêndices externos. Estas propriedades variam entre as estirpes probióticas e são relatadas como características específicas das espécies (SCHILLINGER et al., 2005; COLLADO et al., 2007; RANADHEERA et al., 2014). Além de sobreviver à passagem ao TGI, os micro-organismos probióticos também devem ser capazes de aderir e de colonizar o epitélio intestinal, a fim de competir com organismos patogênicos (MONTEAGUDO-MERA et al., 2012; RANADHEERA et al., 2014). Esta competição pode resultar na exclusão (TUOMOLA, 1999), reduzindo, assim, o risco de doenças causadas por organismos patogênicos (CHAPMAN et al., 2014), tornando-se um importante critério de seleção.

As estirpes de *Lactobacillus reuteri* demonstraram capacidade de adesão elevada que poderia, eventualmente, reforçar a barreira epitelial *in vitro* em 24 horas (JENSEN et al., 2012). *L. pentosus* E108, *L. plantarum* B282 e *L. paracasei* subsp. *paracasei* E94 apresentaram boa aderência a células Caco-2 (ARGYRI et al., 2013), enquanto *L. casei* 12668-1 e *Enterococcus faecalis* 18.156-3 mostraram forte capacidade de adesão às células intestinais (FEDERICI et al., 2014). *Pediococcus pentosaceus* CIAL-86 mostrou excelente aderência e boa atividade antiadesão contra *E. coli* CIAL-153 (GARCÍA-RUIZ et al., 2014). As estirpes de *L. plantarum* N8, N9, ZL5 ZL4 e *L. casei* foram capazes de exercer atividade inibidora significativa *in vitro* contra *Campylobacter jejuni* e inibiram eficazmente a adesão e a invasão de células HT-29 de *Clostridium jejuni* (WANG et al., 2014). A capacidade de adesão dos *Lactobacillus* probióticos promove um maior tempo de permanência no intestino, a exclusão de agentes patogênicos e a interação com as células hospedeiras para proteger as células epiteliais e induzir modulação imune (OUWEHAND et al., 1999).

As dificuldades de estudar a adesão bacteriana *in vivo* levaram ao desenvolvimento de modelos *in vitro* para estudos preliminares de estirpes aderentes (VESTERLUND et al., 2005). Testes como hidrofobicidade e autoagregação são realizados porque essas características da superfície celular são consideradas necessárias para a adesão. Estas características facilitam a colonização temporária, bem como a proteção do sistema do hospedeiro, devido à formação de biofilme sobre o tecido. Alguns estudos têm mostrado que a hidrofobicidade e a autoagregação são importantes para promover a colonização dos probióticos em nichos ecológicos, tais como o TGI ou o trato urogenital (PELLETIER et al., 1997; DEL RE et al., 2000; GIAOURIS et al., 2009).

Hidrofobicidade da superfície celular é uma das propriedades físico-químicas que facilitam o primeiro contato entre o micro-organismo e as células hospedeiras (SCHILLINGER et al., 2005). A inicial e reversível fase de contato é mediada por um complexo de interações físico-químicas, incluindo hidrofobicidade e cargas, que são consideradas propriedades inespecíficas, mas importantes (PELLETIER et al., 1997). Os isolados que apresentam elevados valores de hidrofobicidade estão associados com alta capacidade para autoagregação e adesão a células Caco-2 (KOTZAMANIDIS et al., 2010). *Lactobacillus* que mostram uma afinidade para um solvente apolar acima de 40%, geralmente apresentam características hidrofóbicas mais elevadas (GIAOURIS et al., 2009). Dias et al. (2013) e Ren et al. (2014) relataram estirpes de *Lactobacillus* com elevada hidrofobicidade de 59% e 54,75%, respectivamente.

A auto e a coagregação de probióticos são processos necessários para a ocorrência de adesão ao epitélio intestinal e a formação de barreiras que impedem a colonização por microorganismos patogênicos (DEL RE et al., 2000). A agregação é um fenótipo relacionado às propriedades de aderência da célula (PELLETIER et al., 1997; KOS et al., 2003). De acordo com Del Re et al. (2000), estirpes com valores inferiores a 10% são designadas como não autoagregantes. Estirpes de *L. salivarius* e *L. plantarum* tiveram alta capacidade para autoagregação (REN et al., 2012). *L. subsp. salivarius. salicinius*, *L. acidophilus* e *L. plantarum* obtiveram valores relativamente elevados para autoagregação (46%, 45% e 34%, respectivamente), em comparação com a estirpe de *L. rhamnosus* (33%) (REN et al., 2014). Quatro isolados de *Lactobacillus* obtiveram taxa de autoagregação com valores superiores a 90% (BAUTISTA-GALLEGO et al., 2013).

A capacidade de coagregação das espécies de *Lactobacillus* com potenciais agentes patogênicos pode prevenir a colonização do intestino por estes patógenos (BAO et al., 2010). Assim, as estirpes probióticas devem mostrar a capacidade de coagregar com as estirpes patogênicas testadas, mas a capacidade de coagregação é estirpe específica (COLLADO et al., 2007). Em geral, os lactobacilos têm uma maior coagregação com *Listeria monocytogenes* (DIAS et al., 2013). Esta propriedade pode ser relacionada com a formação de biofilmes por espécies mistas, como relatado por Veen e Abee (2011).

2.1.5. CRITÉRIOS FISIOLÓGICOS DESEJÁVEIS

Os probióticos podem melhorar a função do sistema imunitário e a saúde geral do hospedeiro. Esta revisão examina os principais efeitos dos critérios fisiologicamente desejados para uma estirpe probiótica. Alguns dos efeitos de saúde estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro e os mecanismos de estirpes probióticas em estudos científicos.

Efeito a saúde	Mecanismo	Autores
Diminuição da intolerância à lactose	Ação da enzima β -galactosidase	De Vrese et al. (2014)
Tratamento e prevenção de alergia	Pré-hidrólise da β -lactoglobulina	Pescuma et al. (2015)
Menor risco para o desenvolvimento de tumores malignos	Diminuição dos níveis de enzimas: glucuronidase β -, azoredutase, nitroredutase e ativação de pró-carcinógenos	Vasiljevic e Shah (2008)
Efeito hipocolesterolêmico	Atividade BSH	Peres et al. (2014)
Inibição de <i>Helicobacter pylori</i> e agentes patogênicos intestinais	Secreção de componentes proteicos ou ácido orgânico, diminui a capacidade de adesão de <i>H. pylori</i> a células epiteliais gástricas, reduz a inflamação da mucosa, e estabiliza a barreira gástrica.	Kabir et al. (1997); Zheng et al. (2014)
Efeito imunomodulador intestinal	β -Supra-regulação de IL-6 no ceco	Lähteinen et al. (2014)
Decréscimo de infecção por HIV	Exposição do receptor CD4 por células de lactobacilos por inibição do HIV-1	Su et al. (2013)

2.1.5.1. Intolerância à lactose

Má absorção de lactose primária, que é acompanhada por uma queda contínua da atividade da lactase na infância e na adolescência e hipolactasia na idade adulta, é um processo fisiológico normal em humanos. Isso pode resultar em desconforto gastrointestinal depois de consumir produtos que contenham lactose, uma condição chamada Intolerância à Lactose (IL). Os sintomas podem ser desagradáveis e incluem dor e distensão abdominal, flatulência e diarreia. Alguns produtos lácteos, como queijo, contêm pouca ou nenhuma lactose e, muitas vezes, o iogurte é mais bem tolerado que o leite (DE VRESE, 2014; KIES, 2014). A Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) emitiu um parecer positivo para os alimentos com lactose reduzida, uso de enzima lactase como um suplemento dietético

e iogurte com bactérias viáveis (KIES, 2014). A capacidade dos micro-organismos para fermentar a lactose no leite é uma importante propriedade (ZÁRATE; CHAIA, 2012). Assim, muitos estudos focam sobre o metabolismo de lactose por micro-organismos potencialmente probióticos (IQBAL et al., 2010; RHIMI et al., 2010; ZÁRATE; CHAIA, 2012).

A enzima β -galactosidase catalisa a hidrólise de lactose (um dissacarídeo abundantemente encontrado no leite) em glicose e galactose (USTOK et al., 2010). As possíveis fontes da enzima são as plantas, os órgãos de animais, as bactérias, as leveduras, os fungos e os bolores. Entre estas, as fontes microbianas são claramente preferíveis por causa da sua facilidade de produção fermentativa, atividades elevadas e, geralmente, uma boa estabilidade. β -galactosidase foi utilizada como um biocatalisador importante na indústria do leite, bem como na produção carboidrato sintético (IQBAL et al., 2010). β -galactosidase produzida por culturas puras e mistas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 77 foram caracterizadas como estáveis na variação de pH de 7-9 e o intervalo de temperatura de 20-37 °C, mantendo a 80%-90% da sua atividade inicial. Como resultado, estas enzimas poderiam ser consideradas como potenciais candidatas para a hidrólise da lactose do leite e dos produtos lácteos (USTOK et al., 2010).

Rhimi et al. (2010) realizaram um estudo em que o gene que codifica a β -galactosidase a partir da estirpe *Streptococcus thermophilus* LMD9 foi clonado, sequenciado e expresso em *Escherichia coli*. A enzima recombinante purificada era um biocatalisador poderoso para a lactose a partir de extrato de soro de leite, que é uma fonte barata de D-galactose e D-glucose. Relevante importância é visualizada quando se consideram estes monossacarídeos utilizados em produtos de baixo teor calórico ou adoçantes hipocalóricos. Além disso, esta proteína cliva, de forma eficiente, a lactose no leite e pode, assim, ajudar a diminuir o problema da intolerância à lactose gerado por produtos lácteos. A doença IL afeta quase 70% da população mundial e o consumo de produtos modificados pode ser uma boa maneira de incorporar alimentos lácteos e nutrientes para as dietas de indivíduos com intolerância à lactose (VASILJEVIC; SHAH, 2008; KAILASAPATHY, 2013).

2.1.5.2. Prevenção e redução da diarreia

A alteração microbiota intestinal por antibióticos é um importante fator de risco para diarreia e colonização por *Clostridium difficile* (LAWLEY et al., 2012). Esta é uma complicação comum para a maioria dos tipos de antibióticos, de amplo espectro, especialmente como a clindamicina, beta lactâmicos e cefalosporinas de terceira geração. As

taxas de infecção por *Clostridium difficile* têm aumentado em todo o mundo ao longo dos anos (MCFARLAND, 2009).

Os probióticos têm várias aplicações benéficas para a saúde, como a redução da colonização de patógenos (VANDENPLAS et al., 2014). A diarreia pode ser prevenida por meio da interrupção dos mecanismos potenciais: competição para inibir o receptor relacionado ao crescimento de agentes patogênicos (nutrientes), do sítio de aderência, produção de bacteriocina, defensina ou redução do pH do intestino e a estimulação do sistema imune do hospedeiro (NG et al., 2009) A eficácia do probiótico contra antibiótico associado à diarreia dependerá especificamente da estirpe e do tipo de doença. Assim, a estirpe probiótica escolhida deve ter mecanismos de ação sobre a doença (MCFARLAND, 2009).

Estudo com *L. plantarum*, *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em camundongos BALB/c, evidenciou que as estirpes foram fundamentais para fortalecer a resistência à colonização por bactérias fecais, suprimir a multiplicação de patógenos oportunistas e restaurar o equilíbrio da microbiota (TIAN et al., 2014).

Uma mistura de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Lc. lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* foi testada em um modelo animal de infecção por *Clostridium difficile* e demonstrou capacidade para prevenir a diarreia e a enterocolite desencadeadas por *C. difficile* (BOLLA et al., 2013).

2.1.5.3. A prevenção da doença inflamatória do intestino

Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerativa (CU) são as duas principais formas de Doença Inflamatória Intestinal (DII) de alta morbidade e ambas acarretam custos de cuidados à saúde (REIFF; KELLY, 2010). A evidência sugere que uma anormalidade na resposta da imunidade inata e adaptativa desempenha papel importante na inflamação intestinal (LIU, 2009). Culturas probióticas podem reduzir a reincidência da doença após o tratamento com esteroides e/ou cirurgia. Assim, a presença de uma população microbiana diversificada no TGI e alterações que ocorrem durante a DII proporcionam suporte adequado para o uso de probióticos no tratamento desta doença (FEDORAK; DEMERIA, 2012).

Huang et al. (2013) relataram efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores *in vitro* e *in vivo* de *L. plantarum* K68 isolado a partir de um alimento fermentado tradicional, em Taiwan. *L. plantarum* K68 amenizou o dextrano sulfato de sódio que induziu CU em camundongos BALB/c por meio das suas atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras que podem ser eficazes no tratamento de outras doenças inflamatórias. Juarez et al. (2013)

também relataram um efeito benéfico de *L. reuteri* CRL1101 ao diminuir a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por macrófagos tratados com lipopolissacarídeo, indicando que é um probiótico candidato para a prevenção e o controle de doenças inflamatórias sistêmicas.

2.1.5.4. Prevenção da alergia

O uso de probióticos no tratamento e na prevenção de alergias, permitindo uma adequada estimulação do sistema imune, é uma proposta atrativa. Muitos autores têm relatado resultados promissores que apoiam claramente a eficácia dos probióticos na prevenção de algumas doenças alérgicas, justificando ensaios experimentais com foco na seleção de estirpes a serem utilizadas e no tempo de administração destes probióticos (PELUCCHI et al., 2012).

Prescott e Bjorkesten (2007) afirmaram que as doenças alérgicas resultam de uma falha fundamental de regulação imune subjacente. Indiscutivelmente, a exposição microbiana fornece um forte sinal no ambiente para a maturação normal pós-natal do sistema imune e também induz a maturação de células apresentadoras de antígenos e células T reguladoras, que são essenciais para a programação e a regulação da resposta de células T.

Lactobacillus rhamnosus GG reduziu a prevalência de eczema atópico em crianças (RAUTAVA et al., 2002). Probióticos específicos podem modular a colonização microbiana precoce, que representa o primeiro alvo de intervenção na doença alérgica, juntamente com a sua capacidade de inverter o aumento característico de permeabilidade intestinal em crianças com eczema atópico e alergia alimentar. Probióticos também aumentam as respostas de IgA específica do intestino que são alteradas em crianças com alergia alimentar. Além disso, os probióticos têm o potencial para aliviar a inflamação alérgica, tanto local como sistemicamente.

No entanto, infelizmente, resultados contraditórios entre os estudos não permitem, atualmente, uma recomendação para o uso de probióticos na prevenção da alergia. Estas contradições decorrem de variações de estudo, por exemplo, o tipo de população estudada em termos de idade, tipo de doença alérgica, o estágio da doença, o número de pacientes incluídos, a herança genética e o meio ambiente (BUTEL, 2014). Portanto, uma nota de advertência deve ser feita ao contínuo entusiasmo do público para com os probióticos, até que se obtenham resultados mais conclusivos (PRESCOTT; BJORKESTEN, 2007).

2.1.5.5. Probióticos e *Helicobacter pylori*

O *Helicobacter pylori* é um agente patogênico intestinal que causa infecção ao longo do tempo, o que pode desencadear gastrite crônica e úlcera péptica e, aumentar o risco de tumores gástricos. Os probióticos não eliminam a população de *H. pylori*, mas podem reduzir a inflamação associada a estas bactérias, em animais e em seres humanos (VASILJEVIC; SHAH, 2008; KAILASAPATHY, 2013).

Um recombinante de *Lc. lactis* expressando urease B pode ser utilizado para o desenvolvimento de uma vacina alimentar, proporcionando antígeno, para controlar a infecção por *H. pylori*. A urease é um fator de virulência importante necessária para a colonização da mucosa gástrica por *H. pylori*, uma vez que catalisa a conversão da ureia em amônia e CO₂, elevando o pH para próximo da neutralidade. A urease B é um antígeno amplamente estudado, com potencial para o desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas contra a infecção por *H. pylori* (DEL GIUDICE et al., 2001; ZHANG et al., 2014).

BAL aumentam a taxa de erradicação da infecção por *H. pylori*, inibindo o seu crescimento por meio da secreção de componentes de proteínas ou de ácido orgânico; diminuindo sua capacidade de aderência às células epiteliais gástricas, reduzindo assim a inflamação da mucosa e contribuindo para a estabilização da barreira gástrica (KABIR et al., 1997; ZHENG et al., 2014). Zheng et al. (2014) relataram que *L. pentosus* LPS16 demonstrou ação de amplo espectro contra *H. pylori*.

2.1.5.6. A modulação do sistema imunológico

Culturas probióticas podem influenciar a função imune do corpo. Evidências de sistemas *in vitro* e modelos animais e seres humanos sugerem que estes micro-organismos podem aumentar as respostas imunitárias não específicas, possivelmente por meio da ativação de macrófagos, do aumento dos níveis de citocininas, do aumento da atividade das células natural killer e/ou do aumento dos níveis de imunoglobulinas (SINGH et al., 2011; KAILASAPATHY, 2013).

Lee et al. (2011) avaliaram a atividade de lactobacilos probióticos selecionados sobre a função imune, mensurando a proliferação de linfócitos e de interferon- γ (IFN- γ). Estirpes de *L. gasseri* e *L. plantarum* induziram maior liberação de citocinas IFN- γ . *L. fermentum* e *L. plantarum* LA12 (CJMA1, CJLP56, CJLP133, CJLP243, BJ53 e CJNR26) foram mais

eficazes na indução da proliferação dos linfócitos que o controle positivo. Estas estirpes foram caracterizadas como benéficas, em termos de modulação imunitária.

O popular queijo fresco do Brasil (queijo minas frescal), contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* LA14 BL05, foi utilizado para alimentar, por duas semanas, ratos Wistar adultos. Os autores desse trabalho concluíram que este queijo probiótico pode ser uma alternativa viável para a melhoria do sistema imune e pode ser utilizado para prevenir infecções, em particular aquelas relacionadas com o excesso de esforço físico de atletas (LOLLO et al., 2012).

Kotzamanidis et al. (2010) afirmaram que *L. reuteri* DC421, *L. rhamnosus* DC429 e *L. plantarum* 2035 apresentaram atividade regulatória das respostas imunes iniciais nas bolsas de ar e intestinos, em ratos, o que foi caracterizado pela estimulação de quimiotaxia das células polimorfonucleares, atividade fagocitária, combinação de receptores do tipo Toll, TLR2/TLR4/TLR9, sinalização e secreção de um certo perfil de citocinas. A ativação destas respostas imunes específicas por esses micro-organismos não patogênicos ajuda a manter a homeostase e fornece ao hospedeiro saudável uma maior capacidade de resistir a qualquer resposta inflamatória.

2.1.5.7. A redução do risco associado com efeitos mutagênicos e carcinogênicos

Antigenotoxicidade, antimutagenicidade e anticarcinogenicidade são potenciais propriedades funcionais dos probióticos que despertam muita atenção atualmente. A evidência foi obtida a partir de estudos *in vitro* e em modelos animais que suportam efeitos anticancerígenos significativos de probióticos (KAILASAPATHY, 2013; SERBAN, 2014). Substâncias genotóxicas ou agentes ambientais ou autobióticos gerados no interior do corpo podem induzir alterações genéticas ou dano que podem conduzir a mutações e à carcinogênese (WOGAN et al., 2004). Os melhores candidatos como antimutágenos poderiam ser componentes dietéticos naturais, incluindo BAL (AMBALAM et al., 2011).

Butirato é gerado a partir de lactato formado pelas BAL e *Bifidobacterium* (DUNCAN; FLINT, 2013), exerce efeitos potentes sobre uma grande variedade de funções da mucosa do cólon, tais como inibição de inflamação e carcinogênese, reforço de vários componentes da barreira de defesa do cólon e diminuição do estresse oxidativo. Além disso, o butirato pode promover a saciedade (HAMER et al., 2008). *Lactococcus plantarum* e *Bifidobacterium* Bb12 têm potencial antigenotóxico intrínseco e podem ter efeitos protetores contra os estágios iniciais de câncer de cólon (BURNS; ROWLAND, 2004).

L. rhamnosus (Lr 231) isolados de fezes humanas têm a capacidade de se ligarem com Laranja de Acridina (AO), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) e 2-amino-3,8-dimetilimidazo-[4,5-f]-quinoxalina (MeIQx), mas não a 4-Nitro-o-Fenilenodiamina (NPD), indicando uma variação na ligação e atividade antimutagênica. Ligação instantânea de AO e MNNG por LR 231 pode ajudar na remoção rápida de agentes mutagênicos e, assim, evitar a sua absorção no intestino. A ligação de MNNG e MeIQx por LR 231 resulta em uma modificação do espectro de agentes mutagênicos, implicando em biotransformação mutagênico residual e desintoxicação subsequente de agentes mutagênicos. Assim, uma potencial estirpe probiótica humana de Lr 231 tem a capacidade de se ligar, biotransformar e desintoxicar mutagênicos e essa propriedade pode ser útil na formulação de alimentos fermentados para a remoção de agentes mutagênicos potentes (AMBALAM et al., 2011).

Sah et al. (2014) relataram que os organismos probióticos tiveram um efeito estatisticamente significativo sobre a atividade proteolítica com alta produção de peptídeos com potenciais propriedades antioxidantes e antimutagênicas, com uma boa correlação entre as atividades proteolítica e antioxidante ou antimutagênicas. Os peptídeos gerados por fermentação de leite com estirpes de *Lactobacillus* podem contribuir com uma variedade de compostos bioativos que podem ter efeito positivo na saúde humana e serem utilizados comercialmente em novos produtos, ou na produção de novos peptídeos anticancerosos.

2.1.5.8. Efeito antagonista a bactéria patogênica *E. coli*

Entre os micro-organismos patogênicos mais estudados, o grupo dos coliformes, tem grande atenção, por serem indicadores da qualidade higiênica dos alimentos produzidos, principalmente quando ocorre contaminação fecal (GOTTARDI et al., 2008), pertencendo a esse grupo as bactérias do gênero *E. coli*. Chioda et al. (2007) ao utilizar estirpes de *Lactobacillus* frente ao patógeno *E. coli*, obtiveram êxito no efeito antagônico. Os autores reportaram que os mecanismos inibitórios estão relacionados à produção em maior ou menor quantidade de substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriocinas.

Aoudia et al. (2015) reportaram que biofilme composto por estirpes de *Lactobacillus* inibiram o crescimento de diversos agentes patogênicos de alimentos, incluindo *E. coli* O157:H7. No entanto, os autores ressaltam que a atividade antagônica é uma propriedade estirpe específica. Tsai et al. (2008) demonstraram que as substâncias antibacterianas produzidas por *L. acidophilus* RY2, *L. salivarius* MM1 e *L. paracasei* EN4

tiveram efeito antagonista frente a *E. coli* enterotoxigênica. Os autores relataram que o processo inibitório pode está relacionado ao pH e o ácido láctico, e outros fatores, como por exemplo, peptídeos de cadeia curta resistentes à proteases.

Estirpes de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* DR20 e *B. lactis* DR10 reduziram a população de *E. coli* no estudo de Gopal et al. (2001). Segundo os autores a inibição pode está relacionada a uma ação sinérgica do ácido láctico produzido por essas bactérias e substâncias proteicas.

2.1.6. CONCLUSÃO

Estirpes probióticas podem ser selecionadas a partir de diferentes ambientes e matrizes alimentares para incorporação em vários produtos alimentares, aumentando, assim, a funcionalidade dos alimentos e a promoção de efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor. No entanto, para exercer estes efeitos, um rigoroso critério é necessário para selecionar estirpes probióticas seguras, funcionais e com características tecnológicas e fisiológicas desejáveis. Alguns métodos de seleção foram discutidos nesta revisão. Embora o conhecimento adquirido com os ensaios existentes e publicações científicas, ainda são necessários estudos em humanos para elucidar os mecanismos de interação entre as estirpes e o hospedeiro, uma vez que os efeitos probióticos podem ser espécie específica.

2.1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, Z.; WANG, Y.; ANJUM, N.; AHMAD, A.; KHAN, S.T. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II. **Food Hydr.**, v. 30, n. 1, p. 343-350, 2013.

AMBALAM, P.; DAVE, J.M.; NAI, R.B.M.; VYAS, B.R.M. *In vitro* mutagen binding and antimutagenic activity of human *Lactobacillus rhamnosus* 231. **Anaerobe**, v. 17, n. 5, p. 217-222, 2011.

AMMOR, M.S.; FLÓREZ, A.B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiol.**, v. 24, n. 6, p. 559-570, 2007.

ANANDHARAJ, M.; SILVASANKARI, B. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 118, n. 2, p. 153-159, 2014.

AO, X.; ZHANG, X.; ZHANG, X.; SHI, L.; ZHAO, K.; YU, J.; DONG, L.; CAO, Y.; CAI, Y. Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products. **J. Dairy Sci.**, v. 95, n. 3, p. 1073-1084, 2012.

AOUDIA, N.; RIEU, A.; BRIANDET, R.; DESCHAMPS, J.; CHLUBA, J.; JEGO, G.; GARRIDO, C.; GUZZO, J. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. **Food Microbiol.**, 2015. doi:10.1016/j.fm.2015.04.009

ARGYRI, A.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K.A.G.; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G.J.E.; PANAGOUE, E.Z.; TASSOU, C.C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. **Food Microbiol.**, v. 33, n. 2, p. 282-291, 2013.

ARIEF, I.I.; WULANDARI, Z.; ADITIA, E.L.; BAIHAQI, M. Physicochemical and microbiological properties of fermented lamb sausages using probiotic *Lactobacillus plantarum* IIA-2C12 as starter culture. **Procedia Environ. Sci.**, v. 20, n. 1, p. 352-356, 2014.

ASHRAF, R.; SHAH, N.P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 149, n. 3, p. 194-208, 2011.

- BABOT, J.D.; ARGANÑARAZ-MARTÍNEZ, E.; SAAVEDRA, L.; APELLA, M.C.; PEREZ CHAIA, A. Selection of indigenous lactic acid bacteria to reinforce the intestinal microbiota of newly hatched chicken - relevance of *in vitro* and *ex vivo* methods for strains characterization. **Res. Vet. Sci.**, v. 97, n. 1, p. 8-17, 2014.
- BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. **Biotech. Adv.**, v. 29, n. 1, p. 54-66, 2011.
- BALCIUNAS, E.M.; MARTINEZ, F.A.C.; TODOROV, S.D.; FRANCO, B.D.G.M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R.P.S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134-142, 2013.
- BAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; YONG, L.; SHUIQUAN, W.; XIMEI, D.; YANYAN, W.; ZHANG, H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 695-701, 2010.
- BARBOSA, J.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 651-656, 2010.
- BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D.A.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Sci.**, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, 2007.
- BAUTISTA-GALLEGO, J.; ARROYO-LÓPEZ, F.N.; RANTSIOU, K.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; COCOLIN, L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Res. Int.**, v. 50, n. 1, p. 135-142, 2013.
- BEAL, C.; FONSECA, F.; CORRIEU, G. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophiles* is related to membrane fatty acid composition. **J. Dairy Sci.**, v. 84, n. 11, p. 2347-2356, 2001.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, n. 4, p. 625-651, 2005.
- BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.C.M. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 1729-1738, 2006.
- BLAJMAN, J.; GAZIANO, C.; ZBRUN, M.V.; SOTO, L.; ASTESANA, D.; BERISVIL, A.; SCHARPEN, A.R.; SIGNORINI, M.; FRIZZO, L. *In vitro* and *in vivo* screening of native

lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens. **Res. Vet. Sci.**, v. 101, p. 50-56, 2015.

BLANA, V.A.; GROUTA, A.; TASSOU, C.C.; NYCHAS, G.J.E.; PANAGOUE, E.Z. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. **Food Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 208-218, 2014.

BOLLA, P.A.; CARASI, P.; BOLLA, M.D.L.A.; DE ANTONI, G.L.; SERRADELL, M.D.L.A. Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. **Anaerobe**, v. 21, n. 1, p. 28-33, 2013.

BRASIL lidera crescimento do mercado de alimentos funcionais na AL. São Paulo. MetaAnálise, Inteligência de mercado para os melhores negócios. 2014. Disponível em: http://www.metaanalise.com.br/inteligenciademercado/index.php?option=com_content&view=article&id=9685:brasil-lidera-crescimento-do-mercado-de-alimentos-funcionais-na-al&catid=11:estrategias&Itemid=360. Acessado em: 31 de Maio de 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 24 de Novembro de 2007. Aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, p. 4, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Oficializa métodos analíticos oficiais físico-químicos para o controle de leite e produtos lácteos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Seção 1, p. 08, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de Junho de 2001. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, p. 10, 2001.

BREMER, E.; KRAMER, R. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: STORZ, G. HENGGE-AREONIS, R. **Bacterial stress response**. Washington D.C: ASM Press, 2000, p. 79-97.

BRIGGILER-MARCÓ, M.; MERCANTI, D.; REINHEIMER, J.A.; QUIBERONI, A. Performance of spontaneous phage-resistant derivatives of *Lactobacillus plantarum* in fermented milk manufacture. **Int. Dairy J.**, v. 21, n. 11, p. 857-862, 2011.

BRIGGILER-MARCÓ, M.; ZACARÍAS, M.F.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.A.; QUIBERONI, A. Biological and probiotic characterisation of spontaneous phage-resistant mutants of *Lactobacillus plantarum*. **Int. Dairy J.**, v. 39, n. 1, p. 64-70, 2014.

BROGDEN, K.A. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**. 3. ed. Washington DC: ASM Press, 2000. 294 p.

BUCKENHÜSKES, H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 1-3, p. 253-271, 1993.

BURGIN, J.; SCHER, J.; FRANCIUS, G.; BORGES, F.; CORGNEAU, M.; REVOL-JUNELLES, A.M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; GAIANI, C. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 213, n. 1, p. 21-35, 2014.

BURNS, A.J.; ROWLAND, I.R. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. **Mutat. Res.**, v. 551, n. 1-2, p. 233-243, 2004.

BURNS, P.; CUFFIA, F.; MILESI, M.; VINDEROLA, G.; MEINARDI, C.; SABBAG, N.; HYNES, E. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. **Food Microbiol.**, v. 30, n. 1, p. 45-50, 2012.

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

CARTAXO, F.Q.; LEITE, M.L.M.V.; SOUSA, W.; VIANA, J.A.; ROCHA, L.P. Desempenho bioeconômico de cabritos de diferentes grupos genéticos terminados em confinamento. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v. 14, n. 1, p. 224-232, 2013.

CARVALHO, A.S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F.X.; GIBBS, P. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. **Biotechnol Prog.**, v. 20, n. 1, p. 248-254, 2004.

CHAMPAGNE, C.P.; ROSS, R.P.; SAARELA, M.; HANSEN, K.F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 149, n. 3, p. 185-193, 2011.

CHAPAVAL, L.; OLIVINDO, C.S.; SOUZA, F.G.C.; ALVES, F.S.F.; FROTA, I.M.A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comun. Sci.**, v. 1, n.1, p. 49-56, 2010.

CHAPMAN, C.M.C.; GIBSON, G.R.; ROWLAND, I. Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and *in vitro* adhesion to bladder cells by urinary tract pathogens. **Anaerobe**, v. 27, n. 1, p. 71-76, 2014.

CHEN, L.; YANG, J.; YU, J.; YAO, Z.; SUN, L.; SHEN, Y.; JIN, Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 1, p. 325-332, 2005.

CHIODA, A.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.S.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Cienc. Rural**, v. 37, n. 2, 2007.

CLARK, S.; POTTER, E.D. Cottage Cheese. In: Hui, YH. **Handbook of food products manufacturing: health, meat, milk, poultry, seafood and vegetables**. v. 2, Hoboken, 2007. p. 618-633.

COELHO, M.C.; SILVA, C.C.G.; RIBEIRO, S.C.; DAPKEVICIUS, M.L.N.E.; ROSA, H.J.D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 191, n. 1, p. 53-59, 2014.

COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.S.; SALMINEN, S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different method. **J. Microbiol. Methods**, v. 71, n. 1, p. 71-74, 2007.

COMAN, M.M.; CECCHINI, C.; VERDENELLI, M.C.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; CRESCI, A. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 157, n. 3, p. 346-352, 2012.

CORCORAN, B.M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 6, p. 3060-3067, 2005.

CORZO, G.; GILLILAND, S.E. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.**, v. 82, n. 3, p. 472-480, 1999.

COTTER, P.D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiol. Mol. Biol. R.**, v. 67, n. 3, p. 429-453, 2003.

DE SOUZA BARBOSA, M.D.S.; TODOROV, S.D.; IVANOVA, I.; CHOBERT, J.M.; HAERTLÉ, T.; DE MELO FRANCO, B.D.G. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. **Food Microbiol.**, v. 46, n. 1, p. 254-262, 2015.

DE VRESE, M.; LAUE, C.; OFFICK, B.; SOETH, E.; REPENNING, F.; THOß, A.; SCHREZENMEIR, J. A combination of acid lactase from *Aspergillus oryzae* and yogurt bacteria improves lactose digestion in lactose maldigesters synergistically: A randomized, controlled, double-blind cross-over trial. **Clin. Nutr.**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2014.

DE VUYST, L.; VIN, F.D.; DEGEEST, F.V.B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **Int. Dairy J.**, v. 11, n. 9, p. 687-707, 2001.

DEL GIUDICE, G.; COVACCI, A.; TELFORD, J.L.; MONTECUCCO, C.; RAPPUOLI, R. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, n. 1, p. 523-563, 2001.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 31, n. 6, p. 438-442, 2000.

DIAS, F.S.; DUARTE, W.F.; SANTOS, M.R.R.M.; RAMOS, E.M.; SCHWAN, R.F. Screening of *Lactobacillus* isolated from pork sausages for potential probiotic use and evaluation of the microbiological safety of fermented products. **J. Food Protect.**, v. 76, n. 6, p. 991-998, 2013.

DINIZ, A. E.; MARCONDES, F. C.; COPPINI, N. L. **Tecnologia da usinagem dos** DUNCAN, S.H.; FLINT, H.J. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. **Maturitas**, v. 75, n. 1, p. 44-50, 2013.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Sci.**, v. 55, n. 3, p. 297-300, 2000.

EUTHIER, S.M.F.; TRIGUEIRO, I.N.S.; RIVERA, F. Condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de cabra "tipo coalho", artesanal elaborado no Curimataú Paraibano. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 2, 1998.

FAO / WHO. **Orientações para a avaliação de probióticos na alimentação.** London, 2002. 11 p.

FAO. 2010. **Country Pasture/Forage Resource Profiles – Brazil.** London, 2010. 35 p.

FEDERICI, S.; CIARROCCHI, F.; CAMPANA, R.; CIANDRINI, E.; BLASI, G.; BAFFONE, W. Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from Ciauscolo salami produced in Central Italy. **Meat Sci.**, v. 98, n. 4, p. 575-584, 2014.

FEDORAK, R.; DEMERIA, D. Probiotic bacteria in the prevention and the treatment of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Clin. North A.**, v. 41, n. 4, p. 821-842, 2012.

FONSECA, F.; BEAL, C.; CORRIEU, G. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. **J. Dairy Res.**, v. 67, n. 1, p. 83-90, 2000.

FOSCHINO, R.; FIORI, E.; GALLI, A. Survival and residual activity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures under different conditions. **J. Dairy Res.**, v. 63, n. 2, p. 295-303, 1996.

FOSTER, J.W. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 7, p. 1981-1987, 1993.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **Int. Dairy J.**, v. 19, n. 1, p. 3-11, 2009.

FRÖHLICH-WYDER, M.T.; GUGGISBERG, D.; BADERTSCHER, R.; WECHSLER, D.; WITTEWER, A.; IRMLER, S. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus parabuchneri* on the eye formation of semi-hard cheese. **Int. Dairy J.**, v. 33, n. 2, p. 120-128., 2013.

GAGLIO, R.; SCATASSA, M.L.; CRUCIATA, M.; MIRAGLIA, V.; CORONA, O.; DI GERLANDO, R.; PORTOLANO, B.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. *In vivo* application and dynamics of lactic acid bacteria for the four-season production of Vastedda-like cheese. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 177, n. 1, p. 37-48, 2014.

GARCÍA-RUIZ, A.; GONZÁLEZ DE LLANO, D.; ESTEBAN-FERNÁNDEZ, A.; REQUENA, T.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Assessment of probiotic

properties in lactic acid bacteria isolated from wine. **Food Microbiol.**, v. 44, n. 1, p. 220-225, 2014.

GE, X.Y.; YUAN, J.; QIN, H.; ZHANG, W.G. Improvement of L-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, n. 1, p. 73-78, 2011.

GIAOURIS, E.; CHAPOT-CHARTIER, M.P.; BRIANDET, R. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 131, n. 1, p. 2-9, 2009.

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-Listeria factors in dairy technology. **Food Microbiol.**, v. 12, n. 1, p. 291-299, 1995.

GOPAL, P.K.; PRASAD, J.; SMART, J.; GILL, H.S. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 67, n. 3, p. 207-216, 2001.

GOTTARDI, C.P.T.; MURICY, R.F.; CARDOSO, M.; SCHMIDT, V. Goat's milk quality by coliform's and staphylococci counting. **Cienc. Rural**, v. 38, n. 3, 2008.

GREGORET, V.; PEREZLINDO, M.J.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; BINETTI, A. A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. **Food Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 19-28, 2013.

HAMER, H.M.; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.; TROOST, F.J.; BRUMMER, R.J. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Aliment Pharm. Ther.**, v. 27, n. 2, p. 104-119, 2008.

HARTY, D.W.S.; OAKEY, H.J.; PATRIKAKIS, M.; HUME, E.B.H.; KNOX, K.W. Pathogenic potential of lactobacilli. **Food Microbiol.**, v. 24, n. 1-2, p. 179-189, 1994.

HOR, Y.Y.; LIONG, M.T. Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. **Dermatol. Sin.**, v. 32, n. 3, p. 141-147, 2014.

HORVATH, P.; COÛTÉ-MONVOISIN, A.C.; ROMERO, D.A.; BOYAVAL, P.; FREMAUX, C.; BARRANGOU, R. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 131, n. 1, p. 62-70, 2009.

HUANG, H.Y.; HSIEH, H.Y.; KING, V.A.E.; CHI, L.L.; TSEN, J.H. To pre-challenge lactic acid bacteria with simulated gastrointestinal conditions is a suitable approach to studying potential probiotic properties. **J. Microbiol. Methods.**, v. 107, n. 1, p. 138-146, 2014.

HUANG, H.Y.; KORIVI, M.; TSAI, C.H.; YANG, J.H.; TSAI, Y.C. Supplementation of *Lactobacillus plantarum* K68 and fruit-vegetable ferment along with high fat-fructose diet attenuates metabolic syndrome in rats with insulin resistance. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2013, n. 1, p. 1-12, 2013.

IQBAL, S.; NGUYEN, T.H.; NGUYEN, T.T.; MAISCHBERGER, T.; HALTRICH, D. Beta-Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 345, n. 10, p. 1408-1416, 2010.

ISHIBASHI, N.; YAMAZAKI, S. Probiotics and safety. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, n. 2, p. 465-470, 2001.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 153, n. 1-2, p. 216-222, 2012.

JUAREZ, G.E.; VILLENA, J.; SALVA, S.; DE VALDEZ, G.F.; RODRIGUEZ, A.V. *Lactobacillus reuteri* CRL1101 beneficially modulate lipopolysaccharide-mediated inflammatory response in a mouse model of endotoxic shock. **J. Funct. Foods**, v. 5, n. 4, p. 1761-1773, 2013.

KABIR A.M.; AIBA, Y.; TAKAGI, A.; KAMIYA, S.; MIWA, T.; KOGA, Y. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. **Gut**, v. 41, n. 1, p. 49-55, 1997.

KAILASAPATHY, K. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits-a review. **Int. J. Fermented Foods**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2013.

KARGOZARI, M.; MOINI, S.; AKHONDZADEH BASTI, A.; EMAM-DJOMEH, Z.; GANDOMI, H.; REVILLA MARTIN, I.; GHASEMLOU, M.; CARBONELL-BARRACHINA, A.A. Effect of autochthonous starter cultures isolated from Siahmazgi

cheese on physicochemical, microbiological and volatile compound profiles and sensorial attributes of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage. **Meat Sci.**, v. 97, n. 1, p. 104-114, 2014.

KIES, A.K. Authorised EU health claims related to the management of lactose intolerance: reduced lactose content, dietary lactase supplements and live yoghurt cultures. In: SADLER, M. **Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised EU Health Claims**. 1. ed. Reino Unido: Woodhead Publishing, 2014. 444p.

KODALI, V.P.; DAS, S.; SEM, R. An exopolysaccharide from a probiotic: Biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity. **Food Res. Int.**, v. 42, n. 5-6, p. 695-699, 2009.

KOŁOZYN-KRAJEWSKA, D.; DOLATOWSKIB, Z.J. Probiotic meat products and human nutrition. **Process Biochem.**, v. 47, n. 12, p. 1761-1772, 2012.

KORBKANDI, H.; MORTAZAVIAN, A.M.; IRAVANI, S. Technology and stability of probiotic in fermented milks. In: SHAH, N. CRUZ, A. G. FRIA, J. A. F. **Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to the human health**. New York: Science Publishers, 2011. p. 131-169.

KOS, B.; KOVIC, J.S.; VUKOVIC, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, n. 6, p. 981-987, 2003.

KOTZAMANIDIS, C.; KOURELIS, A.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N.; YIANGOU, M. Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 140, n. 2-3, p. 154-163, 2010.

KULISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEMM, T.; ANNUK, H.; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative strains as promising probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 215-224, 2002.

LÄHTEINEN, T.; LINDHOLMA, A.; RINTTILÄ, T.; JUNNIKKALAA, S.; KANTA, R.; PIETILÄ, T.A.; LEVONENC, K.; OSSOWSKIA, I.; SOLANO-AGUILARB, G.; JAKAVA-VILJANENC, M.; PALVA, A. Effect of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 as a feeding supplement on the performance and immune function of piglets. **Vet. Immunol. Immunop.**, v. 158, n. 1-2, p. 14-25, 2014.

LAMOTHE, G.T.; JOLLY, L.; MOLLET, B.; STINGELE, F. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii subsp.*

bulgaricus. **Arch. Microbiol.**, v. 178, n. 3, p. 218-228, 2002.

LANDETA, G.; CURIEL, J.A.; CARRASCOSA, A.V.; MUÑOZ, R.; DE LAS RIVAS, V. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. **Meat Sci.**, v. 95, n. 2, p. 272-280, 2013.

LAWLEY, T.D.; CLARE, S.; WALKER, A.W.; STARES, M.D.; CONNOR, T.R.; RAISEN, C.; GOULDIN, D.; RAD, R.; SCHREIBER, F.; BRANDT, C.; DEAKIN, L.J.; PICKARD, D.J.; DUNCAN, S.H.; FLINT, H.J.; CLARK, T.G.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G. Targeted restoration of the intestinal microbiota with a simple, defined bacteriotherapy resolves relapsing *Clostridium difficile* disease in mice. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 10, p. 995-1002, 2012.

LEE, J.; YUN, H.S.; CHO, K.W.; OH, S.; KIM, S.H.; CHUN, T.; KIM, B.; WHANG, K.Y. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus spp.*: immune modulation and longevity. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 148, n. 2, p. 80-86, 2011.

LEITE, M.O.; LEITE, D.C.; DEL AGUILA, E.M.; ALVARES, T.S.; PEIXOTO, R.S.; MIGUEL, M.L.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **J. Dairy Sci.**, v. 96, n. 7, p. 4149-4159, 2013.

LÉONARD, L.; BEJI, O.; ARNOULD, C.; NOIROT, E.; BONNOTTE, A.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; LHERMINIER, J.; SAUREL, R.; OULAHAL, N. Preservation of viability and anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei*, entrapped in gelling matrices of alginate or alginate/caseinate. **Food Control**, v. 47, p. 7-19, 2015.

LI, W.; JI, J.; RUI, X.; YU, J.; TANG, W.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*. **LWT-Food Sci. Technol.**, v. 59, n. 2, p. 732-739, 2014.

LIU, C.; LU, J.; LU, L.; LIU, Y.; WANG, F.; XIAO, M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 14, p. 5528-5533, 2010.

LIU, X.; LIU, W.; ZHANG, Q.; TIAN, F.; WANG, G.; ZHANG, H.; CHEN, W. Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 563-568, 2013.

LIU, Z.J. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 46, p. 5784-5788, 2009.

LOLLO, P.C.B.; CRUZ, A.G.; MORATO, P.N.; MOURA, C.S.; CARVALHO-SILVA, L.B.; OLIVEIRA, C.A.F.; FARIA, F.; AMAYA-FARFAN, J. Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. **J. Dairy Sci.**, v. 95, n. 7, p. 3549-3558, 2012.

LOPEZ-KLEINE, L.; MONNET, V. **Lactic Acid Bacteria/ Proteolytic System**. 2. ed. Academic Press, 2011, pp. 49-55.

LUO, Z.; GASASIRA, V.; HUANG, Y.; LIU, D.; YANG, X.; JIANG, S.; HU, W. Effect of *Lactobacillus salivarius* H strain isolated from Chinese dry-cured ham on the color stability of fresh pork. **Food Sci. Hum. Wellness**, v. 2, p. 3-4, p. 139-145, 2013.

MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. Novel strategies to prevent or exploit phages in fermentations, insights from phage-host interactions. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 32, n. 1, p. 8-13., 2014.

MARCO, M.L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 17, n. 2, p. 204-210, 2006.

MARTEAU, P.; GERHARDTS, M.F.; MYARAS, A.; BOUVIERI, E.; TRIVINS, F.; RAMBAUD, J.C. Metabolism of Bile Salts by Alimentary Bacteria During Transit in the Human Small Intestine. **Microb. Ecol. Health D.**, v. 8, n. 4, p. 151-157, 1995.
materiais. 6. ed. São Paulo: Artliber, 2006. 248 p.

MÄTTÖ, J.; ALAKOMI, H.L.; VAARI, A.; VIRKAJÄRVI, I.; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. **Int. Dairy J.**, v. 16, n. 9, p. 1029-1037, 2006.

MCFARLAND, L.V. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. **Anaerobe**, v. 15, n. 6, p. 274-280, 2009.

MCGANN, L.E. Differing actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 15, n. 4, p. 382-390, 1978.

MILLER, R.A.; BRITIGAN, B.E. Role of oxidants in microbial pathophysiology. **Clin. Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 1997.

MONTEAGUDO-MERA, A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA J.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARMESTO, M.R.; FERRERO, M.Á. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **J. Funct. Foods**, v. 4, n. 2, p. 531-541, 2012.

MORELLI, L. *In vitro* assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. **Int. Dairy J.**, v. 17, n. 11, p. 1278-1283, 2007.

MUÑOZ, M.C.C.; BENOMAR, N.; LERMA, L.L.; GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 172, n. 1, p. 110-118, 2014.

MUÑOZ-ATIENZA, E.; ARAÚJO, C.; MAGADÁN, S.; HERNÁNDEZ, P.E.; HERRANZ, C.; SANTOS, Y.; CINTAS, L.M. *In vitro* and *in vivo* evaluation of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 41, n. 2, p. 570-580, 2014.

NG, S.C.; HART, A.L.; KAMM, M.A.; STAGG, A.J.; KNIGHT, S.C. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 15, n. 2, p. 300-310, 2009.

NIKOLIC, M.; LÓPEZ, P.; STRAHINIC, I.; SUÁREZ, A.; KOJIC, M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M.; TOPISIROVIC, L.; GOLIC, N.; RUAS-MADIEDO, P. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 158, n. 2, p. 155-162, 2012.

NOH, D.O.; GILLILAND, S. Influence of Bile on Cellular Integrity and Galactosidase Activity of *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.**, v. 76, n. 5, p. 1253-1259, 1993.

OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V.; GRÖNLUND, M.M.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.J. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. **Int. Dairy J.**, v. 9, n. 9, p. 623-630, 1999.

PAIK, H.D.; LEE, J.Y. Investigation of reduction and tolerance capability of lactic acid bacteria isolated from kimchi against nitrate and nitrite in fermented sausage condition. **Meat Sci.**, v. 97, n. 4, p. 609-614, 2014.

PALOMINO, J.M.; TOLEDO DEL ÁRBOL, J.; BENOMAR, N.; ABRIOUEL, H.; MARTÍNEZ CAÑAMERO, M.; GÁLVEZ, A.; PULIDO, R. Application of *Lactobacillus plantarum* Lb9 as starter culture in caper berry fermentation. **LWT - Food Sci. Technol.**, v.

60, n. 2, p. 788-794, 2014.

PATNAIK, R.; LOUIE, S.; GAVRILOVIC, V.; PERRY, K.; STEMMER, W.P.C.; RYAN, C.M.; DEL CARDAYRÉ, S. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. **Nat. Biotechnol.**, v. 20, n. 7, p. 707-712, 2002.

PEDERSEN, T.B.; RISTAGN, D.; MCSWEENEY, P.L.H.; VOGENSE, F.K.Y.; ARD, Y. Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. **Int. Dairy J.**, v. 33, n. 2, p. 112-119, 2013.

PELLETIER, C.; BOULEY, C.C.; BOUTTIER, S.; BOURLIOUX, P.; BELLON-FONTAINE, M.N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 5, p. 1725-1731, 1997.

PELUCCHI, C.; CHATENAUD, L.; TURATI, F.; GALEONE, C.; MOJA, L.; BACH, J.F.; LA VECCHIA, C. Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. **Epidemiol.**, v. 23, n. 3, p. 402-414, 2012.

PEREIRA, C.I.; CRESPO, M.T.B.; ROMAO, M.V.S. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 68, n. 3, p. 211-216, 2001.

PERES, C.M.; ALVES, M.; MENDOZA, A.H.; MOREIRA, L.; SILVA, S.; BRONZE, M.R.; VILAS-BOAS, L.; PERES, C.; MALCATA, X. Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 59, n. 1, p. 234-246, 2014.

PERIN, L.M.; MIRANDA, R.O.; TODOROV, S.D.; FRANCO, B.D.G.M.; NERO, L.A. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 185, n. 1, p. 121-126, 2014.

PESCUMA, M.; ELVIRA, M.H.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J.M.; MOZZI, F.; VALDEZ, G.F. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CRL 454 cleaves allergenic peptides of b-lactoglobulin. **Food Chem.**, v. 170, n. 1, p. 407-414, 2015.

PRESCOTT, S.; BJÖRKSTÉN, B. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, n. 2, p. 255-262, 2007.

QUEIROGA, R.C.R.E.; SANTOS, B.M.; GOMES, A.M.P.; MONTEIRO M.J.; TEIXIERA, S.M.; SOUZA, E.L.; PEREIRA, C.J.D.; PINTADO, M.M.E. Nutritional, textural and sensory

properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 50, n. 2, p. 538-544, 2013.

RANADHEERA, C.S.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S.K. Effect of dairy probiotic combinations on *in vitro* gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. **J. Funct. Foods**, v. 8, n. 1, p. 18-25, 2014.

RAUTAVA, S.; KALLIOMÄKI, M.; SOLAURI, E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 109, n. 1, p. 119-121, 2002.

REALE, A.; DI RENZO, T.; ROSSI, F.; ZOTTA, T.; LACUMIN, L.; PREZIUSO, M.; PARENTE, E.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT-Food Sci. Technol.**, v. 60, n. 1, p. 721-728, 2015.

REIFF, C.; KELLY, D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, n. 1, p. 25-33, 2010.

REN, D.; LI, C.; QIN, Y.; YIN, R.; DU, S.; YE, F.; LIU, C.; LIU, H.; WANG, M.; LI, Y.; SUN, Y.; LI, X.; TIAN, M.; JIN, N. *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. **Anaerobe**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2014.

REN, D.; LI, C.; QIN, Y.; YIN, R.; LI, X.; TIAN, M.; DUB, S.; GUOB, H.; LIU, C.; ZHUB, N.; SUNB, D.; LI, Y.; JIN, N. Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment. **Anaerobe**, v. 18, n. 5, p. 508-515, 2012.

RHIMI, M.; BOISSON, A.; DEJOB, M.; BOUDEBOUZE, S.; MAGUIN, E.; HASER, R.; AGHAJARI, N. Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a β -galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. **Res. Microbiol.**, v. 161, n. 7, p. 515-525, 2010.

RINCON-DELGADILLO, M.I.; LOPEZ-HERNANDEZ, A.; WIJAYA, I.; RANKIN, S.A. Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. **J. Dairy Sci.**, v. 95, n. 3, p. 1128-1139, 2012.

RIVAS, F.P.; CASTRO, M.P.; VALLEJO, M.; MARGUET, E.; CAMPOS, C.A. Sakacin Q produced by *Lactobacillus curvatus* ACU-1: functionality characterization and antilisterial activity on cooked meat surface. **Meat Sci.**, v. 97, n. 4, p. 475-479, 2014.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiol.**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2010.

ROSS, R.P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, n. 6, p. 1410-1417, 2005.

RUBIO, R.; JOFRÉ, A.; MARTÍN, B.; AYMERICH, T.; GARRIGA, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. **Food Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 303-311, 2014.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; BENITO, M.J.; CASQUETE, R.; SERRADILLA, M.J.; CÓRDOBA, M.G. Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry fermented sausages. **Meat Sci.**, v. 83, n. 3, p. 460-467, 2009.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. Biotechnol.**, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2010.

SAH, B.N.P.; VASILJEVIC, T.; MCKECHNIE, S.; DONKOR, O.N. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. **Food Chem.**, v. 156, n. 1, p. 264-70, 2014.

SAMPAIO, B.; SAMPAIO, Y.; LIMA, R.C.; AIRES, A.; SAMPAIO, G. A Economia da Caprinocultura em Pernambuco: Problemas e Perspectivas. **R. Eco.**, v. 35, n. 2, p. 137-159, 2009.

SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 71, n. 4, p. 394-406, 2006.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, H.W. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **Int. Dairy J.**, v.15, n. 12, p. 1289-1297, 2005.

SENZ, M.; LENGERICH, B.V.; BADER, J.; STAHL, U. Control of cell morphology of probiotic *Lactobacillus acidophilus* forenhanced cell stability during industrial processing. **Int. J. Food Microbiol.**, v.192, n. 1, p. 34-42, 2015.

SERBAN, D.E. Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. **Cancer lett.**, v. 345, n. 2, p. 258-270, 2014.

SHAH, N.P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dair. **Foods J. Dairy Sci.**, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Res. Int.**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SHAO, Y.; ZHANG, W.; GUO, H.; PAN, L.; ZHANG, H.; SUN, T. Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. **Food Control**, v. 50, n. 1, p. 250-258, 2015.

SHARMA, P.; TOMAR, S.K.; GOSWAMI, P.; SANGWAN, V.; SINGH, R. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Res. Int.**, v. 57, n. 1, p. 176-195, 2014.

SIDIRA, M.; KANDYLIS, P.; KANELLAKI, M.; KOURKOUTAS, Y. Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on the evolution of flavor compounds in probiotic dry-fermented sausages during ripening. **Meat Sci.**, v. 100, n. 1, p. 41-51, 2015.

SILVA, G.S.; FERRARI, I.S.; SILVA, C.D.A.; ALMEIDA JÚNIOR, W.L.G.; CARRIJO, K.F.; DA COSTA, M.M.; SILVA, A.E.V.N.; DIAS, F.S. Microbiological and physical-chemical profile of goat milk in the semiarid region of the San Francisco Valley. **Vet. Notification**, v.19, n. 1, p. 14-22, 2013.

SILVEIRA, E.O.; LOPES NETO, J.H.; SILVA, L.A.; RAPOSO, A.E.S.; MAGNANI, M.; CARDARELLI, H.R. The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of a probiotic chocolate goat dairy beverage. **Food Sci. Technol.**, v. 62, n. 1, p. 445-451, 2015.

SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. **Asian. Pac. J. Trop. Biomed.**, v. 1, n. 2, p. 287-290, 2011.

SMIT, G.; SMIT, B.A.; ENGELS, W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, n. 3, p. 591-610, 2005.

SMUKOWSKI, M.; WENDORFF, W.L.; PING, Y.; RAO, R.D. Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. **J. Dairy Sci.**, v. 86, (suppl. 1), p. 364, 2003.

- SOREK, R.; KUNIN, V.; HUGENHOLTZ, P. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 3, p. 181-186, 2008.
- SU, Y.; ZHANGA, B.; SU, L. CD4 detected from *Lactobacillus* helps understand the interaction between *Lactobacillus* and HIV. **Microbiol. Res.**, v. 168, n. 5, p. 273- 277, 2013.
- SWETWIWATHANA, A.; VISESSANGUAN, W. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. **Meat Sci.**, v. 109, p. 101-105, 2015.
- TABOADA, N.; NIEUWENHOVE, C.V.; ALZOGARAY, S.L.; MEDINA, R. Influence of autochthonous cultures on fatty acid composition, esterase activity and sensory profile of Argentinean goat cheeses. **J. Food Compos. Anal.**, v. 40, p. 86-94, 2015.
- TALWALKAR, A.; MILLER, C.W.; KAILASAPATHY, K.; NGUYEN, M.H. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 39, n. 6, p. 605-611, 2004.
- TAMMAM, J.D.; WILLIAMS, A.G.; BANKS, J.; COWIE, G.; LLOYD, D. Membrane inlet mass spectrometric measurement of O₂ and CO₂ gradients in cultures of *Lactobacillus paracasei* and a developing Cheddar cheese ecosystem. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 65, n. 1-2, p. 11-22, 2001.
- TERZIĆ-VIDOJEVIC, A.; TONKOVIC, K.; PAVUNC, A.L.; BEGANOVIĆ, J.; STRAHINIĆ, I.; KOJIĆ, M.; VELJOVIC, K.; GOLIĆ, N.; KOS, B.; CADEZ, N.; GREGUREK, G.; ŠUŠKOVIĆ, J.; RASPOR, P.; TOPISIROVIĆ, L. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. **Food Sci. Technol.**, 2015. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.050
- TIAN, P.; XU, B.; SUN, H.; LI, X.; LI, Z.; WEI, P. Isolation and gut microbiota modulation of antibiotic-resistant probiotics from human feces. **Diagn. Micr. Infect. Di.**, v. 79, n. 4, p. 405-412, 2014.
- TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **J. funct. Foods**, v. 9, n. 1, p. 225-241, 2014.
- TSAI, C.C.; LIN, P.P.; HSIEH, Y.M. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown *in vitro*. **Anaerobe**, v. 14, n. 2, p. 61–67, 2008.

TULUMOĞLU, S.; KAYA, H.I.; ŞİMŞEK, Ö. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. **Anaerobe**, v. 30, n. 1, p. 120-125, 2014.

TUOMOLA, E. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. **Fems. Immunol. Med. Mic.**, v. 26, n. 2, p. 137-142, 1999.

USTOK, F.I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of b-galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chem.**, v. 119, n. 3, p. 1114-1120, 2010.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **J. Pediatr.**, v. 91, n. 1, p. 6-21, 2014.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. **Int. Dairy J.**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

VEEN, S.V.D.; ABEE, T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 144, n. 3, p. 421-431, 2011.

VESTERLUND, S.; PALTTA, J.; KARP, M.; OUWEHAND, A.C. Measurement of bacterial adhesion-*in vitro* evaluation of different methods. **J. Microbiol. Method.**, v. 60, n. 2, p. 225-233, 2005.

VESTERLUND, S.; VANKERCKHOVEN, V.; SAXELIN, M.; GOOSSENS, H.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 116, n. 3, p. 325-331, 2007.

WANG, G.; ZHAO, Y.; TIAN, F.; JIN, X.; CHEN, H.; LIU, X.; ZHANGA, Q.; ZHAOA, J.; CHENA, Y.; ZHANG, H.; CHEN, W. Screening of adhesive lactobacilli with antagonistic activity against *Campylobacter jejuni*. **Food Control**, v.44, n. 1, p. 49-57, 2014.

WELMAN, A.D.; MADDOX, I.S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria perspectives and challenges. **Trends Biotechnol.**, v. 21, n. 6, p. 269-274, 2003.

WHITEHEAD, H.R.; COX, G.A. The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic Streptococci: A preliminary note. **NZJ. Dairy Sci. Technol.**, v. 16, n. 1, p. 319-320, 1935.

WOGAN, G.N.; HECHT, S.S.; FELTON, J.S.; CONNEY, A.H.; LOEB, L.A. Environmental and chemical carcinogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 14, n. 6, p. 473-486, 2004.

XIÃO, Z.; LU, R.J. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. **Biotechnol. Adv.**, v. 32, n. 2, p. 492-503, 2014.

YE, L.; ZHAO, H.; LI, Z.; WU, J.C. Improved acid tolerance of *Lactobacillus pentosus* by error-prone whole genome amplification. **Bioresource Technol.**, v. 135, n. 1, p. 459-463, 2013.

YEE, A.L.; MAILLARD, M.; ROLAND, N.; CHUAT, V.; LECLERC, A.; POGAČIĆ, T.; VALENCE, F.; THIERRY, A. Great interspecies and intraspecies diversity of dairy propionibacteria in the production of cheese aroma compounds. **Int. J. F. Microbiol.**, v. 191, n. 1, p. 60-68, 2014.

ZAGO, M.; FORNASARI, M.E.; CARMINATI, D.; BURNS, P.; SUÀREZ, V.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; GIRAFFA, G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiol.**, v. 28, n. 5, p. 1033-1040, 2001.

ZÁRATE, G.; ÉREZ CHAIA, A. Feeding with dairy *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 reduces the incidence of Concanavalin-A induced alterations in mouse small intestinal epithelium. **Food Res. Int.**, v. 47, n. 1, p. 13-22, 2012.

ZHANG, H.; QIU, Y.; ZHAO, Y.; LIU, X.; LIU, M.; YU, A. Immunogenicity of oral vaccination with *Lactococcus lactis* derived vaccine candidate antigen (UreB) of *Helicobacter pylori* fused with the human interleukin 2 as adjuvant. **Mol. Cell. Probes**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 2014.

ZHANG, Q.; LIN, S.; NIE, X. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum*. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 496-500, 2013.

ZHENG, P.X.; FANG, H.Y.; YANG, H.B.; TIEN, N.Y.; WANG, M.C.; WU, J.J. *Lactobacillus pentosus* strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 14, p. 1-7, 2014.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.014>

2.2. CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO

Publicado no Periódico Food Control, v. 53, p. 96-103, 2015.

Caracterização e avaliação de bactérias lácticas isoladas a partir de leite caprino

RESUMO

Este estudo foi realizado com os objetivos de selecionar e caracterizar Bactérias do Ácido Láctico (BAL) autóctones do leite caprino com potencial probiótico e avaliar a segurança dessas culturas em queijo artesanal caprino. Os isolados de BAL foram submetidos à simulação de tolerância ao Trato Gastrointestinal (TGI), teste hemolítico, susceptibilidade antimicrobiana, atividade antibacteriana, produção de exopolissacarídeos (EPS), gás, atividade proteolítica, produção de diacetil e tolerância ao NaCl. Isolados com melhores resultados obtidos nos testes citados anteriormente foram discriminados por meio da Análise de Componente Principal (ACP). O gênero e a espécie dos isolados de BAL discriminados foram confirmados por meio de identificação molecular. Após esta seleção de BAL, três queijos caprino (1, 2 e controle) foram elaborados para avaliar a ação inibidora de BAL selecionadas contra *Escherichia coli*. Posteriormente, todas as amostras de queijo foram submetidas às análises físico-químicas e contagem bacteriana. A análise estatística foi realizada. UNIVASF CAP 14 e 20 foram diferenciadas pela sobrevivência ao pH 2 e pancreatina, resistência ao NaCl e a atividade antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*. UNIVASF CAP 4 e 29 foram caracterizadas pela resistência ao suco intestinal e atividade antibacteriana contra *Salmonella Typhi* e *Listeria monocytogenes*. UNIVASF CAP 27, 38, 43 e 139 apresentaram produção de diacetil, atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. UNIVASF CAP 35 e 138 foram caracterizados por atividade proteolítica, produção de EPS, atividade antibacteriana contra *E. coli* e *Shigella flexneri*. O coquetel destes dez isolados com potencial propriedade probiótica foi inoculado em queijo caprino artesanal e melhorou a segurança microbiológica do produto contra *E. coli*.

Palavras-chave: bactérias do ácido láctico, probiótico, queijo caprino, *Escherichia coli*, segurança alimentar.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterise and select Lactic Acid Bacteria (LAB) from goat milk with potential probiotic use and to evaluate the safety of these cultures in artisanal cheeses. The isolates of LAB were subjected to simulation of tolerance to the gastrointestinal tract, haemolytic test, antimicrobial susceptibility, antibacterial activity, EPS production, gas production, evaluation of proteolytic activity, diacetyl production and tolerance to NaCl. The genus and species of the selected LAB isolates were confirmed using molecular identification. Three goat cheeses (1, 2 and control) were manufactured to evaluate the inhibitory action of LAB against *Escherichia coli*. Subsequently, all cheese samples underwent bacterial enumeration and physical-chemical analyses. Statistical analysis was performed. UNIVASF CAP 14 and 20 were differentiated by survival up to pH 2 and pancreatin, resistance to NaCl and antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae*. UNIVASF CAP 4 and 29 were characterised by resistance to intestinal juice and antibacterial activity against *Salmonella* Typhi and *Listeria monocytogenes*. UNIVASF CAP 27, 38, 43 and 139 exhibited diacetyl production, antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. UNIVASF CAP 35 and 138 were characterised by proteolytic activity, EPS production, antibacterial activity to *E. coli* and *Shigella flexneri*. A cocktail of these 10 isolates with potential probiotic properties were inoculated in artisanal goat cheese and improved microbiological safety of product against *E. coli*.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotic, goat cheese, E. coli, physico-chemical

2.2.1. INTRODUÇÃO

Bactérias do Ácido Lático (BAL) são habitantes do Trato Gastrointestinal (TGI) humano e têm uma longa história de uso em alimentos e produtos fermentados (COLLADO et al., 2007). A variedade de micro-organismos, as BAL tipicamente isoladas de alimentos, foram avaliadas quanto ao seu potencial probiótico e vem sendo aplicadas como culturas adjuntas em vários tipos de produtos alimentares ou em preparações terapêuticas (RODGERS, 2008; ZAGO et al., 2011). Inúmeros benefícios à saúde atribuídos às BAL as tornam promissoras candidatas probióticas e estão sendo amplamente estudadas para explorar a sua segurança e outras propriedades desejáveis (IRANMANESH et al., 2014), e contribuir para agregar valor aos produtos. Novos produtos e matérias-primas adicionados de culturas probióticas são, certamente, uma área chave de pesquisa e desenvolvimento para o mercado de alimentos funcionais e microbiologicamente seguros (COMAN et al., 2012).

O Brasil tem o sétimo maior rebanho caprino do mundo. O rebanho está concentrado no Nordeste, na região semiárida, especialmente nos estados da Bahia e de Pernambuco (FAO, 2014; IBGE, 2011). A caprinocultura é fundamental para a região. A partir de uma perspectiva econômica, devido ao crescente interesse do consumidor por alimentos funcionais, o leite caprino tem um grande potencial, pois tem propriedades biológicas únicas, como alta digestibilidade, alcalinidade distinta, alta capacidade de tamponamento e valores terapêuticos em medicina (PARK, 2009; PARK; HAENLEIN, 2006). O segundo aspecto que afeta a demanda por leite caprino é o interesse crescente de consumidores, em muitos países, em obter derivados lácteos, especialmente queijos e iogurtes (HAENLEIN, 2004). Na região semiárida de Pernambuco, nacional e internacionalmente conhecida por elaborar vinhos finos, a produção de queijos pode complementar o turismo gastronômico, gerando renda para os pequenos produtores.

No entanto, para ter acesso ao mercado, novas alternativas para a segurança e o processamento do leite devem ser investigadas. O leite de cabra e seus derivados ainda estão associados à baixa qualidade microbiológica e tecnológica (SILVA et al., 2013). As BAL, em adição às suas propriedades probióticas, impedem o crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes por competição por nutrientes e produção de compostos inibidores, como ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (STILES; HOLZAPFEL, 1997), contribuindo, assim, para a qualidade do leite. Portanto, este estudo foi realizado com os objetivos de caracterizar e selecionar BAL de leite caprino para potencial uso probiótico e avaliar a segurança dessas culturas em queijo artesanal.

2.2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.2.1 Amostras de leite cru e análises microbiológicas

Amostras de leite de cabra *in natura* foram coletadas em propriedades de criação extensiva de cabras leiteiras Sem Raça Definida (SRD), em seis municípios (Juazeiro, Uauá, Senhor do Bonfim, Curaçá, Jaguarari e Petrolina) do Vale do São Francisco, Nordeste do Brasil. Sete fazendas foram aleatoriamente selecionadas a partir de cada município, totalizando 42 amostras de leite. A equipe de pesquisa treinada colheu assepticamente as amostras de leite (150 ml) a partir dos recipientes em que o produto foi armazenado após a ordenha diária, utilizando uma concha de aço inoxidável (higienizado-etanol) e adicionando-as em frascos de plástico estéreis. As amostras foram coletadas em triplicata, armazenadas a 4 °C e conduzidas para o laboratório para contagem de Bactérias do Ácido Lático (BAL), no mesmo dia.

Na análise microbiológica para BAL, alíquotas de 0,1 ml de leite de cabra e diluições (10^{-1} a 10^{-8}) foram transferidas para placas com um meio específico, de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Himedia). As placas foram incubadas, a 37 °C, durante 72-96 horas, em condições aeróbias, como descrito por Lima et al. (2009). Seis colônias por amostra foram escolhidas aleatoriamente a partir de placas de ágar MRS, atingindo um total de 252 colônias. A classificação básica dos isolados foi realizada por meio de reação de Gram, morfologia, motilidade, catalase (H_2O_2 , 3% v/v) e atividade citocromo-oxidase. A partir destes, cinquenta isolados foram selecionados para os testes descritos no estudo.

2.2.2.2. Simulação de tolerância ao trato gastrointestinal (TGI)

Para simular a sobrevivência ao TGI, os 50 isolados de BAL pré-selecionados foram testados em um modelo *in vitro* que simula quimicamente as condições fisiológicas. No teste de tolerância a baixo pH, o pH do caldo MRS foi ajustado para 2,0, com ácido clorídrico 1N. No teste de tolerância à bile, o caldo MRS foi suplementado com 2,0% de bile bovina (Sigma-Aldrich). Para o teste de tolerância ao fluido pancreático, foram utilizados $NaHCO_3$ 150 mM e 1,9 mg/mL de pancreatina (Sigma-Aldrich), e o pH foi ajustado para 8,0, conforme sugerido por Ronka et al. (2003). Para testar a tolerância ao suco intestinal, de acordo com Bao et al. (2010), 0,1 g de tripsina (Sigma, Aldrich) e 1,8 g de sais biliares foram adicionados a uma solução estéril de 1,1 g de bicarbonato de sódio e 0,2 g de cloreto de sódio em 100 mL de

água destilada. O pH da solução foi ajustado para 8,0, com hidróxido de sódio 0,5 M e esterilizado por filtração através de uma membrana de 0,45µm.

Os isolados para cada teste foram inicialmente cultivados, durante 24 horas, em caldo MRS, a 37°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos e lavadas três vezes em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,0. Tubos individuais contendo cada estirpe e meio de teste foram incubados, durante 3 horas, a 37 °C em banho-maria. A viabilidade foi avaliada em duplicata, em 0 e 3 horas, em ágar MRS (himedia). As taxas de sobrevivência foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = \frac{\log \text{CFU } N_1}{\log \text{CFU } N_0} \times 100$$

em que N_1 representa a contagem total de isolados viáveis no tempo de 3 horas e N_0 representa a contagem total de isolados viáveis no tempo 0 hora.

2.2.2.3. Caracterização dos fatores de virulência dos micro-organismos

A produção de DNase foi determinada por adição de aliquotas de 1 mL das amostras sobre a superfície de ágar teste DNase com azul de toluidina a 0,1% e as placas foram incubadas, a 37 °C, durante 48 horas. Resultado positivo para a presença de DNase foi indicado pela formação de halos rosados em volta das colônias.

Para o teste de coagulase, 0,3 mL de cada cultura dos isolados foram transferidos para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho (Plasma-coagu LaborClin®) e incubados, a 36 ± 1 °C, durante 6 horas. A formação de um coágulo ou a total coagulação foram consideradas como resultado positivo para o teste.

No teste de hemólise, as BAL foram cultivadas em caldo MRS, a 37 °C, durante 15 horas e, em seguida, transferiu-se para placas com ágar sangue (Himedia®) suplementadas com 5% de sangue desfibrinado de cavalo (Oxoid®). Depois de 48 a 72 horas, a reação hemolítica foi avaliada por meio da observação da hidrólise parcial das células vermelhas do sangue e a produção de uma zona verde (α -hemólise), bem como a hidrólise total de células vermelhas do sangue, produzindo uma zona clara em torno da colônia bacteriana (β -hemólise) ou nenhuma reação (γ -hemólise).

Para verificar a susceptibilidade antimicrobiana, utilizaram-se os antimicrobianos cloranfenicol (30 µg), oxacilina (1 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e penicilina G (UI), segundo as recomendações do *Clinical and*

Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). BAL foram cultivadas em ágar MRS durante 24 horas a 37°C. Os isolados foram inoculados em 4 mL de água destilada estéril para obter o n° de 0,5 McFarland padrão de turvação (Probac, Brasil). Um suabe estéril foi utilizado para espalhar o inóculo pela superfície do ágar Muller Hinton (Merck®) e, em seguida, discos de antimicrobianos foram aplicados à placa. A susceptibilidade antimicrobiana foi avaliada por meio da mensuração dos halos de inibição de crescimento bacteriano, após incubação, durante 24 horas, a 37 °C. *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada no teste para controle positivo.

2.2.2.4. Agar difusão em disco - Atividade antibacteriana

O efeito inibidor de diferentes isolados de BAL frente a agentes patogênicos foi testado utilizando-se o método de difusão em ágar disco. Os patógenos testados foram *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella* Typhi (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC n° 25923), *Shigella flexineri* (ATCC n° 12022), *Enterococcus faecalis* (ATCC n° 19433), *Bacillus cereus* (ATCC n° 11778) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC n° 13883), que foram cultivadas em ágar Triptona de Soja (TSA, Himedia) suplementada com 0,6% de extrato de levedura, durante 24 horas, a 37 °C. Cada patógeno foi suspenso em 4 mL de água estéril e padronizado por comparação de turvação ao padrão n° 0,5 da escala de McFarland (Probac, Brasil). Um suabe estéril foi embebido na suspensão e aplicado sobre a superfície de uma placa com ágar TSA. Em seguida, discos de papel filtro estéril (Whatmann n°1) de 6 mm foram umedecidos com 20 µL do sobrenadante isento de células (obtido por centrifugação 2.500 x g/10 min) de cada isolado de BAL em fase de crescimento exponencial. A susceptibilidade de organismos patogênicos foi avaliada por meio da mensuração da zona de inibição do crescimento bacteriano em torno dos discos (raio - mm) após a incubação, durante 24 horas, a 37 °C. Uma zona clara de inibição de pelo menos 2 mm de raio foi registrada como positiva. O experimento foi realizado em triplicata.

2.2.2.5. Produção de EPS por BAL

A produção de Exopolissacarídeos (EPS) dos isolados de BAL foi testada de acordo com o método descrito por Van Geel-Schutte et al. (1998). Culturas de BAL foram cultivadas em frascos contendo 200 mL de caldo MRS suplementado com 2% de glicose na temperatura de 37 °C, durante três dias. As células bacterianas foram removidas por centrifugação a 6.000 g por 20 minutos, e dois volumes de etanol frio 95% (Merck) foram adicionados a um volume

do sobrenadante da cultura para precipitação do EPS. Os precipitados foram separados por filtração a vácuo e secos a 60 °C. Seus pesos foram mensurados para determinar a quantidade de EPS produzido.

2.2.2.6. A produção de gás

Para verificar a produção de gás a partir da glicose foi utilizado caldo MRS com 5% de glicose e adição de tubos Durham, de acordo com o método de Cai et al. (1999).

2.2.2.7. Avaliação da atividade proteolítica

Na avaliação da atividade proteolítica, os isolados de BAL foram semeados em ágar leite. O ágar leite foi preparado com ágar padrão para contagem (APC, Himedia) com adição de 1% de leite desnatado em pó (BEERENS; LUQUET, 1990). As placas foram incubadas, a 7 °C durante 10 dias e 37 °C por 48 horas. As colônias formadoras de halos transparentes foram consideradas positivas para a atividade proteolítica.

2.2.2.8. Produção de diacetil

Após crescimento, as amostras de BAL foram centrifugadas, a 4.000 rpm, durante 15 minutos. O sedimento foi ressuspensão em água peptonada e inoculado (1% (p/v)) em 10 mL de leite UHT integral e incubadas, a 30 °C, durante 24 horas. Em seguida, em 1 mL de cultura foi adicionado a 0,5 mL de solução de α -naftol (1% (p/v)) e KOH (16% (p/v)) e incubou-se, a 37 °C, durante 10 minutos. A produção de diacetil foi indicada por um anel vermelho formado nos tubos (King, 1948) e, de acordo com a intensidade da cor do anel, os resultados foram classificados como fraco, médio e forte. Os testes foram realizados em duplicata.

2.2.2.9. Tolerância ao NaCl

Os isolados foram testados quanto à tolerância a concentrações de NaCl entre 4% e 6,5%, de acordo com o método do Yavuzdurmaz (2007). Os meios contendo indicador púrpura de bromocresol foram preparados de acordo com as concentrações apropriadas e transferidos para tubos de 5 mL. Os tubos foram inoculados com 1% da cultura com crescimento de 24 horas e, em seguida, incubados, a 37 °C, durante 7 dias. A mudança de cor de púrpura para amarelo era evidência de crescimento celular.

2.2.2.10. A identificação dos isolados de BAL

O gênero e as espécies foram confirmados por meio de identificação molecular. O DNA bacteriano a partir de cada isolado foi extraído por intermédio de um DNA PureLink Genomic Mini Kit (Invitrogen). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50 μL contendo 25 μL de TopTaq Master Mix (Qiagen), 1 μL de cada *primer* (27 f/ 1512r), 2 μL do DNA e 21 μL de água livre de RNase. Os produtos da PCR foram purificados com o kit de purificação de PCR PureLink (Invitrogen). Os produtos da PCR purificados foram sequenciados por MacroGen Inc. (Seoul, Coreia do Sul), utilizando um ABI3730 XL sequenciador de DNA automático. As sequências foram então comparadas com as do banco de dados GenBank, utilizando o algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information, Maryland, EUA).

2.2.2.11. Inibição de *Escherichia coli* em queijo de cabra artesanal

Os queijos caprinos foram elaborados para avaliar a ação inibitória das BAL contra *Escherichia coli* (ATCC 8739). Os queijos foram elaborados em conformidade com o procedimento tradicional utilizado por pequenos produtores na região do semiárido de Pernambuco. Três queijos de cabra (1, 2) e o controle foram preparados no laboratório, em condições assépticas. A diferença na preparação entre os três queijos foi a adição ou a ausência do inóculo. A acidez e o ponto de congelamento do leite de cabra utilizado foram determinados, primeiramente, de acordo com o método descrito por Brasil (2006). O leite foi, então, pasteurizado a $65\pm 1^\circ\text{C}$, durante 30 minutos, seguido por arrefecimento a 30°C . No primeiro queijo (queijo 1), um inóculo contendo bactérias patogênicas de *E. coli* foi suspenso em 33,8 ml (volume de leite a 1%) de água destilada estéril, com uma população de 10^8 UFC/ml, adicionado como um controle positivo. No segundo tipo de queijo (queijo 2), 33,8 mL de água destilada estéril contendo 10^8 UFC/mL de *E. coli* e 10^2 UFC/mL de uma mistura de BAL selecionadas foram adicionados. No terceiro queijo, não houve inoculação microbiana, o queijo foi o controle negativo. Na sequência, aos três queijos foram adicionados 0,5 mL/L de solução de cloreto de cálcio 50% e 0,9 mL/L coagulante comercial (Ha- La®, Christian Hansen Ind. & Com. Ltd., Valinhos, SP, Brasil). Após 30 minutos de repouso, a coalhada foi suavemente cortada em cubos, dessorada e salgada (0,9 g/L de NaCl). A massa de queijo foi distribuída em formas perfuradas para queijo de 250 g e pressionada por 2 horas à temperatura ambiente. Após a retirada da forma, os produtos foram pesados para o cálculo

de rendimento (kg de queijo/L de leite), embalados em sacos plásticos estéreis (Cryovac, Brasil) e armazenados, a 4 °C, com 90% de umidade relativa, durante um total de 20 dias. Testes para enumeração bacteriana, pH e lactose foram realizados nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 após a preparação dos queijos.

2.2.2.11.1. Enumeração bacteriana

Vinte e cinco gramas de queijo foram removidos assepticamente da parte central de cada um e, em seguida, homogeneizados no *Stomacher*® (Mayo homogenius HG 400) com 225 mL de água peptonada a 1% (Himedia) (IDF, 1995). As diluições em série foram realizadas. A enumeração das BAL foi conduzida utilizando-se o meio de cultura MRS e as placas foram incubadas, a 37 °C, durante 24 horas. Caldo LMX fluorocult foi utilizado para contagem de *E. coli*. Após incubação a 37 °C, durante 24 a 48 horas, sob luz ultravioleta (366 nm de comprimento de onda), tubos azuis, que apresentaram fluorescência, foram considerados positivos, e confirmados com o teste do indol. Os tubos positivos foram semeados em ágar eosina azul de metileno (EMB, Merck). As colônias típicas de cada meio foram enumeradas.

2.2.2.11.2. Análises físico-químicas

O valor do pH foi determinado por homogeneização de 10 g de queijo em 10 mL de água destilada, usando um medidor de pH (PHS-3B, Labmeter Modelo pH equipado com um eletrodo T818-A, Xangai, China). A lactose foi mensurada de acordo com o método de Lane-Eynon (Brasil, 2006).

2.2.2.12. A análise estatística

Para a seleção da BAL como inóculo de queijo caprino, todos os testes realizados neste estudo foram analisados por meio de análise de componentes principais (ACP) usando o software XLSTAT 7.5.2 (Addinsoft, New York, NY, EUA).

Um delineamento experimental inteiramente casualizado foi utilizado para verificar a inibição de *E. coli* em queijo caprino e os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3 x 5: 3 queijos (queijo contendo inóculo de *E. coli*, queijo com inóculo de *E. coli* e inóculo de BAL e sem inóculo) e 5 pontos de tempo (0, 5, 10, 15 e 20 dias). Os dados foram analisados

por meio de análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott. Os dados quantitativos foram analisados por meio de regressão. A análise estatística foi realizada utilizando-se software SISVAR® (Lavras, Brasil), versão 4.5.

2.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.3.1. Análises microbiológicas

A média das BAL no leite caprino *in natura* analisado na região semiárida do Vale do São Francisco, Nordeste do Brasil, foi de 3,93 log UFC/ mL. Na classificação por coloração diferencial pelo método de Gram, os isolados foram identificados como culturas de bactérias Gram-positivas, apresentando-se nas formas de bastonetes e cocos. Os isolados foram, então, classificados como catalase, motilidade e oxidase negativa. A morfologia das colônias foi caracterizada por sua forma circular, borda arredondada, diâmetro ≤ 2 mm, elevação convexa, superfície lisa, consistência mucoide, densidade opaca e cor branca. Cinquenta isolados foram selecionados para os testes posteriores. BAL são predominantes no leite de cabra *in natura* e, quando selecionadas, contribuem para um aumento do valor funcional do alimento (SILVA et al., 2013).

2.2.3.2. Aspectos de segurança, tecnológicos e características probióticas dos isolados UNIVASF CAP

Os resultados obtidos pela exposição dos isolados de BAL ao pH 2,0, fluido pancreático, bile a 2% e fluido intestinal são observados na Tabela 1. Trinta e seis isolados demonstraram elevada taxa de sobrevivência ao pH 2. Oito isolados apresentaram taxas de sobrevivência de 80% a 89%, e seis isolados apresentaram taxas de sobrevivência de 70% a 79%. Taxas de sobrevivência superiores a 90% ao pH 2 é considerada como boa resistência à baixa acidez. Para que as estirpes de BAL tenham um efeito benéfico sobre a saúde do intestino as mesmas devem sobreviver às baixas condições ácidas (Liu et al., 2013). No estudo de Solieri et al. (2014), o limite crítico para a sobrevivência sob exposição às condições ácidas foi o pH 2,0. Este valor de pH foi completamente eficaz para inativar quase todas as estirpes.

Em resposta ao fluido pancreático (Tabela 1), a taxa de sobrevivência foi superior a 91% para os 49 isolados testados. Quando expostos à bile, todos os isolados apresentaram

taxas de sobrevivência superiores a 95%. No fluido intestinal, a taxa de sobrevivência foi superior a 92% para 48 isolados e 2 isolados obtiveram taxas mais baixas. Bao et al. (2010) e Monteagudo-Mera et al. (2012) relataram que o fluido pancreático não teve nenhum efeito significativo sobre a viabilidade das estirpes após a simulação *in vitro*. Isolados que apresentam elevada taxa de sobrevivência na simulação *in vitro* ao TGI são potenciais candidatos para atravessar com sucesso a barreira fisiológica do TGI de humanos (DIAS et al., 2013).

Tabela 1. Número de isolados de BAL (total de 50) tolerantes ao pH 2, fluido pancreático, bile (2%) e suco intestinal.

Taxa de Sobrevivência (%)	Número de isolados sobreviventes			
	pH 2	Bile 2%	Suco Pancreático	Suco intestinal
100 ≥ % ≥ 90	36	50	49	48
89 ≥ % ≥ 80	8	0	1	1
79 ≥ % ≥ 70	6	0	-	1

Na caracterização dos fatores de virulência dos micro-organismos, todos os isolados testados foram negativos para os testes de coagulase e DNase e demonstraram atividade γ -hemolítica, quando cultivados em ágar sangue. A determinação do potencial de virulência dos micro-organismos é necessária para garantir a segurança, até mesmo para grupo de bactérias que é geralmente reconhecida como segura (GRAS) (FAO / WHO, 2002).

O padrão de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados foi elevado (Tabela 2). Para os seis antimicrobianos testados, 27 isolados foram sensíveis aos seis antimicrobianos (54%), nove, sete e seis isolados foram susceptíveis a cinco, quatro e três antimicrobianos, respectivamente. O isolado UNIVASF CAP 6 foi resistente a todos os antimicrobianos testados. Baixa sensibilidade foi apresentada pelos isolados para oxacilina, em que 15 isolados foram resistentes. Danielsen e Wind (2003) reportaram também BAL resistentes à oxacilina. Quarenta e oito amostras foram sensíveis ao cloraneficol. De acordo com Klare et al. (2007), BAL, geralmente, são suscetíveis a este antimicrobiano. A investigação do padrão de resistência dos isolados de BAL candidatos a probióticos é essencial, uma vez que bactérias podem servir como hospedeiras de genes de resistência a antimicrobianos, e estes serem transferidos para bactérias patogênicas (Danielsen; Wind, 2003).

Tabela 2. Susceptibilidade dos isolados de BAL aos antimicrobianos e número de antimicrobianos testados.

Susceptibilidade a antimicrobianos	Número de isolados sensíveis ($n = 50$)
Antimicrobianos	
Cloranfenicol	48
Oxacilina	35
Vancomicina	42
Tetraciclina	42
Ciprofloxacina	36
Penicilina G	45
Número de antimicrobianos testados	
6	27
5	9
4	7
3	6
2	-
1	0
0	1

Cinquenta isolados foram testados frente a oito diferentes micro-organismos patogênicos (Tabela 3). Como resultado da atividade antibacteriana, os halos ao redor do disco foram mensurados (mm). Os isolados testados apresentaram diferentes níveis de ação inibitória contra os patógenos e demonstraram ter uma característica intrínseca específica. Maior número de isolados de BAL inibiu *Listeria monocytogenes*. O isolado UNIVASF CAP 123 apresentou maior atividade antibacteriana contra o patógeno *E. coli* com uma zona de inibição de 5,5 mm de raio. Segundo Ahmadova et al. (2013), uma zona clara de inibição de pelo menos 2 mm de diâmetro é considerada positiva para a atividade antagonista. E, ainda, de acordo com Aymerich et al. (2000), bactérias Gram-positivas são mais sensíveis ao espectro de ação dos lactobacilos. No entanto, a inibição de bactérias Gram-negativas por BAL foi confirmada por Aslim et al. (2005), Schirru et al. (2012) e Iranmanesh et al. (2014). Neste estudo, seis isolados de BAL, UNIVASF CAP 7, 12, 35, 36, 43 e 53 inibiram o crescimento de quatro patógenos.

Tabela 3. Atividade antibacteriana dos isolados de BAL contra oito patógenos e número de patógenos inibidos por isolado.

Atividade antibacteriana	Número de isolados ($n = 50$)
Patógenos	
<i>Escherichia coli</i>	15
<i>Salmonella Typhi</i>	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Shigella flexineri</i>	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	6
<i>Bacillus cereus</i>	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
Inibição a número de patógenos	
4	6
3	6
2	12
1	13
0	13

A produção de EPS dos isolados de BAL variou de 10 mg/L a 100 mg/L (Tabela 4). A produção média foi de 27,60 mg/L. Vinte e um isolados produziram acima do valor médio. O isolado UNIVASF CAP 29 apresentou maior produção de EPS. A quantidade de EPS produzido por BAL é fortemente influenciada pela fermentação da cultura e condições relacionadas a pH, temperatura e composição do meio (DUEÑAS-CHASCO et al., 1998). Os EPS sintetizados naturalmente por alguns micro-organismos podem agir como agentes texturizantes em alimentos fermentados, sendo uma característica tecnológica desejável (BADEL et al., 2011) e também benéfico à saúde do hospedeiro, como o efeito imunomodulador exercido em células epiteliais intestinais (PATTEN et al., 2014).

Dos isolados avaliados, seis apresentaram produção de gás a partir da glicose (Tabela 4). Apenas UNIVASF CAP 24, 28, 41, 54, 122 e 124 apresentaram a capacidade de produzir CO₂. Tecnologicamente, de acordo com Franciosi et al. (2009), estirpes com produção de CO₂ não devem ser utilizadas em certos tipos de queijo, devido à possibilidade de formação de olhaduras. A produção de diacetil por BAL a partir do leite de cabra cru foi semelhante nesse estudo, todos os isolados foram caracterizados por produção fraca. O diacetil (2,3-

butanodiona) é um produto volátil do metabolismo do citrato produzido por certas BAL. Este composto contribui diretamente para a formação do sabor, sendo uma característica de grande importância industrial (RINCON-DELGADILLO et al., 2012).

Nos testes para a atividade proteolítica, 19 estirpes foram caracterizadas como positivas (Tabela 4). Variabilidade intra e interespecífica para proteólise é comumente relatada para as estirpes provenientes de fontes naturais (FRANCIOSI et al., 2009). Embora BAL não sejam consideradas como bactérias fortemente proteolíticas, o seu sistema proteolítico é essencial para o crescimento ótimo no leite e contribui significativamente para o desenvolvimento do *flavour* em produtos de leite fermentado (LOPEZ-KLEINE; MONNET, 2011). A proteólise também poderia contribuir para a prevenção de alergias frequentes em crianças menores de três anos de idade, devido à má digestão das proteínas do leite (PESCUMA et al., 2009).

Tabela 4. Produção de exopolissacarídeos (EPS), gás, diacetil, atividade proteolítica e tolerância ao NaCl dos 50 isolados de BAL.

Características	Número de isolados (<i>n</i> = 50)
Produção de EPS (mg/L)	
10.00-19.00	10
20.00-29.00	19
30.00-49.00	6
50.00-59.00	11
60.00-69.00	1
70.00-79.00	1
80.00-89.00	-
90.00-100.00	1
Produção de gás	6
Atividade proteolítica	19
Produção de diacetil (fraca)	50
Tolerância ao NaCl	50

Todos os isolados utilizados neste estudo foram tolerantes à concentração de NaCl (Tabela 4). Para a aplicação industrial de BAL como fermento em queijo, esses micro-organismos devem ser capazes de tolerar e permanecer viáveis às condições estressantes, como acidez, temperatura, salinidade e liofilização. Para tolerar concentrações de NaCl estes micro-organismos desenvolvem alguns mecanismos, como, por exemplo, a absorção ou a síntese de um número limitado de solutos (BREMER; KRAMER, 2000).

Para separar os isolados de BAL neste estudo de acordo com suas propriedades gerais, a Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada com base nas características probióticas. Os primeiros sete componentes responderam por 71,44% da variância total. Entre eles, PC1 e PC2 responderam por 16,26% e 12,70% da variância total, respectivamente. As características estudadas foram marcadamente separadas nos planos do gráfico (Figura 1). No quadrante esquerdo inferior, os isolados UNIVASF CAP 14, 20 e 43 foram diferenciados pela sobrevivência ao pH 2 e pancreatina, resistência ao NaCl e a atividade antibacteriana sobre *Klebsiella*. No quadrante esquerdo superior, UNIVASF CAP 4 e 29 foram diferenciados por resistência ao suco intestinal e atividade antibacteriana contra *Salmonella* e *Listeria*. No quadrante direito inferior, UNIVASF CAP 27, 38, e 139 foram caracterizados pela produção de diacetil e atividade antibacteriana para *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*; e no quadrante direito superior, UNIVASF CAP 35 e 138 foram caracterizados por atividade proteolítica, produção de EPS, atividade antibacteriana para *E. coli* e *Shigella*. Estes resultados sugerem que um coquetel desses 10 isolados podem ter características probióticas relevantes e conduzir a um aumento da segurança microbiológica no queijo caprino artesanal.

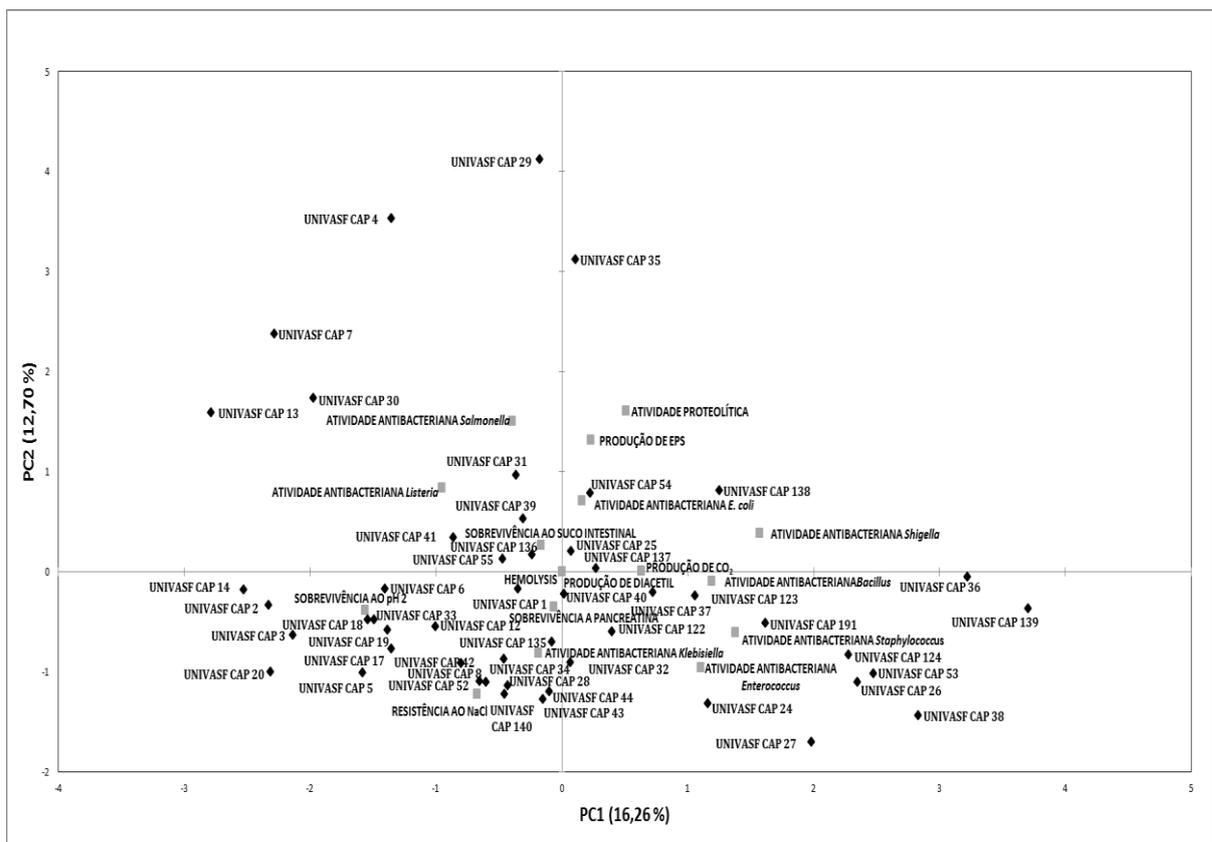


Figura 1. Análise de Componente Principal (ACP), com base nos dados de características probióticas de 50 isolados de BAL. Os sete primeiros componentes explicaram 62,50% da variância total; entre eles, PC1 e PC2 explicou 16,26% e 12,70% da variância total, respectivamente.

Os dez isolados discriminados na ACP foram identificados por análise comparativa das sequências de genes RNAr 16S e identificados com uma similaridade de 98% a 99% para *Lactobacillus plantarum* (UNIVASF CAP 4, 14, 20, 35, 38 e 139 - número de acesso no Genbank: NR_075041.1), *Lactobacillus casei* (UNIVASF CAP 27 e 43 - número de acesso no Genbank: NR_075032.1) e *Enterococcus faecium* (UNIVASF CAP 29 e 138 - número de acesso no Genbank: NR_115764.1). O potencial efeito probiótico e a atividade antimicrobiana de isolados de *L. plantarum*, *L. casei* (MINERVINI et al., 2009) e *Enterococcus faecium* (AHMADOVA et al., 2013) já foram descritos.

2.2.3.3. Queijo caprino: inibição de agente patogénico, pH e lactose

O queijo caprino foi elaborado a partir do leite com acidez de 18° D e um índice crioscópico de -0,587 °H. O leite foi pasteurizado e *E. coli* não foi detectada nas amostras de controle negativo. O rendimento do queijo foi 13,27%, 13,28% e 13,30%, para o controle negativo, o controle positivo (queijo 1) e queijo inoculado com o coquetel de BAL (queijo 2), respectivamente. Resultados semelhantes foram relatados por Hayaloglu et al. (2013) que encontraram valores de rendimento de queijo que variaram entre 13,87% a 18,89%. Segundo os autores, as raças caprinas, ao contrário das culturas iniciadoras, têm maior influência sobre o rendimento de queijos.

Nas amostras de controle positivo (queijo 1), BAL naturalmente presentes foram detectadas a 7 log UFC/g (Tabela 5). No queijo 2, houve a inoculação de *E. coli* e isolados de BAL. Isolados de BAL foram distinguidos pela ACP e UNIVASF CAP 4, 14, 20, 27, 29, 35, 38, 43, 138 e 139 foram selecionados (*L. plantarum*, *L. casei* e *Enterococcus faecium*). A população total BAL no queijo 2 no dia 0 foi de 9 log UFC/g (10^7 UFC/g para a população indígena de BAL no queijo + 10^2 UFC/g da adição do coquetel de isolados de BAL).

Foi encontrada correlação significativa ($P < 0,05$) entre queijo e tempo de análise para a enumeração de *E. coli* (Tabela 5). As populações de patógenos foram menores em queijo inoculado com o coquetel dos isolados de BAL (queijo 2) e diminuiu linearmente 0,24 unidades log por dia. Para o controle positivo houve uma diminuição linear menor ao longo do tempo, de 0,0796 unidades log por dia. Caridi et al. (2003) afirmam que a redução de coliformes totais e *E. coli* observada durante o tempo de armazenamento de queijos deve-se à ação de BAL selecionadas, altamente competitivas, que prevalecem no produto ao longo do tempo. No estudo realizado, observou-se que a adição de BAL acelerou o declínio de *E. coli*. Os isolados de BAL foram eficazes na inibição da *E. coli* em testes *in vitro* e em queijo

caprino. Delbès-Paus et al. (2013) relataram uma interação sinérgica entre *Hafnia alvei* B16 e um consórcio microbiano, resultando em uma redução de 0,7 log na contagem de *E. coli* O26:H11, após 8 dias de maturação de queijo.

Durante o período de armazenamento, as contagens de BAL foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) nos queijos com e sem isolados de BAL. A população de BAL aumentou linearmente, até o período final, 0,0132 e 0,046 unidades log por dia no queijo 1 e 2, respectivamente (Tabela 5). A observação da manutenção da cultura viável até ao final do período de armazenamento foi importante porque este é um dos critérios de seleção para as estirpes candidatas ao potencial uso probiótico (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Para exercer as suas propriedades funcionais, probióticos precisam chegar ao local de ação desejado na forma ativa e viável. Resultados semelhantes foram encontrados em queijo de minas frescal, por Buriti et al. (2005), onde as contagens viáveis de *Lactobacillus paracasei*, uma estirpe probiótica, aumentaram durante 21 dias de armazenamento.

Nas amostras de queijo 1 e queijo 2 foram encontradas interações significativas ($P < 0,05$) entre pH e o tempo de avaliação (Tabela 5). Os valores de pH do queijo com e sem BAL diminuiu linearmente ao longo do tempo, 0,0362 e 0,042 unidades pH por dia, respectivamente. No dia 5, foi encontrada uma diferença de pH entre as amostras do queijo 1 e do queijo 2. Os valores de pH do queijo 2 começaram a diminuir somente após o 15º dia. Durante este tempo, a população de *E. coli* diminuiu 5,380 para 3,380 log UFC/g e houve aumento na população de BAL. Em geral, o pH do derivado do leite caprino é mais elevado que quando elaborado a partir de leite de vaca. Segundo Galina et al. (2007), o leite de cabra apresenta capacidade de alcalinidade e tamponamento mais pronunciados que o leite de vaca, que é relacionado, principalmente, com os sistemas de associação de caseína e fosfato.

Houve correlação significativa ($P < 0,05$) para o conteúdo lactose entre os queijos e o tempo de avaliação (Tabela 5). O teor de lactose diminuiu linearmente, ao longo do tempo, em 0,0309 e 0,033 unidades por dia, nos queijos 1 e 2, respectivamente. No queijo 2, o teor de lactose foi maior até o dia 15, quando a redução do pH ocorreu e a população de *E. coli* caiu para 3,380 log UFC/g, em comparação com o queijo 1. Os valores do teor de lactose em queijo mostram variação. Sant'Ana et al. (2013) determinaram um teor de lactose 1,26% em queijos minas frescal feitos com leite de cabra no Brasil. Franco et al. (2003) relataram a presença de lactose residual ($1,6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) no final da maturação de 60 dias. No entanto, Niro et al. (2014) constataram a ausência de lactose em todas as amostras, após 30 dias de maturação. A presença de lactose, mesmo no final do período de cura, depende do grau de

remoção de soro de leite, da atividade glicolítica dos micro-organismos presentes e do efeito das condições ambientais na sua atividade (FRANCO et al., 2003).

Tabela 5: Contagem de *E. coli* e BAL, valores de pH e lactose em queijo sem (queijo 1) e com (queijo 2) coquetel de BAL UNIVASF CAP durante 20 dias de armazenamento a 4 °C.

<i>E. coli</i> log UFC/g ¹							
Queijos	Tempo (dias)					Média	Equação
	0	5	10	15	20		
Queijo 1	8.041 ^a	7.041 ^b	6.568 ^b	6.380 ^b	6.380 ^b	6.882 ^b	$y = -0.0796x + 7.679$ $R^2 = 0.8050$
Queijo 2	8.041 ^a	6.041 ^a	5.380 ^a	3.380 ^a	3.380 ^a	5.244 ^a	$y = -0.24x + 7.641$ $R^2 = 0.9309$
Média	8.041	6.541	5.974	4.880	4.880	6.063	***
BAL log UFC/g ²							
Queijos	Tempo (dias)					Média	Equação
	0	5	10	15	20		
Queijo 1	7.293 ^a	7.14 ^a	7.425 ^a	7.368 ^a	7.509 ^a	7.347 ^a	$y = 0.0132x + 7.215$ $R^2 = 0.5544$
Queijo 2	9.415 ^b	9.434 ^b	9.92 ^b	10.136 ^b	10.212 ^b	9.823 ^b	$y = 0.046x + 9.365$ $R^2 = 0.9145$
Média	8.354	8.287	8.672	8.752	8.86	8.585	***
pH ³							
Queijos	Tempo (dias)					Média	Equação
	0	5	10	15	20		
Queijo 1	6.563 ^a	6.42 ^a	6.13 ^a	6.056 ^b	5.84 ^b	6.20	$y = -0.0362x + 6.564$ $R^2 = 0.9767$
Queijo 2	6.573 ^a	6.48 ^b	6.186 ^b	5.90 ^a	5.80 ^a	6.18	$y = -0.042533x + 6.613$ $R^2 = 0.9680$
Média	6.568	6.45	6.158	5.978	5.82	6.195	***
Lactose ⁴							
Queijos	Tempo (dias)					Média	Equação
	0	5	10	15	20		
Queijo 1	1.566 ^a	1.156 ^a	1.049 ^a	0.956 ^b	0.894 ^b	1.124	$y = -0.0309x + 1.433$ $R^2 = 0.8420$
Queijo 2	1.566 ^a	1.182 ^b	1.092 ^b	0.906 ^a	0.861 ^a	1.122	$y = -0.033x + 1.459$ $R^2 = 0.8988$
Média	1.566	1.169	1.070	0.931	0.877	1.123	***

Para cada coluna, os valores médios com letras diferentes são significativos (P <0,005) de acordo com o teste de Scott-Knott. *** P <0,005. ¹Erro Padrão (EP) = 0,029. ²EP= 0,0975. ³EP = 0,012. ⁴EP = 0,006

Em conclusão, este estudo revela que as BAL isoladas do leite caprino apresentaram elevado potencial para aplicação probiótica, com boa produção de EPS, sobrevivência a um baixo pH e inibição *in vitro* de patógenos O coquetel de isolados UNIVASF CAP

selecionados melhorou a segurança microbiológica de queijo caprino artesanal contra *E. coli*, o principal micro-organismo detectado em leite caprino na região semiárida de Pernambuco. Outros estudos estão em andamento, no grupo de pesquisa, para avaliar a capacidade dos isolados para inibir outros patógenos em derivados do leite caprino e os efeitos benéficos sobre a saúde com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento da caprinocultura nesta região do Brasil.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do estudo realizado, o isolamento e seleção de BAL autóctones de leite caprino com alto potencial probiótico nos testes *in vitro* de segurança, funcional e tecnológico, apresentaram resultados promissores na atividade antibacteriana, frente *E. coli*, em queijo caprino artesanal associado a uma fermentação homogênea, isento de conservantes, vida útil prolongada e com propriedades probióticas.

Novos estudos estão sendo desenvolvidos para avaliar outras características probióticas desses isolados de BAL autóctones de leite caprino, no intuito de se utilizar essas bactérias em novos produtos, como, por exemplo, iogurte, e avaliar a presença de genes relacionados à produção de bacteriocinas, de resistência aos estresses causados pelo ácido e bile, capacidade de antagonismo a bactérias patogênicas, e outras características que possam identificar de forma precisa os mecanismos realizados por esse grupo de bactérias.

Resultados são promissores quando se destaca o emprego da biotecnologia para a elaboração de produtos funcionais, sendo uma nova vertente do processamento de lácteos e pode vir a contribuir com pequenos produtores, pois eles terão acesso a tecnologias alternativas para agregar valor e qualidade ao seu produto lácteo.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADOVA, A.; TODOROV, S.D.; CHOISET, Y.; TODOROV, S.D.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; ZADI, T.M.; KULIVEY, A.; DE MELO FRANCO, B.D.G.; CHOBERT, J.M. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 631-641, 2013.

ASLIM, B.; YUKSEKDAG, Z.N.; SARIKAYA, E.; BEYATLI, Y. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. **Food Sci. Techno**, v. 38, n. 6, p. 691-694, 2005.

AYMERICH, M.; GARRIGA, M.; MONFORT, J.; NES, I.; HUGAS, M. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. **Food Microbiol.**, v. 17, n. 1, p.33-45, 2000.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. **Biotech. Adv.**, v. 29, n. 1, p. 54-66, 2011.

BAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; YONG, L.; SHUIQUAN, W.; XIMEI, D.; YANYAN, W.; ZHANG, H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 695-701, 2010.

BEERENS, H.; LUQUET, F. M. **Guía practico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Acríbia Zaragoza, v. 1, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa métodos analíticos oficiais físico-químicos para o controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, p. 08, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 24 de Novembro de 2007. Aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, p. 4, 2007.

BREMER, E.; KRAMER, R. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: STORZ, G. HENGGE-AREONIS, R. **Bacterial stress response**. Washington D.C: ASM Press, 2000, p. 79-97.

BURITI, F.C.A.; DA ROCHA, J.S.; ASSIS, E.G.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of

Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT e Food Sci. Technol.*, v. 38, n. 2, p. 173-180, 2005.

CAI, Y.; PUANGPEN, S.; SAMAN, P.; BENNO, Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J. Applied Microbiol.*, v. 45, n. 4, p. 177-184, 1999.

CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. *Food Microbiol.*, v. 20, n. 2, p. 201-209, 2003.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty two informational supplement**. CLSI document M100-S22. Wayne, Pa.: CLSI, v. 25, p.24-24, 2012.

COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.S.; SALMINEN, S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different methods. *J. Microbiol. Methods*, v. 71, n. 1, p. 71-74, 2007.

DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus spp.* to antimicrobial agents. *J. Food Microbiol.*, v. 82, n. 1, p.1-11, 2003.

DELBÉS-PAUS, C.; MISZCZYCHA, S.; GANET, S.; HELINCK, S.; VEISSEIRE, P.; POCHET, S.; THÉVENOT, D.; MONTEL, M.C. Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 160, n. 3, p. 212-218, 2013.

DIAS, F.S.; DUARTE, W.F.; SANTOS, M.R.R.M.; RAMOS, E.M.; SCHWAN, R.F. Screening of *Lactobacillus* isolated from pork sausages for potential probiotic use and evaluation of the microbiological safety of fermented products. *J. Food Protect.*, v. 76, n. 6, p. 991-998, 2013.

DUEÑAS-CHASCO, M.T.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M.A.; TEJERO-MATEO, P.; ESPARTERO, J.L.; IRASTORZA-IRIBAS, A.; GIL-SERRANO, A.M. Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus spp.* G-77. *Carbohydr. Res.*, v. 307, n. 1-2, p. 125-133, 1998.

FAO / WHO. **Orientações para a avaliação de probióticos na alimentação**. London, 2002. 11 p.

FAO. 2010. **Country Pasture/Forage Resource Profiles – Brazil**. London, 2010. 35 p.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **Int. Dairy J.**, v. 19, n. 1, p. 3-11, 2009.

FRANCO, I.; PRIETO, B.; BERNARDO, A.; PRIETO, J.G.; CARBALLO, J. Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana). **Dairy**, v. 13, n. 2-3, p. 221-230, 2003.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; MÜLLER, C.M.O.; LAURINDO, J.B.; PRUDÊNCIO, E.S. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas frescal cheese. **J. Food Eng.**, v. 96, n. 4, p. 621-627, 2010.

GALINA, M. A.; OSNAYA, F.; CUCHILLO, H.M.; HAENLEIN, G.F.W. Cheese quality from milk of grazing or indoor fed Zebu cows and Alpine crossbred goats. **Small Ruminant Res.**, v. 71, n. 1-3, p. 264-272, 2007.

HAENLEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Res.**, v. 51, n. 2, p.155-163, 2004.

HAYALOGLU, A.A.; TOLU, C.; YASAR, K. Influence of goat breeds and starter culture systems on gross composition and proteolysis in Gokceada goat cheese during ripening. **Small Ruminants Res.**, v.113, n. 1, p.231-238, 2013.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab16.pdf>. Acesso em: 10 de março 2015.

IDF. International Dairy Federation. Milk and milk productsd Guidance on methods of sampling. Brussels, Belgium: Standard 50C. IDF. 1995.

IRANMANESH, M.; EZZATPANAH, H.; MOJGANI, N. Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. **LWT - Food Sci. Technol.**, v.58, n. 2, p. 355-359, 2014.

KING, N. Modification of Vogues-Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetyl methyl carbinol plus diacetyl in butter. **Dairy**, v.13, p. 860-866, 1948.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; WERNER, G.; HUYS, G.; VANKERCKHOVEN, V.; KAHLMETER, G.; HILDEBRANDT, B.; MULLER-BERTLING, S.; WITTE, W.; GOOSSENS, H. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, n. 5, p. 900-12, 2007.

LIMA, K.G.D.C.; KRUGER, M.F.; BEHRENS, J.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; DE MELO FRANCO, B.D.G. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 42, n. 2, p. 491-495, 2009.

LIU, X.; LIU, W.; ZHANG, Q.; TIAN, F.; WANG, G.; ZHANG, H.; CHEN, W. Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 563-568, 2013.

LOPEZ-KLEINE, L.; MONNET, V. **Lactic Acid Bacteria/ Proteolytic System**. 2. ed. Academic Press, 2011, pp. 49-55.

MINERVINI, F.; BILANCIA, M. T.; SONYA SIRAGUSA, S.; GOBBETTI, M.; CAPONIO, F. Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. **Food Microbiol.**, v. 26, n. 6, p. 559-564, 2009.

MONTEAGUDO-MERA, A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA J.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARMESTO, M.R.; FERRERO, M.Á. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **J. Funct. Foods**, v. 4, n. 2, p. 531-541, 2012.

NIRO, S.; FRATIANNI, A.; TREMONTE, P.; SORRENTINO, E.; TIPALDI, L.; PANFILI, G.; COPPOLA, R. Innovative Caciocavallo cheeses made from a mixture of cow milk with ewe or goat milk. **J. Dairy Sci.**, v. 97, n. 3, p. 1296-1304, 2014.

PARK, Y.W. Bioactive Components in Milk and Dairy Products. In: _____. **Bioactive Components in Milk**. Ames, Iowa and Oxford: Wiley-Blackwell Published, 2009, v. 2, p. 43-81.

PARK, Y.W.; HAENLEIN, G.F.W. Therapeutic and hypo - allergenic values of goat milk and implication of food allergy. In: _____. **Handbook of milk of non e bovine mammals**. Oxford, UK, e Ames: Blackwell Published, 2006, 472 p.

PATTEN, D.A.; LEIVERS, S.; CHADHA, M.J.; MAGSOOD, M.; HUMPHREYS, P.N.; LEIS, A.P.; COLLETT, A. The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the EPSs isolated from *Lactobacillus helveticus* sp. *Rosyjski* and *Lactobacillus acidophilus* sp. 5e2. **Carbohydr. Res.**, v. 384, p.119-127, 2014.

PESCUMA, M.; HÉBERT, E. M; DALGALARRONDO, M.; HAERTLE, T.; MOZZI, F.; CHOBERT, J.M.; FONT DE VALDEZ, G. Effect of exopolysaccharides on the hydrolysis of beta-lactoglobulin by *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 in an *in vitro* gastric/pancreatic system. **J. Agr. Food Chem.**, v. 57, n. 12, p. 5571-5577, 2009.

RINCON-DELGADILLO, M.I.; LOPEZ-HERNANDEZ, A.; WIJAYA, I.; RANKIN, S.A. Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. **J. Dairy Sci.**, v. 95, n. 3, p. 1128-1139, 2012.

RODGERS, S. Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 19, n. 4, p.188-197, 2008.

RÖNKÄ, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M.; RINTA-KOSKI, M.; AARNIKUNNAS, J.; PALVA, A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 83, n. 1, p. 63-74, 2003.

SANT'ANA, A. M. S.; BEZERRIL, F. F.; MADRUGA, M. S.; BATISTA, A.S.; MAGNANI, M.; SOUZA, E.L.; QUEIROGA, R.C. Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. **J. Dairy Sci.**, v. 96, n. 12, p.7442-7453, 2013.

SCHIRRU, S.; TODOROV, S.D.; FAVARO, L.; MANGIA, N.P.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; COMUNIAN, R.; DE MELO FRANCO, B.D.G.; DEIANA, P. Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 309-320, 2012.

SILVA, G.S.; FERRARI, I.S.; SILVA, C.D.A.; ALMEIDA JÚNIOR, W.L.G.; CARRIJO, K.F.; DA COSTA, M.M.; SILVA, A.E.V.N.; DIAS, F.S. Microbiological and physical-chemical profile of goat milk in the semiarid region of the San Francisco Valley. **Vet. Notification**, v.19, n. 1, p. 14-22, 2013.

SOLIERI, L.; BIANCHI, A.; MOTTOLESE, G.; LEMMETTI, F.; GIUDICI, P. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. **Int. J. Food**, v. 38, p. 240-249, 2014.

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.

VAN GEEL-SCHUTTE, G.; FLESCHE, F.; TEN BRINK, B.; SMITH, M.R.; DIJKHUIZEN, L. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. **Applied Microbiol. Biotechnol.**, v.50, n. 6, p. 697-703, 1998.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. **Int. Dairy J.**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

YAVUZDURMAZ, Hatice. Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk. 2007. 80f. Dissertation (Master of Science in Food Engineering) - Izmir Institute of Technology, İzmir, 2007.

ZAGO, M.; FORNASARI, M.E.; CARMINATI, D.; BURNS, P.; SUÀREZ, V.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; GIRAFFA, G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiol.**, v. 28, n. 5, p. 1033-1040, 2001.

APÉNDICE





Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk



Washington Luiz Gonçalves de Almeida Júnior, Íris da Silva Ferrari, Jane Viana de Souza, Carla Daiane Andrade da Silva, Mateus Matiuuzzi da Costa, Francesca Silva Dias*

Federal University of San Francisco Valley, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n° – Ct, CEP 56.300-990, Petrolina, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2014

Received in revised form

2 January 2015

Accepted 14 January 2015

Available online 23 January 2015

Keywords:

Lactic acid bacteria

Probiotic

Goat cheese

E. coli

Physico-chemical

ABSTRACT

The aim of this study was to characterise and select Lactic Acid Bacteria (LAB) from goat milk with potential probiotic use and to evaluate the safety of these cultures in artisanal cheeses. The isolates of LAB were subjected to simulation of tolerance to the gastrointestinal tract, haemolytic test, antimicrobial susceptibility, antibacterial activity, EPS production, gas production, evaluation of proteolytic activity, diacetyl production and tolerance to NaCl. The genus and species of the selected LAB isolates were confirmed using molecular identification. Three goat cheeses (1, 2 and control) were manufactured to evaluate the inhibitory action of LAB against *Escherichia coli*. Subsequently, all cheese samples underwent bacterial enumeration and physico-chemical analyses. Statistical analysis was performed. UNIVASF CAP 14 and 20 were differentiated by survival up to pH 2 and pancreatin, resistance to NaCl and antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae*. UNIVASF CAP 4 and 29 were characterised by resistance to intestinal juice and antibacterial activity against *Salmonella* Typhi and *Listeria monocytogenes*. UNIVASF CAP 27, 38, 43 and 139 exhibited diacetyl production, antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. UNIVASF CAP 35 and 138 were characterised by proteolytic activity, EPS production, antibacterial activity to *E. coli* and *Shigella flexneri*. A cocktail of these 10 isolates with potential probiotic properties were inoculated in artisanal goat cheese and improved microbiological safety of product against *E. coli*.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lactic Acid Bacteria (LAB) are indigenous inhabitants of the human Gastro Intestinal Tract (GIT) and have a long history of use in foods and fermented products as starter cultures (Collado, Meriluoto, & Salminen, 2007). A variety of microorganisms, typically food grade lactic acid bacteria (LAB), have been evaluated for their probiotic potential and are applied as adjunct cultures in various types of food products or in therapeutic preparations (Rodgers, 2008; Zago et al., 2011). Numerous health benefits of LAB have made them promising probiotic candidates and being extensively studied to explore their safety and other desirable properties (Iranmanesh, Ezzatpanah, & Mojgani, 2014) and contribute to add value to products. New product categories, and thus novel and

more complex raw materials with regard to probiotics technology, are certainly a key research and development area for the functional foods market (Coman et al., 2012).

Brazil has the world's 7th largest goat herd. The herd is concentrated in the northeast, in the semi-arid region, especially in the states of Bahia and Pernambuco (FAO, 2014; IBGE, 2011). The herding of goats is critical to the region. From an economic perspective, due to the growing consumer interest in functional food, goat milk has great potential because the product possesses unique biological properties, such as high digestibility, distinct alkalinity, high buffering capacity and therapeutic values in medicine (Park, 2009; Park & Haenlein, 2006). The second aspect that affects the demand for goat milk is the interest connoisseurs have shown in goat milk products, especially cheeses and yoghurt, in many countries (Haenlein, 2004). In the semi-arid region of Pernambuco, known nationally and internationally for its fine wines, the production of cheeses complements gastronomic tourism, supplementing the income of smallholders.

* Corresponding author. Tel.: +55 87 2101 4839.

E-mail address: francescanobre@univasf.edu.br (F.S. Dias).

However, to gain access to the market, new alternatives for the safety and processing of milk should be investigated. Goat milk and its derivatives are still associated with low microbiological and technological quality (Silva et al., 2013). Lactic Acid Bacteria, in addition to their probiotic properties, impede the growth of pathogenic and spoiling bacteria by competing for nutrients and starter-derived inhibitor compounds, such as lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins (Stiles & Holzapfel, 1997) thereby technically improving the quality of the milk. Therefore, this study was conducted to characterise and select LAB from goat milk with potential probiotic use and to evaluate the safety of these cultures in artisanal cheeses.

2. Material and methods

2.1. Raw milk samples and microbiological analyses

Samples of raw goat milk were collected from extensively small-scale dairy farms with mixed-breed goats in six municipalities (Juazeiro, Uauá, Senhor do Bonfim, Curaçá, Jaguarari and Petrolina) of the San Francisco Valley, Northeast of Brazil; seven farms were randomly selected from each county for a total of 42 milk samples. Trained research personnel aseptically collected the milk samples (150 mL) from containers, in which the product was stored after the daily milking, using a stainless steel ladle (ethanol-sanitised) and sterile plastic bottles. Samples were collected in triplicate. Samples were stored at 4 °C until delivery to the laboratory for enumeration of Lactic Acid Bacteria (LAB) on the same day.

In microbiological analysis for LAB, 0.1 mL aliquots of goat milk and dilutions (10^{-1} to 10^{-8}) were transferred to plates with a specific medium, de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Himedia). The plates were incubated at 37 °C for 72–96 h in aerobic conditions described by Lima et al. (2009). Six colonies per sample were randomly picked from MRS agar plates, reaching a total of 252 colonies. Basic characterisation of the isolates was performed through Gram reaction, morphology, motility, catalase (H_2O_2 , 3% vol/vol) and cytochrome-oxidase activities. From this, fifty isolates were selected for the tests described in the study.

2.2. Simulation of tolerance to the gastrointestinal tract (GIT)

To simulate survival in the GIT, the 50 pre-selected LAB isolates were tested in an *in vitro* model that chemically replicates physiological conditions. In the tolerance to low pH test, the pH of MRS broth was adjusted to 2.0 with 1 N hydrochloric acid. In the bile tolerance test, the medium was MRS broth supplemented with 2.0% bovine bile (Sigma-Aldrich). For the pancreatic fluid tolerance test, 150 mM $NaHCO_3$, 1.9 mg/mL pancreatin (Sigma-Aldrich) and pH 8 were used, as suggested by Rönkä et al. (2003). To test the tolerance to intestinal juice, in accordance with Bao et al. (2010), 0.1 g of trypsin (Sigma-Aldrich) and 1.8 g of bile salts were added to a sterile solution of 1.1 g of sodium bicarbonate and 0.2 g of sodium chloride in 100 mL distilled water. The pH of the solution was adjusted to 8.0 with 0.5 M sodium hydroxide and sterilised by filtering through a 0.45 µm membrane.

The strains for each test were initially cultured for 24 h in MRS broth at 37 °C. After this period, the strains were centrifuged for 5 min and washed 3 times in Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.0. Individual tubes containing each strain and test medium were incubated for 3 h at 37 °C in a water bath. Viability was evaluated in duplicate at 0 and 3 h on MRS agar. Survival rates were calculated according to the following equation:

$$\text{Survival rate(\%)} = \frac{\log \text{CFU } N_1}{\log \text{CFU } N_0} \times 100$$

where N_1 represents the total viable count of strains at time 3 h, and N_0 represents the total viable count of strains at time 0 h.

2.3. Characterisation of virulence factors of microorganisms

The production of DNase was determined by addition of aliquots of 1 µl of the isolates in drops on the DNase test agar surface with toluidine blue at 0.1%, the plates were then incubated at 37 °C for 48 h. Positive result for the presence of DNase was indicated by the formation of rosy halos around the colonies.

For the coagulase test, 0.3 mL of each culture of isolates was transferred to sterile tubes containing 0.3 mL of rabbit plasma (plasma-Coagu LaborClin) and incubated at $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for 6 h. The formation of a large and organised clot or total coagulation was considered a positive result for the test.

For hemolysis test, the LAB isolates were cultured in MRS broth at 37 °C for 15 h and then transferred onto blood agar (Himedia) plates supplemented with 5% defibrinated whole horse blood (Oxoid). After 48/72 h, the haemolytic reaction was evaluated by observing both the partial hydrolysis of red blood cells and the production of a green zone (α -hemolysis), as well as the total hydrolysis of red blood cells producing a clear zone around bacterial colony (β -hemolysis) or no reaction (γ -hemolysis).

In antimicrobial susceptibility testing, the antimicrobials chloramphenicol (30 µg/disc), oxacillin (1 µg/disc), vancomycin (30 µg/disc), tetracycline (30 µg/disc), ciprofloxacin (5 µg/disc) and penicillin G (UI/disc) were used according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). LAB isolates were grown on MRS agar for 24 h at 37 °C. The strains were inoculated in 4 mL of sterile distilled water to achieve the n° 0.5 McFarland turbidity standard (Probac, Brazil). A swab was used to spread the inoculum across the surface of Muller Hinton agar (Merck), and then antibiotic disks were applied to the plate. Antimicrobial susceptibility was assessed by measuring the zone of inhibition of bacterial growth after incubation for 24 h at 37 °C. *Escherichia coli* ATCC 25922 were used for quality control testing.

2.4. Agar disc diffusion – antibacterial activity

The inhibitory effect of different strains of LAB over pathogens was tested using the agar disc diffusion method. *E. coli* (ATCC 8739), *Salmonella* Typhi (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC n° 25923), *Shigella flexneri* (ATCC n° 12022), *Enterococcus faecalis* (ATCC n° 19433), *Bacillus cereus* (ATCC n° 11778) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC n° 13883) were grown in Tryptone Soya Agar (TSA, Himedia) supplemented with 0.6% yeast extract for 24 h at 37 °C. Each pathogen was suspended in 4 mL of sterile water and standardised to approximately 10^8 CFU/mL, comparable to the standard turbidity n° 0.5 of McFarland. A sterile swab was soaked in the suspension and applied to the surface of a plate with TSA agar. After the inoculum was added and allowed to absorb, and 6 mm sterile paper filter discs (Whatmann n°1) moistened with 20 µl of cell free supernatant obtained by centrifugation ($2500 \times g/10$ min) from each isolate of LAB in exponential growth phase were added. The susceptibility of pathogens to the discs was assessed by measuring the zone of inhibition of bacterial growth around the discs (radius – mm) after incubation for 24 h at 37 °C. A clear zone of inhibition of at least 2 mm radius was recorded as positive. The experiment was performed in triplicate.

2.5. EPS production by LAB

Exopolysaccharide (EPS) production from LAB isolates was tested according to the method described by Van Geel-Schutten, Resch, ten Brink, Smith, and Dijkhuizen (1998), with modifications. Briefly, LAB cultures were grown in conical flasks containing 20 mL MRS broth supplemented with 2% (w/v) glucose at 37 °C for 3 days. Bacterial cells were removed by centrifugation at 6000 × g for 20 min, and two volumes of 95% (v/v) cold ethanol (Merck) were added to one volume of culture supernatant for EPS precipitation. Precipitates were recovered by filtration under vacuum and dried at 60 °C. Their weight was measured to determine the amount of EPS produced.

2.6. Gas production

To verify gas production from glucose, MRS broth with 5% glucose was used and added to Durham tubes according to the method of Cai, Suyanandana, Saman, and Benno (1999).

2.7. Evaluation of proteolytic activity

To evaluate proteolytic activity, LAB isolates were plated on milk agar. The milk agar was prepared by adding 1% skim milk powder to Plate Count Agar (Himedia) (Beerens & Luquet, 1990). The plates were incubated at 7 °C/10 days and 37 °C/48 h. The transparent halo-forming colonies were considered positive for proteolytic activity.

2.8. Diacetyl production

After growth, the isolates were centrifuged at 4000 rpm for 15 min. The pellet was resuspended in peptone water and inoculated (1% (w/v)) in 10 mL whole UHT milk and incubated at 30 °C for 24 h. Then, 1 mL of culture was added to 0.5 mL of α -naphthol solution (1% (w/v)) and KOH (16% (w/v)) followed by incubation at 37 °C for 10 min. The production of diacetyl was indicated by a formation of a red ring in the tubes (King, 1948). The results were classified as weak, medium or strong according to the intensity of the colour of the ring formed. The tests were conducted in duplicate.

2.9. Tolerance to NaCl

The isolates were tested for tolerance to NaCl concentrations between 4% and 6.5% according to the method of Yavuzdurmaz (2007). Media containing test indicator bromocresol purple was prepared according to the concentrations mentioned above and transferred to 5 mL tubes. The tubes were inoculated with 1% overnight cultures and then incubated at 37 °C for 7 days. A change in colour from purple to yellow was evidence of cell growth.

2.10. Identification of LAB isolates

The genus and species were confirmed using molecular identification. Bacterial DNA from each strain was extracted using a PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). PCR reactions were carried out in a final volume of 50 μ L containing 25 μ L of TopTaq Master Mix (Qiagen), 1 μ L of each primer (27f/1512r), 2 μ L of DNA and 21 μ L of RNase free water. The PCR products were purified with PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). The purified PCR products were sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) using an ABI730 XL automatic DNA sequencer. Sequences were then compared to those in the GenBank database using the BLAST

algorithm (National Centre for Biotechnology Information, Maryland, USA).

2.11. Inhibition of *E. coli* in artisanal goat cheese

The goat cheeses were manufactured to evaluate the inhibitory action of LAB against *E. coli* (ATCC 8739). The cheeses were manufactured in accordance with the traditional procedure employed by smallholders in the semi-arid region of Pernambuco. Three goat cheeses (1, 2 and control) were prepared in the laboratory under aseptic conditions. The difference in preparation among the three cheeses was the addition or absence of inoculum. The acidity and freezing point of goat milk used were determined first according to the method described by Brazil (2006). The milk was then pasteurised at 65 °C (\pm 1 °C) for 30 min followed by cooling to 30 °C. In the first cheese (cheese 1), one inoculum containing a pathogenic bacteria *E. coli* suspended in 33.8 mL (1% milk volume) of sterile distilled water with a population of 10^8 CFU/mL was added as a positive control. In the second cheese (cheese 2), 33.8 mL of sterile distilled water containing 10^8 CFU/mL *E. coli* and 10^2 CFU/mL of a mixture of selected LAB was added. In the third cheese, there was no microbial inoculation: the cheese was the negative control. The following were added to the three cheeses, in sequence: 0.5 mL/L 50% calcium chloride and 0.9 mL/L commercial coagulant (Ha-La[®], Christian Hansen Ind. & Com. Ltd, Valinhos, SP, Brazil). After 30 min of rest, the curd was gently cut into cubes, drained, and salted (0.9 g/L). The cheese mass was distributed into 250 g perforated moulds and pressed for 2 h at room temperature. After the withdrawal of the form, the products were weighed for calculating yield (kg of cheese/L of milk) (Fritzen-Freire, Müller, Laurindo, & Prudêncio, 2010), packed in sterile plastic bags (Cryovac, Brazil) and stored at 4 °C with 90% relative humidity for a total of 20 days. Bacterial enumeration, pH and lactose were performed on the days 0, 5, 10, 15 and 20 after preparation of the cheeses.

2.11.1. Bacterial enumeration

Twenty-five grams was aseptically removed by means of radial cuts of each cheese and then homogenised in the Stomacher[®] (Mayo Homogeniser HG 400) with 225 mL of 1% peptone water (Himedia) (IDF, 1995). Serial dilutions were prepared. The enumeration of LAB was conducted using the culture media MRS, and plates were incubated at 37 °C for 24 h. Fluorocult LMX broth was used for enumeration of *E. coli*. After incubation at 37 °C for 24–48 h, under ultraviolet light (366 nm wave length), blue tubes, which presented fluorescence, were considered positive, in combination with the Indole test. The positive tubes were streaked on Eosin Methylene Blue (EMB) Agar (Merck). Typical colonies on each medium were enumerated.

2.11.2. Physical–chemical analyses

The pH value was determined by homogenising 10 g of cheese in 10 mL of distilled water using a pH meter (PHS-3B, Labmeter Model PH equipped with an electrode T818-A, Shanghai, China). The lactose value was measured according to the Lane-Eynon method (Brazil, 2006).

2.12. Statistical analysis

For the selection of LAB as inoculum to goat cheese, all tests included in this study were analysed via Principal Component Analysis (PCA) using the software XLSTAT 7.5.2 (Addinsoft, New York, NY, USA).

A randomised complete design was used for measuring the inhibition of *E. coli* in goat cheese, and treatments were arranged in the factorial 3 X 5: 3 cheeses (cheese with an inoculum of *E. coli*,

cheese with an inoculum of *E. coli* plus LAB and without inoculums) and 5 time points (0, 5, 10, 15 and 20 days). The data were analysed using ANOVA, and the means were compared using the Scott–Knott test. Quantitative data were analysed using regression. The statistical analysis was performed using SISVAR® (Lavras, Brazil) software, version 4.5.

3. Results and discussion

3.1. Microbiological analyses

The average of LAB in the raw goat milk analysed in the semi-arid region of the San Francisco Valley, Northeast of Brazil was 3.93 log CFU/mL. In the classification differential staining by Gram's Method, the isolates were identified as Gram-positive cultures and having shaped cocci and rods. Isolates were then classified as catalase, motility and oxidase negative. The morphology of the colonies were characterised by shape: circular; border: rounded; a diameter ≤ 2 mm; elevation: convex; surface: smooth; consistency: mucoid; density: opaque; and colour: white. Fifty isolates were selected for subsequent tests. LAB are predominant in the raw goat milk and, when selected, contribute to an increase in the functional value of goat milk (Silva et al., 2013).

3.2. Safety and technological aspects and probiotic features of UNIVASF CAP isolates

The results obtained by exposure of LAB isolates to pH 2.0 MRS, pancreatic fluid, 2% bile and intestinal fluid are reported in Table 1. The results showed that 36 LAB isolates achieved high survival rate up to pH 2; 8 isolates had survival rates of 80–89%, and 6 isolates had survival rates of 70–79%. Survival rates higher than 90% at pH 2 is considered to constitute good acid resistance. For LAB strains to have a beneficial effect on intestine health, they need to be able to survive low acidic conditions (Liu et al., 2013). In the study by Solieri, Bianchi, Mottolise, Lemmetti, and Giudici (2014), the critical limit of survival under exposure to acidic conditions was pH 2.0, which was effective in completely inhibiting the survival of almost all the strains.

In response to pancreatic fluid (Table 1), the survival rate was >91% for 49 isolates tested. When incubated in 2% bile, all isolates had survival rates >95%. In intestinal fluid, the survival rate was >92% for 48 isolates, where 1 isolate had a survival rate of 80–89% and 1 isolates had a survival rate of 70–79%. Bao et al. (2010) and Monteagudo-Mera et al. (2012) reported that pancreatic fluid had no significant effect on the viability of strains after simulation *in vitro*. Isolates with a high survival rate in the *in vitro* simulation of GIT conditions are potential candidates for successfully crossing the human GIT barrier (Dias, Duarte, Santos, Ramos, & Schwan, 2013).

In the characterisation of virulence factors of microorganisms, all tested strains were negative for coagulase and DNase and demonstrated γ -haemolytic activity when grown in horse blood agar. The determination of potential virulence of microorganisms is

Table 1
Number of LAB isolates (total of 50) tolerant to pH 2.0, pancreatic fluid, bile (2%) and intestinal juice.

Survival rate (%)	N° of isolates surviving at			
	pH 2	Pancreatic fluid	Bile (2%)	Intestinal juice
100 \geq % \geq 90	36	49	50	48
89 \geq % \geq 80	8	1	–	1
79 \geq % \geq 70	6	–	–	1

required for assuring safety, even among a group of bacteria that is Generally Recognised as Safe (GRAS) (Joint FAO/WHO, 2002).

The pattern of antimicrobial susceptibility of strains was high (Table 2). For the 6 antimicrobials tested, 27 isolates were susceptible to six antibiotics (54%), 9 were susceptible to five antibiotics (18%), 7 were susceptible to four antibiotics (12%) and 6 were susceptible to three antibiotics (12%) (Table 2). The isolated UNIVASF CAP 6 was resistant to all antibiotics tested. Lower sensitivity was presented by isolates for antimicrobial oxacillin, where 15 isolates were resistant. LAB resistance to oxacillin has been reported (Danielsen & Wind, 2003). Forty-eight isolates were susceptible to chloramphenicol. According to Klare et al. (2007), LAB strains are generally susceptible to this antimicrobial. The investigation of the resistance pattern of LAB isolates candidates for probiotic use is essential. Bacteria may serve as hosts of antibiotic resistance genes, which can be transferred to pathogenic bacteria (Danielsen & Wind, 2003).

Table 3 shows the results of antibacterial activity of 50 LAB isolates against eight different pathogens by measurement of the radius around the disk (mm). The tested isolates presented different levels of inhibitory action against the pathogens and demonstrated to be isolate specific. Greater number of LAB isolates inhibited *L. monocytogenes*. UNIVASF CAP 123 showed higher antibacterial activity against *E. coli* pathogen with an inhibition zone of 5.5 mm. According to Aymerich, Garriga, Monfort, Nes, and Hugas (2000), Gram positive bacteria are more sensitive to the action spectrum of lactobacilli. However, the inhibition of Gram negative bacteria by LAB were found by Aslim, Yuksekdog, Sarikaya, and Beyatli (2005), Iranmanesh et al. (2014) and Schirru et al. (2012). In this study, six LAB isolates, UNIVASF CAP 7, 12, 35, 36, 43 and 53, inhibited the growth of four pathogens.

The production of EPS by LAB isolates ranged from 10 mg/L to 100 mg/L (Table 4). The average production was 27.60 mg/L. Twenty one isolates produced above average amounts of EPS; UNIVASF CAP 29 showed higher production of EPS. The amount of EPS produced by LAB is strongly influenced by culture and fermentation conditions such as pH, temperature and media composition (Dueñas-Chasco et al., 1998). EPS have been shown to have an immunomodulatory effect on intestinal epithelial cells (Patten et al., 2014) and function as naturally synthesised texturing agents in fermented food products (Badel, Bernardi, & Michaud, 2011).

Six isolates showed gas production from glucose (Table 4). Only UNIVASF CAP 24, 28, 41, 54, 122 and 124 showed the capability to produce CO₂. Technologically, according to Franciosi, Settanni, Cavazza, and Poznanski (2009), strains with this attribute should not be used in some cheese productions because they may cause

Table 2
LAB isolates susceptible to antimicrobials and number of antimicrobials tested.

Susceptibility to antimicrobials	Number of isolates (n = 50)
Antimicrobials	
Chloramphenicol	48
Oxacillin	35
Vancomycin	42
Tetracycline	42
Ciprofloxacin	36
Penicillin G	45
Susceptibility to number of antimicrobials	
6	27
5	9
4	7
3	6
2	–
1	1
0	–

Table 3
Antibacterial activity of LAB isolates with size of inhibition zone ≥ 2 mm to eight pathogens and the number of pathogens inhibited by isolates.

Antibacterial activity	Number of isolates (n = 50)
Pathogens	
<i>Escherichia coli</i>	15
<i>Salmonella Typhi</i>	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Shigella flexneri</i>	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	6
<i>Bacillus cereus</i>	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
Inhibition to number of pathogens	
4	6
3	6
2	12
1	13
0	13

unwanted eye-formation or blowing. The diacetyl production by LAB from raw goat milk was similar, with all isolates showing weak production. Diacetyl (2,3-butanedione) is a volatile product of citrate metabolism produced by certain LAB and contributes directly to flavour formation, a feature of great industrial importance (Rincon-Delgado, Lopez-Hernandez, Wijaya, & Rankin, 2012).

In tests for proteolytic activity, 19 isolates were characterised as positive (Table 4). Intra- and inter-specific variability in proteolysis is commonly reported for strains from natural sources (Franciosi et al., 2009). Although LAB are not considered as strongly proteolytic bacteria, their proteolytic system is essential for the optimal growth in milk and contributes significantly to flavour development in fermented milk products (Lopez-Kleine & Monnet, 2011). Proteolysis could also contribute to preventing allergies frequent in children under 3 years of age due to poor digestion of milk proteins (Pescuma et al., 2009).

All LAB isolates were tolerant to the NaCl concentration used in this study (Table 4). For industrial application of LAB as starter cultures in cheese, these microorganisms must be capable of tolerating stressful conditions such as acidity, temperature, salt stress and freeze-drying. To tolerate NaCl, various mechanisms developed by LAB are described, for example the uptake or synthesis of a limited number of solutes (Bremer & Krämer, 2000).

To separate the LAB isolates in this study according to their overall characteristics, PCA was carried out based on probiotic characteristics (Fig. 1). The first seven components accounted for 71.44% of the total variance. Among them, PC1 and PC2 made up 16.26 and 12.702% of the total variance respectively. Probiotic

Table 4
LAB isolates producing exopolysaccharides (EPS), gas and diacetyl, with proteolytic activity and tolerant to NaCl.

Characteristics	Number of isolates (n = 50)
EPS production (mg/l)	
10.00–19.00	10
20.00–29.00	19
30.00–49.00	6
50.00–59.00	11
60.00–69.00	1
70.00–79.00	1
80.00–89.00	–
90.00–100.00	1
Gas production	6
Proteolytic activity	19
Diacetyl production (weak)	50
Tolerance to NaCl	50

characteristics were markedly separated in the plane of the biplot (Fig. 1). In the lower left quadrant, UNIVASF CAP 14 and 20 were differentiated by survival up to pH 2 and pancreatin, resistance to NaCl and antibacterial activity against *Klebsiella*; UNIVASF CAP 4 and 29 were differentiated by resistance to intestinal juice and antibacterial activity against *Salmonella* and *Listeria*. In the lower right quadrant, UNIVASF CAP 27, 38, 43 and 139 were characterised by diacetyl production, antibacterial activity against *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Enterococcus*; and UNIVASF CAP 35 and 138 were characterised by proteolytic activity, EPS production, antibacterial activity to *E. coli* and *Shigella*. These results suggest that a mix of these 10 isolates may have relevant probiotic characteristics and lead to increased microbiological safety of artisanal goat cheese.

These isolates were also identified by comparative analysis of 16S rRNA gene sequences and identified with a similarity of 98–99% to *Lactobacillus plantarum* (UNIVASF CAP 4, 14, 20, 35, 38 and 139 – Gene bank accession number: NR_075041.1), *Lactobacillus casei* (UNIVASF CAP 27 and 43 – Gene bank accession number: NR_075032.1) and *Enterococcus faecium* (UNIVASF CAP 29 and 138 – Gene bank accession number: NR_115764.1). The potential probiotic effect and antimicrobial activity of isolates of *L. plantarum*, *L. casei* (Minervini, Bilancia, Sonya, Gobbetti, & Caponio, 2009) and *E. faecium* (Ahmadova et al., 2013) has been described.

3.3. Goat cheese: inhibition of pathogens, pH and lactose

The goat cheese was made from milk with acidity of 18 °D and an index cryoscope of -0.5878 °H. The milk was pasteurised, and *E. coli* were not detected in the samples from the negative control. The yield of cheese was 13.27%, 13.28% and 13.30% for the negative control, positive control (cheese 1) and LAB cocktail inoculated (cheese 2) cheeses, respectively. Similar results were reported by Hayaloglu, Tolu, and Yasar (2013), who found cheese yield values ranging from 13.87% to 18.89%. According to the authors, the goat breeds, unlike starter cultures, have greater influence on cheese yield.

In the samples from the positive control (cheese 1), naturally present LAB were detected at 7 log CFU/g (Table 5). In cheese 2 there was the inoculation of *E. coli* and LAB isolates. LAB isolates were distinguished by PCA, and UNIVASF CAP 4, 14, 20, 27, 29, 35, 38, 43, 138 and 139 were selected. The total LAB population in the cheese 2 samples in day 0 was 9 log CFU/g (indigenous population of LAB in the cheese and the addition of mixed LAB isolates).

A significant correlation ($P < 0.05$) between cheese and time was found during the enumeration of *E. coli* (Table 5). The pathogen populations were lower in cheese inoculated with the mix of LAB isolates (cheese 2) and decreased linearly over time by 0.24 log units per day. The negative control showed a lower linear decrease over time of 0.0796 log units per day. Caridi, Mican, Foti, Ramondino, and Sarullo (2003) affirmed that the reduction of coliforms and *E. coli*, observed during ripening, suggests that they could be inhibited by highly competitive LAB strains that are able to prevail during ripening. In this study was observed that the addition of LAB accelerated the decline of *E. coli*. The strains of LAB were effective in the inhibition of *E. coli* in tests *in vitro* and in goat cheese. Delbès-Paus et al. (2013) reported a synergistic interaction between *Hafnia alvei* B16 and the microbial consortium, resulting in an additional 0.7 log reduction in *E. coli* O26:H11 counts from day 8 in a model cheese ecosystem.

During the storage period, LAB counts were significantly different ($P < 0.05$) in the cheeses with and without LAB isolates. The LAB population increased linearly until the final period by 0.0132 and 0.046 log units per day in cheese 1 and 2, respectively (Table 5). The observation of the maintenance of viable culture until

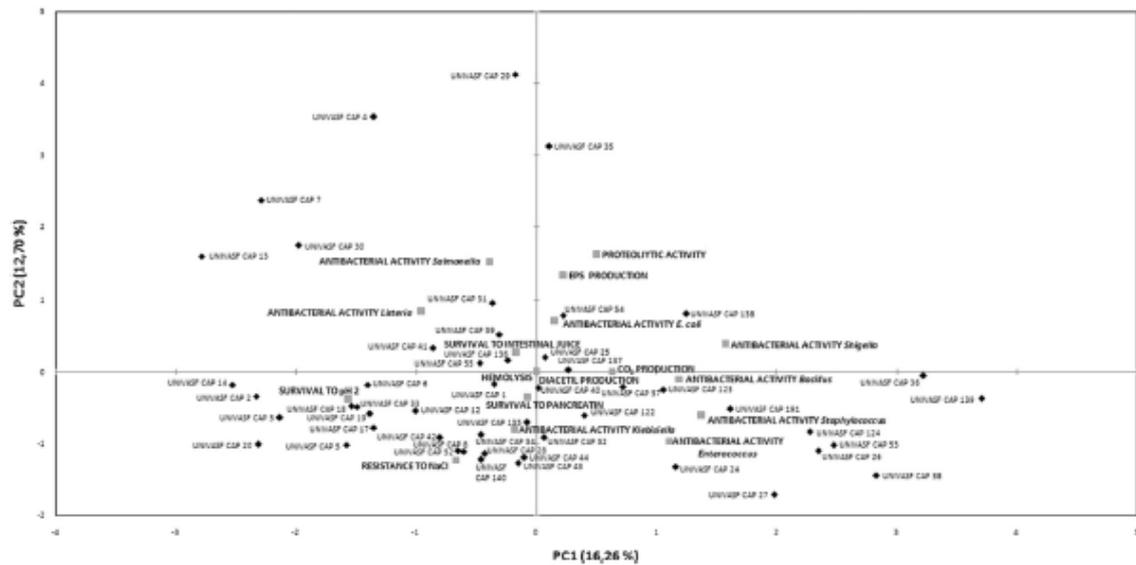


Fig. 1. Principal Component Analysis (PCA) based on the probiotic characteristic data of the 50 LAB isolates. The first seven components explained 62.50% of the total variance; among them, PC1 and PC2 explained 16.26% and 12.70% of the total variance, respectively.

Table 5

E. coli and LAB counts, pH values, and lactose in cheese without (cheese 1) and with (cheese 2) a mix of LAB during storage for up to 20 days at 4 °C.

Cheeses	Time (days)					Average	Equation
	0	5	10	15	20		
<i>E. coli</i> ^a							
Cheese 1	8.041a	7.041b	6.568b	6.380b	6.380b	6.882b	$y = -0.0796x + 7.679$ $R^2 = 0.8050$
Cheese 2	8.041a	6.041a	5.380a	3.380a	3.380a	5.244a	$y = -0.24x + 7.641$ $R^2 = 0.9309$
Average	8.041	6.541	5.974	4.880	4.880	6.063	***
LAB ^b							
Cheese 1	7.293a	7.14a	7.425a	7.368a	7.509a	7.347a	$y = -0.0132x + 7.215$ $R^2 = 0.5544$
Cheese 2	9.415b	9.434b	9.92b	10.136b	10.212b	9.823b	$y = 0.046x + 9.365$ $R^2 = 0.9145$
Average	8.354	8.287	8.672	8.752	8.86	8.585	***
pH ^c							
Cheese 1	6.563a	6.42a	6.13a	6.056b	5.84b	6.20	$y = -0.0362x + 6.564$ $R^2 = 0.9767$
Cheese 2	6.573a	6.48b	6.186b	5.90a	5.80a	6.18	$y = -0.042533x + 6.613$ $R^2 = 0.9680$
Average	6.568	6.45	6.158	5.978	5.82	6.195	***
Lactose ^d							
Cheese 1	1.566a	1.156a	1.049a	0.956b	0.894b	1.124	$y = -0.0309x + 1.433$ $R^2 = 0.8420$
Cheese 2	1.566a	1.182b	1.092b	0.906a	0.861a	1.122	$y = -0.033x + 1.459$ $R^2 = 0.8988$
Average	1.566	1.169	1.070	0.931	0.877	1.123	***

For each column, mean values with different letters (online) are significant ($P < 0.005$) according to the Scott–Knott test.

*** $P < 0.005$.

^a Standard Error (SE) = 0.029.

^b SE = 0.0975.

^c SE = 0.012.

^d SE = 0.006.

the end of the storage period was important because this is one of the criteria for candidate strains for probiotic use (Vasiljevic & Shah, 2008); to exert their functional properties, probiotics need to be delivered to the desired sites in an active and viable form. Similar results were found in Minas fresh cheese by Buriti, da Rocha, Assis, and Saad (2005): viable counts of *Lactobacillus paracasei*, a probiotic strain, increased during storage of 21 days.

In the cheese 1 and cheese 2 samples, significant interactions ($P < 0.05$) were found between pH and the time of evaluation (Table 5). The pH values of cheese without and with LAB isolates decreased linearly over time, by 0.0362 and 0.042 pH units per day, respectively. On day 5, a difference in pH was found between the cheese 1 and cheese 2 samples. The pH values of cheese 2 started to decrease only after the 15th day. During this time, the population of *E. coli* decreased from 5.380 to 3.380 log CFU/g and IAB population increased. The organic acids produced by LAB contributed to the decline of the pathogen because they are sensitive to low pH. In general, the pH of goat milk derivative is higher than that of cow milk. Goat milk presents a more pronounced alkalinity and buffering capacity than cow milk, which is mainly related to the associated casein and phosphate systems (Galina, Osnaya, Cuchillo, & Haenlein, 2007).

There was a significant correlation ($P < 0.05$) to lactose content between the cheeses and time of evaluation (Table 5). The lactose content decreased linearly over time, by 0.0309 and 0.033 units per day in cheese 1 and 2, respectively. In cheese 2, the lactose content was higher until the 15th day when the reduction of pH occurred and the population of *E. coli* dropped to 3.380 log CFU/g in comparison to cheese 1. The values of lactose content in cheese show variation. Sant'Ana et al. (2013) determined a 1.26% lactose content in Minas fresh cheeses made with goat milk in Brazil. Franco, Prieto, Bernardo, González Prieto, and Carballo (2003) reported the presence of residual lactose ($1.6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) at the end of the ripening at 60 days. However, Niro et al. (2014) affirmed the absence of lactose in all samples after 30 days of ripening. The presence of lactose even at the end of the ripening period depends on the extent of whey removal, the glycolytic activity of the microorganisms present, and the effect of the environmental conditions on their activity (Franco et al., 2003).

In conclusion, this study reveals the LAB isolated from goat milk have high potential for probiotic application, with elevated production of EPS, survival at low pH and confirmed *in vitro* inhibition of pathogens. The cocktail of isolates UNIVASF CAP improved the microbiological safety of cheese against *E. coli*, the main microorganism detected in goat milk in the semi-arid region of Pernambuco. Further studies are in progress in the author's laboratories to evaluate the ability of isolates to inhibit other pathogens in dairy goats' milk derivatives and the beneficial effects on health with the purpose of contributing to the development of goat production in this region of Brazil.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the UNIVASF (Universidade Federal do Vale do São Francisco) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for scholarship and financial support.

References

Almadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Mirhadi Zadi, T. M., Kuliyev, et al. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Metal cheese. *Food Control*, 30(2), 631–641.

- Aslim, B., Yukseldag, Z. N., Sarikaya, E., & Beyati, Y. (2005). Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *IWT – Food Science and Technology*, 38(6), 691–694.
- Aymerich, M., Garriga, M., Monfort, J., Nes, I., & Hugas, M. (2000). Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, 17(1), 33–45.
- Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1), 54–66.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., et al. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695–701.
- Beerens, H., & Luquet, F. M. (1990). *Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos* (1th ed.). Zaragoza: Acribia.
- Brazil. (2006). *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa métodos analíticos oficiais físico-químicos para o controle de leite e produtos lácteos* (p. 08). Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 14 dez. 2006. Seção 1.
- Bremer, E., & Krämer, R. (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In G. Storz, & R. Hengge-Aronis (Eds.), *Bacterial stress responses* (pp. 79–97). Washington: ASM Press Published.
- Buriti, F. C. A., da Rocha, J. S., Assis, E. G., & Saad, S. M. I. (2005). Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *IWT – Food Science and Technology*, 38(2), 173–180.
- Cai, Y., Suyanandana, P., Sarman, P., & Berno, Y. (1999). Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45(4), 177–184.
- Cardi, A., Micari, P., Foà, F., Ramondino, D., & Sarullo, V. (2003). Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. *Food Microbiology*, 20(2), 201–209.
- CISI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2012). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty two informational supplement*. CISI document M100–S22. Wayne, Pa.: CISI, 188 pp.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*, 40(5), 629–636.
- Coman, M. M., Cecchini, C., Verdenelli, M. C., Silvi, S., Orpianesi, C., & Cresci, A. (2012). Functional foods as carriers for SYNBI06, a probiotic bacteria combination. *International Journal of Food Microbiology*, 157(3), 346–352.
- Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82(1), 1–11.
- Delbes-Paix, C., Miszczyska, S., Ganet, S., Helinc, S., Veisseire, P., Pochet, S., et al. (2013). Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 212–218.
- Dias, F. S., Duarte, W. F., Santos, M. R. R. M., Ramos, E. M., & Schwan, R. F. (2013). Screening of *Lactobacillus* isolated from pork sausages for potential probiotic use and evaluation of the microbiological safety of fermented products. *Journal of Food Protection*, 76(6), 991–998.
- Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Garvajal, M. A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J. L., Irazorza-Iribas, A., & Gil-Serrano, A. M. (1998). Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-72. *Carbohydrate Research*, 307(1–2), 125–133.
- FAO (Food Agriculture Organization of the United Nations). (2014). *FAOSTAT agriculture data*. Available at: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor> Accessed 29.09.14.
- FAO/WHO (Food Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). (2002). *Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Available at: <ftp://ftp.fao.org/es/esc/food/wgreport2.pdf> Accessed 29.09.14.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., & Puzanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19(1), 3–11.
- Franco, I., Prieto, B., Bernardo, A., González Prieto, J., & Carballo, J. (2003). Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana). *International Dairy Journal*, 13(2–3), 221–230.
- Fritzen-Freire, C. B., Müller, C. M. O., Laurindo, J. B., & Prudêncio, E. S. (2010). The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas frescal cheese. *Journal of Food Engineering*, 96(4), 621–627.
- Galina, M. A., Osnaya, E., Cuchillo, H. M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Cheese quality from milk of grazing or indoor fed Zebu cows and Alpine crossbred goats. *Small Ruminant Research*, 71(1–3), 264–272.
- Haenlein, G. F. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), 155–163.
- Hayaloglu, A. A., Tolu, C., & Yasar, K. (2013). Influence of goat breeds and starter culture systems on gross composition and proteolysis in Gokcesada goat cheese during ripening. *Small Ruminant Research*, 113(1), 231–238.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2011). *Produção da Pecuária Municipal - 2011*. Available at: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf Accessed 10.10.14.
- IDF (International Dairy Federation). (1995). *Milk and milk products—Guidance on methods of sampling*. Brussels, Belgium: Standard 50C. IDF.

- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., & Mojjani, N. (2014). Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *IWT – Food Science and Technology*, 58(2), 355–359.
- King, N. (1948). Modification of Vogues–Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetyl methyl carbinol plus diacetyl in butter. *Dairy Industries*, 13, 860–866.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vanackerhoven, V., Kahlmeter, G., et al. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5), 900–912.
- Lima, K. G. D. C., Kruger, M. F., Behrens, J., Destro, M. T., Landgraf, M., & Gombossy de Melo Franco, B. D. (2009). Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *IWT – Food Science and Technology*, 42(2), 491–495.
- Liu, X., Liu, W., Zhang, Q., Tian, F., Wang, G., Zhang, H., et al. (2013). Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli*. *Food Control*, 30(2), 563–568.
- Lopez-Kleine, L., & Monnet, V. (2011). *Lactic acid bacteria | proteolytic systems* (2th ed.). France: Academic Press Published.
- Minervini, F., Bilancia, M. T., Sonya Siragusa, S., Gobetti, M., & Gaponio, E. (2009). Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiology*, 26(6), 559–564.
- Montegudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armero, M. R., et al. (2012). *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 531–541.
- Niro, S., Pratianni, A., Tremonte, P., Sorrentino, E., Tipaldi, L., Panfilì, G., et al. (2014). Innovative Caciocavallo cheeses made from a mixture of cow milk with ewe or goat milk. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1296–1304.
- Park, Y. W. (2009). Bioactive components in milk and dairy products. In Y. W. Park (Ed.), *Bioactive components in milk* (pp. 43–81). Ames, Iowa and Oxford: Wiley-Blackwell Published.
- Park, Y. W., & Haenlein, G. F. W. (2006). Therapeutic and hypo-allergenic values of goat milk and implication of food allergy. In Y. W. Park, & G. F. W. Haenlein (Eds.), *Handbook of milk of non-bovine mammals* (pp. 121–136). Oxford, UK, and Ames: Blackwell Published.
- Patten, D. A., Leivers, S., Chadha, M. J., Maqsood, M., Humphreys, P. N., Laws, A. P., et al. (2014). The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the EPSs isolated from *Lactobacillus helveticus* sp. Rosyjski and *Lactobacillus acidophilus* sp. Se2. *Carbohydrate Research*, 384, 119–127.
- Pescuma, M., Hébert, E. M., Dalgalarondo, M., Haertlé, T., Mozzi, F., Chobert J.-M., et al. (2009). Effect of exopolysaccharides on the hydrolysis of beta-lactoglobulin by *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 in an *in vitro* gastric/pancreatic system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5571–5577.
- Rincón-Delgado, M. I., López-Hernández, A., Wijaya, I., & Rankin, S. A. (2012). Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1128–1139.
- Rodgers, S. (2008). Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. *Trends in Food Science & Technology*, 19(4), 188–197.
- Rönkä, E., Malinen, E., Saarela, M., Rinta-Koski, M., Aarnikunnas, J., & Palva, A. (2003). Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Microbiology*, 83(1), 63–74.
- SanfAna, A. M. S., Bezerra, E. F., Madruga, M. S., Batista, A. S. M., Magnani, M., Souza, E. L., et al. (2013). Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7442–7453.
- Schirru, S., Todorov, S. D., Favaro, L., Mangia, N. P., Basaglia, M., Casella, S., et al. (2012). Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. *Food Control*, 25(1), 309–320.
- Silva, G. S., Ferrari, I. S., Silva, C. D. A., Almeida Júnior, W. L. G. A., Carrijo, K. F., Costa, M. C., et al. (2013). Microbiological and physical-chemical profile of goat milk in the semi-arid region of the San Francisco Valley. *Veterinaria Notícia*, 19(1), 14–22.
- Solieri, L., Bianchi, A., Mottolese, G., Lemmetti, F., & Giudici, P. (2014). Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. *Food Microbiology*, 38, 240–249.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29.
- Van Geel-Schutten, G. H., Flesch, E., ten Brink, B., Smith, M. R., & Dijkhuizen, L. (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(6), 697–703.
- Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714–728.
- Yavuzdurmaz, H. (2007). *Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk* (p. 69). Master of Science in Food Engineering. Izmir Institute of Technology. Available at: <http://library.iyte.edu.tr/tezler/master/gidamuh/1000712.pdf> Accessed 08.07.14.
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., et al. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28(5), 1033–1040.

Review

Principal criteria for selection of lactic acid bacteria for potential use as probiotics in foods

Washington Luiz Gonçalves de Almeida Júnior, Íris da Silva Ferrari, Jane Viana de Souza, Aynianne Leandro Barbosa, Mateus Matiuzzi da Costa, Daniel Ribeiro Menezes and Francesca Silva Dias*

Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF), Rod. BR 407, Km 12 - Lote 543 - Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n° - C1 - CEP 56.300-990. Petrolina, Pernambuco, Brazil.

Received 29 October, 2014; Accepted 12 January, 2015

The use of lactic acid bacteria (LAB) in different food products has been driving the consumer market due to the potential probiotic action of these bacteria, which raises the foods to the status of functional foods. A selection of potential probiotic strains can be obtained from different food matrices and environments. However, these microorganisms must be confirmed as safe while retaining characteristics that make them technologically, functionally and physiologically capable of benefitting the food and health of the host. Characterisation of a potential probiotic strain should include knowledge of the source, pathogenicity, infectivity, virulence factors, viability during processing, storage stability, phage resistance, contribution to sensory properties, tolerance within the gastrointestinal tract, cell adhesion, antimutagenic, anticarcinogenic and antagonistic activity against gastrointestinal pathogens and immunomodulation. Desirable physiological effects of probiotic strains include aiding in lactose intolerance and prevention and reduction of diarrhoea, inflammatory bowel disease and allergies. In this context, this paper reviews the current literature referring to principal criteria for the selection of LAB for potential use as probiotics in foods.

Key words: Lactic acid bacteria, screening, safety, functional foods.

INTRODUCTION

Probiotics are defined by FAO/WHO as live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host by improving the intestinal microbial balance (FAO/WHO, 2002). The value of consumption of lactic acid bacteria (LAB) appeared in the early 20th century when Metchnikoff

suggested that the ingestion of these living microorganisms, present in yoghurt, increased the longevity of the consumer. Metchnikoff attributed the positive effects observed on the host health to a reduction in the population of spoilage bacteria and/or of bacteria producing toxins in the digestive tract (Burgain et al.,

*Corresponding author. E-mail: francesca.nobre@univasf.edu.br. Tel: +55 87-2101-4830.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

2014).

Interest is now growing in the development of novel foods containing probiotic microorganisms (Sidira et al., 2015). The most frequently studied LAB for probiotic usage belong to the genera *Lactobacillus* and *Enterococcus* (Coman et al., 2012; Jensen et al., 2012; Gregoret et al., 2013; Babot et al., 2014). The majority of the commercialized and most studied probiotics have been isolated from dairy products and from the human gastrointestinal tract (GIT). In fact, LAB strains are already used in many probiotic dairy products (García-Ruiz et al., 2014). However, commercial use of genres as probiotics in food requires screening of microorganisms and selected strains must meet safety, technological, functional and physiological requirements (Morelli, 2007; Vasiljevic and Shah, 2008).

The safety criteria of a probiotic include a documented origin and a lack of characteristics such as pathogenicity and infectivity and, virulence factors including resistance to antibiotics and metabolic activity (Saarela et al., 2000; Muñoz-Atienza et al., 2014; Rubio et al., 2014). From the technological aspect, probiotic cultures must remain viable during processing and show storage stability and phage resistance, while contributing to good sensory properties of the products, such as the aromatic profile (Vasiljevic and Shah, 2008; Champagne et al., 2011). Fermentation by the culture should preserve and enhance the quality while beneficially altering the flavour of the food (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010), thereby generating a higher added-value product.

As a functional criterion, probiotic strains must survive within the gastrointestinal tract; they must be able to tolerate the acidic conditions of the stomach, resist digestive enzymes and bile acid at the start of the small intestine, adhere to the intestinal mucosal surface and ensure clinically validated benefits to consumer health (Erkkilä and Petäjä, 2000; Cotter and Hill, 2003; Jensen et al., 2012). Desirable physiological requirements for probiotic cultures are antimutagenicity, anticarcinogenicity, antagonism against gastrointestinal pathogens, promotion of immunomodulation and action on the metabolism of lactose and cholesterol (Zago et al., 2011; Burns et al., 2012; Ren et al., 2012). In this context, this paper reviews the current literature, referring to these principal criteria for the selection of LAB for potential use as probiotics in foods.

SAFETY CRITERIA: ORIGIN, PATHOGENICITY AND VIRULENCE FACTORS

Origin

To act as a safe probiotic microorganism, a strain should be a species and genera normally present in the human GIT (Kolozyn-Krajewska and Dolatowski, 2012). The

selection of an appropriate strain for each food matrix is essential. The first step in the selection of a probiotic is the determination of its taxonomic classification, which may give an indication of the origin, habitat and physiology of the strain. All these characteristics have important consequences on the selection of novel strains (Morelli, 2007).

The LAB, especially *Lactobacillus* and *Enterococcus*, are commonly used as probiotics (Barbosa et al., 2010; Tulumoğlu et al., 2014). They are classified as prokaryotic, Gram-positive, non-sporulating cells that have the common characteristic of producing lactic acid as a main or sole product of fermentation during the homofermentative or heterofermentative metabolism (Balciunas et al., 2013). A host of current scientific papers report selections of LAB from different sources (for example, vegetables, milk and meat) for potential probiotic use (Table 1). Although LAB are generally regarded as safe (GRAS), their capability of producing toxic compounds must also be taken into account. Furthermore, the use of enterococci, part of the LAB community, is still controversial due to the presence of virulence genes in some species. For these reasons, toxicity and pathogenic determinants must be assessed (Landeta et al., 2013).

Pathogenicity

The selection of microorganisms for use as probiotics must consider that some species of LAB can be pathogenic and infective. Some species of LAB can cause human diseases such as tooth decay, rheumatic complications, infectious endocarditis, septicaemia and vascular disease.

The identification of potential pathogenic characteristics can facilitate the use of organisms for probiotic purposes (Harty et al., 1994). Most lactobacilli are non-pathogenic, so identification of inherent strain properties related to health risks can be difficult. Vesterlund et al. (2007) suggested studying the properties in probiotic strains that might indicate a potential health risk in populations and that are known virulence factors in 'true' pathogens; namely, the ability to adhere to immobilized human collagen type IV, fibrinogen or intestinal mucus, α - or β -haemolysis, low induction of the respiratory burst in peripheral blood mononucleocytes and resistance to serum-mediated killing.

Virulence factors

Bacterial virulence factors may include secreted proteins (for example protein toxins and enzymes), and cell-surface structures (for example capsular polysaccharides, lipopolysaccharides and outer membrane proteins) and further hydrolytic enzymes that may contribute

Table 1. Selection of LAB in different food matrix for potential probiotic use.

Source	Microorganism	Product elaborated	Reference
Cheese	<i>L. delbrueckii</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> and <i>Streptococcus thermophiles</i>	Cheese	Gaglio et al. 2014
Artisan cheese	<i>L. lactis</i> and <i>E. faecalis</i>	Fresh cheese	Coelho et al. (2014)
Traditional fermented yak milk	<i>E. durans</i> , <i>L. fermentum</i> and <i>L. paracasei</i>	Fermented milk	Ao et al. (2012)
Siahmazgi cheese	<i>L. plantarum</i>	Dry-fermented sausage	Kargozari et al. (2014)
Indonesian local beef	<i>L. plantarum</i>	Fermented lamb sausages	Arief et al. (2014)
Salami	<i>L. curvatus</i>	Salami	De Souza Barbosa et al. (2015)
Pork sausage	<i>L. plantarum</i>	Sausage	Dias et al. (2013)
Artisanal dry sausages manufactured	<i>L. curvatus</i>	Cooked pork meat	Rivas et al. (2014)
Chinese dry-cured hams	<i>L. salivarius</i>	Fresh pork	Luo et al. (2013)
Industrially fermented olives	<i>L. pentosus</i> and <i>L. plantarum</i>	Green olives	Blana et al. (2014)
kimchi	<i>L. brevis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>L. sakei</i>	Fermented sausage	Paik and Lee (2014)
Fermented caper berries	<i>L. plantarum</i>	Fermented caper	Palomino et al. (2014)
Infant faeces	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> and <i>L. rhamnosus</i>	Fermented sausages	Rubio et al. (2014)

to the pathogenicity of the microorganism. Many genes encode virulence traits (e.g. secretion machineries, siderophores, catalases, regulators, etc.) that are also indirectly involved in pathogenesis and are equally important for bacteria to establish infection (Brogden et al., 2000; Chen et al., 2005). The identification of virulence genes in a potential candidate probiotic is especially important, since the possibility of horizontal transfer to other bacteria has become a concern in the food industry (Perin et al., 2014).

Haemolysis is a common virulence factor among pathogens, facilitating iron availability to the microbe and causing anaemia and oedema in the host (Vesterlund et al., 2007). The haemolytic reaction is observed on blood agar supplemented with 5% defibrinated whole horse blood. A clear zone of hydrolysis around the colonies is indicative of β -haemolysis, a partial hydrolysis indicates α -haemolysis and no reaction indicates γ -haemolysis. The determination of haemolytic activity is required in recognition of the importance of assuring safety, even among a group of bacteria with GRAS status (FAO/WHO, 2002). The absence of haemolytic activity should be a selection criterion for starter strains for use in dairy products (Giraffa, 1995).

Regarding the safety of probiotic strains, antibiotic resistance is one aspect requiring analysis because of the serious concerns about the growing level of resistance to antibiotics in regular use in human medicine (Monteagudo-Mera et al., 2012). The antibiotic resistance genes can be passed by some LAB through conjugative plasmids, bacteriophages or transposons to other microorganisms by horizontal transfer. This type of transfer

commonly occurs between bacteria in the gastrointestinal tract, with the potential to occur between innocuous species and harmful pathogens. If beneficial *Lactobacillus* species have antibiotic resistance genes, then those genes could possibly be transferred to other microbiota, including pathogens, living in the same niche (the GIT) (Shao et al., 2015).

Selection criteria for probiotic microorganisms must include characteristics of intrinsic or natural resistance to antimicrobials because this is chromosomally encoded and, therefore, non-transmissible (Argyri et al., 2013). The intrinsic resistance of LAB to several antibiotics may be partially due to genes that encode multidrug resistance efflux pumps (MDR), which expel different types of antibiotics and other chemicals (dyes, organic solvents, detergents, biocides and metabolic products) (Muñoz et al., 2014). Four mechanisms are recognised that confer intrinsic resistance in bacteria to a given antibiotic: enzymatic inactivation or modification of the antibiotic, antibiotic removal by efflux pumps and outer membrane (OM) permeability changes, alteration of bacterial target sites and intracellular metabolic rearrangement. Most of these mechanisms have been observed and studied in various bacteria; however, no specific studies have dealt with these mechanisms in probiotics (LAB or *Bifidobacterium*) (Sharma et al., 2014).

The probiotic bacteria should not produce harmful substances during metabolic activities. One test is to determine whether the bacteria convert food components or biological secretions into secondary substances that are potentially harmful to the host. For example, some intestinal bacteria act on proteins and their digested

products to produce ammonia, indoles, phenols and amines (Ishibashi and Yamazaki, 2001). Toxic products such as biogenic amines can be derived from the decarboxylation of free amino acids arising from the catabolism of lactic acid; for example, by the decarboxylases enzymes of *Lactobacillus* spp. (Pereira et al., 2001). Excessive intake of these biogenic amines can have toxicological effects on human health, such as hypotension or hypertension, headache, nausea, allergic reactions, cardiac palpitation and even intracerebral haemorrhage and death in very severe cases (Shalaby, 1996). However, selected LAB strains can act as amine removers; for example, Zhang et al. (2013) used *Lactobacillus plantarum* to decrease the accumulation of biogenic amines in silver carp sausage and achieved a significant reduction. Thus, the production of biogenic amines should be considered in the selection of microorganism for potential probiotic use due to the potential for triggering disorders in the host health (Pereira et al., 2001).

The ability of the microorganism to produce D-lactic acid is reported as a selection criterion for probiotic strains; however, the strains should not produce quantities exceeding 2 g/l. The D isomer of this acid is not hydrolysed by human lactate dehydrogenase and can be damaging to health by triggering responses such as metabolic acidosis. Only strains that produce L-lactic acid isomer should be selected (Ammor et al., 2007; Ruiz-Moyano et al., 2009).

LAB play a role in reducing fat absorption by the body by lowering serum cholesterol through the activity of bile salt hydrolase (BSH), the enzyme responsible for bile salt deconjugation in the enterohepatic circulation (Anandharaj and Sivasankari, 2014). However, excessive metabolism of bile salts in the human small bowel can be detrimental, as secondary (dehydroxylated) bile salts are cytotoxic and co-carcinogenic, and can induce cellular lesions in the small intestine (Marteau et al., 1995). Begley et al. (2006) reported that microbial BSH activity may have various impacts on the host in the form of altered digestive functions, lowered cholesterol, cancer/activation of carcinogens and formation of gallstones. Thus, the desirability of BSH activity as a trait in a probiotic bacterium is not completely clear. Considering this aspect, the absence or limited extent of bile salt transformation capacity of bacteria added to food is suggested as a pre-requisite for labelling a product as GRAS (Marteau et al., 1995).

TECHNOLOGICAL CRITERIA

Viability during processing and storage

In Brazil, fermented milks must show viability of LAB and *Bifidobacterium* at the end of the product shelf life of at

least 10^7 and 10^5 CFU/g or mL, respectively (Brazil, 2007). In the preparation of fermented foods, probiotics show optimum growth at temperatures within 40-42°C; temperatures above 45-50°C during processing are detrimental to probiotic survival (Tripathi and Giri, 2014). The viability during operations, storage and processing, the survival during intestinal transit and the health benefits for consumers are the main criteria for the selection of appropriate strains of probiotic bacteria (Talwalkar et al., 2004). The physiological state of the probiotic cultures added to a product can also be a major factor affecting the overall culture viability. In this respect, the induction of stress responses in probiotic strains can have a dramatic effect on the ability of the cultures to survive processing (such as freeze drying and spray drying) and gastric transit (Ross et al., 2005).

Acid stress may significantly affect the viability of a culture (Shah, 2000). Consequently, dairy products are preferred for use as carriers of probiotic strains for enhancement of microbial survival in gastric juice, likely due to a buffering or protective effect (Ross et al., 2005). In general, *Bifidobacterium* cultures are less acid tolerant than *Lactobacillus* cultures and this is reflected by their reduced tolerance to human gastric juice. Tolerance to an acidic environment may also be a useful predictor of technological performance in fermented foods (Ross et al., 2005; Mättö et al., 2006).

Many other factors influence the viability of probiotic microorganisms in food products during production, processing and storage. Identified factors include food parameters (molecular oxygen, water activity, presence of salt, sugar and chemicals like hydrogen peroxide, bacteriocins, artificial flavouring and colouring agents), processing parameters (heat treatment, incubation temperature, cooling rate of the product, packaging materials and storage methods, and scale of production) and microbiological parameters (strains of probiotics, rate and proportion of inoculation) (Tripathi and Giri, 2014).

Oxygen content and redox potential are also important factors for the viability of probiotic species (micro-aerophilic and anaerobic) during storage (Shah, 2000). In the presence of oxygen, lactic acid bacteria are able to generate more hydrogen peroxide via the action of flavoprotein-containing oxidases, nicotinamide adenine dinucleotide oxidases (NADH) and superoxide dismutase (SOD) than they do under anaerobic conditions (Miller and Britigan, 1997; Kulisaar et al., 2002). Overall, oxygen affects probiotics in three ways: (i) it is directly toxic to some cells, (ii) certain cultures produce toxic peroxides in the presence of oxygen, and (iii) free radicals produced from the oxidation of components (e.g., fats) are toxic to probiotic cells (Korbekandi et al., 2011; Tripathi and Giri, 2014). One solution is the addition of ascorbic acid (vitamin C), which can act as an oxygen scavenger (Shah, 2000).

Another factor that may affect the viability of probiotics

is freezing. The freezing step in food processing is especially critical as it negatively affects both viability and physiological state of the bacteria. Lowering the temperature affects the structure and the properties of the cellular membrane. During freezing, the liquid phase moves to a liquid-crystalline phase, thereby reducing membrane fluidity. The formation of ice crystals induces mechanical damage that leads to cellular death. In addition, the crystallization of water leads to a cryo-concentration of the solutes, which induces some osmotic damage (McGann, 1978; Foschino et al., 1996; Beal et al., 2001). However, the ability of lactic acid bacteria to survive freezing and storage differs with strain (Fonseca et al., 2000). Fonseca et al. (2000) demonstrated that small spherical cells of enterococci are more stable during freezing and freeze-drying as compared to the large rods of lactobacilli. Senz et al. (2015) reported that short rods were significantly more stable than elongated rods during freeze-drying because the cell membrane damage increased with the enhanced cell surface area due to extracellular ice crystal formation during freezing. The addition of various protective compounds to probiotic cultures can improve their viability during manufacture: examples include glucose to energize cells upon exposure to acid (Corcoran et al., 2005) and cryoprotectants such as glycerol or inulin to improve survivability during freeze-drying (Fonseca et al., 2000; Carvalho et al., 2004).

Phage resistance

Bacteriophages are a consistent and major threat to food fermentations, and particularly dairy fermentations, where infection of starter cultures may result in slow vats, low quality, inconsistent products and even complete fermentation failure (Whitehead and Cox, 1935; Mahony and Sinderen, 2014). Phages infecting LAB provide some of the most advanced model systems for (tailed) phage-host interactions (Mahony and Sinderen, 2014). In recent years, a number of strategies based on strain diversity, bacteriophage-insensitive mutants, and plasmids bearing phage-resistance mechanisms (Barrangou et al., 2007) were designed and implemented to minimize both the presence of phages in the dairy industry and their economic impact on fermentation processes (Briggiler-Marcó et al., 2014).

Bacteria have developed a variety of natural defence mechanisms that target diverse steps of the phage life cycle, notably blocking adsorption, preventing DNA injection, restricting the incoming DNA and abortive infection systems (Barrangou et al., 2007). Briggiler-Marcó et al. (2011) used two methodologies to isolate phage-resistant mutants: the agar plate (AP) and the secondary culture (SC) methods. Characterization of the phage resistance phenotype, genetic analysis and

characterization of phage-resistant mutants identified a mutant MC4 that can be used in the manufacture of fermented milk.

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) are hypervariable loci widely distributed in bacteria and archaea that provide acquired immunity against foreign genetic elements. CRISPRs represent a family of DNA repeats which typically consist of short and highly conserved repeats, interspaced by variable sequences called spacers, and are often times adjacent to *cas* (CRISPR-associated) genes (Sorek et al., 2008; Horvath et al., 2009). The CRISPR-*cas* system may accordingly be exploited as a virus defence mechanism and also potentially used to reduce the dissemination of mobile genetic elements and the acquisition of undesirable traits such as antibiotic resistance genes and virulence markers. From a phage evolution perspective, the integrated phage sequences within CRISPR loci may also provide additional anchor points to facilitate recombination during subsequent phage infections, thereby increasing the gene pool to which phages have access (Barrangou et al., 2007). CRISPR loci appear to be a key distinguishing feature in LAB, from a phylogenetic and genome evolutionary standpoint. The ability of the CRISPR system to provide immunity against foreign genetic elements is essential and actively involved in the microbe's propensity to survive phage predation and to adapt to its environment (Horvath et al., 2009).

Contribution of sensory properties to foods

LAB are not considered as strongly proteolytic bacteria; however, a part of their proteolytic system has been extensively explored for the last few decades because it is essential for the optimal growth of LAB in milk (Lopez-Kleine and Monnet, 2011). Intra- and inter-specific variability in acid production, autolysis and proteolysis are commonly reported for strains from natural sources (Franciosi et al., 2009).

Proteolysis is considered one of the most important biochemical processes involved in the manufacture of many fermented products. In cheese manufacture, the proteolysis of casein is thought to play a pivotal role because amino acids resulting from proteolysis are the major precursors of specific flavour compounds, such as various alcohols, aldehydes, acids, esters and sulphur compounds. Bitterness, which results from the accumulation of hydrophobic peptides (peptides rich in proline), is a serious quality concern facing the manufacture of Gouda and Cheddar cheeses (Smukowski et al., 2003; Smit et al., 2005; Savijoki et al., 2006). The correlation between the starter culture and the flavour of fermented sausages has been well established (Sidira et al., 2015). A number of potential precursors are responsible for the

flavour and odour, which may be produced by lipid hydrolysis and autoxidation, proteolysis and transformation of amino acids to aromatic compounds and carbohydrate metabolism (Ammor et al., 2007). Sah et al. (2014) showed that probiotics with proteolytic activity increased the generation of peptides with antioxidant potential and antimutagenic properties. Screening for proteinases, peptidases and aminopeptidases activities is therefore recommended.

Exopolysaccharides (EPS) are biopolymers with wide distribution in nature. Their occurrence is well documented in all organisms (viz. animals, plants, fungi and bacteria) and they are involved in various biological functions such as storage of energy (starch), cell wall architecture (cellulose) and cellular communication (glycosaminoglycans) (Badel et al., 2011). Microbial EPS produced by LAB are receiving increasing attention because of their GRAS status (Ahmed et al., 2013; Li et al., 2014). The EPS can be used as food additives to improve texture, which aids the development of new food products with improved appearance, stability and rheological properties (De Vuyst et al., 2001).

Lactobacillus produces EPS molecules in relatively large amounts (>100 mg/l), predominantly in media containing glucose. The viscosity and biological activity of an EPS depends on its molecular weight, sugar composition and primary structure (Kodali et al., 2009). The EPS can perform functions that go beyond technological characteristics; for example, Liu et al. (2010) and Nikolic et al. (2012) observed that EPS secreted by probiotic bacteria such as *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus paraplantarum* have immunomodulatory capacity, immunosuppressive and anti-inflammatory actions.

Antitumor effects, reduced blood cholesterol and enhanced colonization of probiotic bacteria in the gastrointestinal tract have also been observed (Welman and Maddox, 2003). EPS may function as part of a defence mechanism against bacteriophages by preventing their adsorption (Lamothe et al., 2002).

LAB have evolved mechanisms to support various concentrations of NaCl that generally involve the absorption or synthesis of a limited number of solutes (Bremer and Kraemer, 2000). Ge et al. (2011) reported that osmotic stress may become the major inhibiting factor for bacterial growth and fermentation. Reale et al. (2015) added information on intra-species variability in osmotolerance in *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* and highlighted that osmotolerance is an important criterion for the selection of strains for technological applications. In particular, several strains isolated from cheese and human faeces appeared to be very tolerant of high NaCl concentrations and are worth investigating for their performance in fermented foods. Ammor et al. (2007) also affirmed that the ability of a starter culture to compete

with the natural microbiota of a raw material (sausage) and to undertake the expected metabolic activities is conditioned by its growth rate and survival in the conditions prevailing in the sausage, including rather high salt concentrations ranging from 2 to 15% in the final product.

Gas production by LAB may be required in some products, such as kefir and some cheeses like Gouda, Edam and Danbo (Leite et al., 2013; Pedersen et al., 2013). Gas production can increase the number and/or size of holes in semi-hard cheeses. Eye formation in cheese is a complex process that is influenced by a number of factors such as gas formation, gas diffusion, the presence of eye-forming nuclei, pH and elasticity of the cheese body, as well as technological parameters (Fröhlich-Wyder et al., 2013). Tammam et al. (2001) reported that the anaerobic production of CO₂ by lactobacilli prevails in cheese. In contrast, heterofermentative LAB are not suitable for sausage production because the formation of large amounts of carbon dioxide which leads to holes of different sizes in the product. In addition, these LAB produce concentrations of acetic acid that causes a pungent off-flavour (Buckenhüskes, 1993; Ammor et al., 2007).

Aroma compounds play a major role in the perception of flavour, which is an important property for consumer choice of food products (Yee et al., 2014). Diacetyl (2,3-butanedione) is a volatile product of citrate metabolism produced by lactic acid bacteria, and when taken in conjunction with the lactic acid and textural effects, enhances the sensorial profile of fermented foods (Rincon-Delgado et al., 2012; Xião and Lu, 2014). It can also inhibit pathogenic microorganisms by penetrating the targeted bacterial membranes and interfering with essential metabolic functions (Hor and Liong, 2014). High diacetyl levels are associated with a flavour imbalance, bitter taste and harsh aroma (Clark and Potter, 2007), but it is used as an ingredients in the formulation of many food products such as cottage cheese, margarine, vegetable oil spreads, processed cheese and sour cream to increase the levels of the naturally occurring buttery aroma associated with fermentation (Rincon-Delgado et al., 2012).

FUNCTIONAL CRITERIA

GIT tolerance

Some LAB possess probiotic properties beneficial to human health. However, both gastric acid and bile salt have adverse influences on the survival and viability of ingested probiotics. Most microbes have a low rate of survival and viability in acidic conditions, such as those occurring in the human gastric environment, where pH values range from 1.5 to 3.5 (Huang et al., 2014).

Probiotic strains must be able to survive high concentrations of lysozyme in human saliva, the acid stress conditions and digestive enzymes (pepsin) of the stomach, and the bile in the upper intestine (Corzo and Gilliland, 1999; Marco et al., 2006; Liu et al., 2013). Acid resistance and bile tolerance are considered the basic criteria for screening potential probiotic strains (Liu et al., 2013; Ren et al., 2014), and these features are the focus of several papers on the screening of potential probiotic strains. For example, *Lactobacillus* strains were found resistant to acidic conditions for 3 h, pH 2.5, and strains isolated from food samples were able to grow at a physiological concentration of bile for incubation periods of up to 4 h (Federici et al., 2014). *L. plantarum* N8, N9, ZL5 and *L. casei* ZL4 were resistant to simulated intestinal juice (Wang et al., 2014). *L. acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in goat milk showed higher tolerance to simulated gastric fluid when tested in combination, suggesting a synergistic effect between strains (Ranadheera et al., 2014). *L. fermentum*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* were able to grow in intestinal juice, and possibly showed a better resistance to bile acid at the beginning of the small intestine (Rubio et al., 2014).

The capacity of lactobacilli to survive at low pH remains controversial (Ren et al., 2014). Mechanisms that may contribute to an adaptive acid tolerance response include the induction of a new pH homeostasis system and the synthesis of a new set of proteins known as stress proteins. Stress proteins can be transiently or constitutively produced and contribute to the adaptive acid tolerance response. Proteins induced after heat shock, including the chaperonin class proteins DnaK and GroEL, have shown homology with proteins produced during acid shock. These proteins are capable of refolding heat-denatured proteins into their native states and can protect proteins from denaturation during cellular stress (Foster, 1993; Shah, 2000). Further, acid tolerance of microorganisms involves multiple genes and mechanisms of protection and regulation (Patnaik et al., 2002; Ye et al., 2013).

Ye et al. (2013) reported that an error-prone whole genome amplification technique was successful in improving the acid tolerance of *L. pentosus*. The possible mechanisms for the increased acid tolerance of the generated mutants included decreased membrane conductivity to protons, increased proton extrusion or an increased buffering capacity of the cytoplasm.

Resistance to bile salts is also an important property for probiotic strains (FAO/WHO, 2002). Ren et al. (2014) affirmed that the most bile-tolerant strains are strongly conducive for relieving the symptoms of lactose intolerance. This statement is in agreement with the study of Noh and Gilliland (1993), who asserted that the permeability of cells of *L. acidophilus* increases in presence of bile, thereby permitting more substrate to enter

the cells and increasing the β -galactosidase activity of whole cells.

The bile tolerance by LAB shows a generally greater sensitivity to the deleterious effects of bile in Gram-positive than in Gram-negative bacteria. However, conditions encountered in the external environment or in the host prior to entry into the small intestine will determine the effects of bile on a strain. Exposure to various pH levels, temperatures and growth atmospheres may either "harden" bacteria to the effects of bile or alternatively increase their susceptibility. The presence of food in the intestine may also affect survival, as bacteria may not be exposed to bile in certain microenvironments created by the food matrix or food constituents may even bind bile acids and prevent them from exerting toxicity. Pre-exposure of bacteria to low bile acid levels may increase their tolerance to high levels. Pre-exposure to one stress may also confer protection against other stresses, a phenomenon termed cross-adaptation. Many stresses have similar effects on cellular physiology and may well cause induction of the same set of stress proteins. Many stress management response systems may possibly overlap and be interconnected (Begley et al., 2005). Therefore, the acid and bile tolerance in probiotic strains could likely involve similar mechanisms.

Adherence to the intestinal epithelial cells

The probiotic adhesion process involves various biophysical and biochemical properties of both probiotics and epithelial cell layers. These include electrostatic interactions, passive and steric forces, hydrophobicity, autoaggregation capacity and specific cellular structures such as external appendages. These properties vary among the probiotic strains and are reported as species-specific characteristics (Schillinger et al., 2005; Collado et al., 2007; Ranadheera et al., 2014). Apart from surviving the passage into the gastrointestinal tract, the probiotic microorganisms must also be able to adhere and to colonize the intestinal epithelium in order to compete with pathogenic organisms (Monteagudo-Mera et al., 2012; Ranadheera et al., 2014). This competition can result in exclusion (Tuomola, 1999), thereby reducing the risk of diseases arising from pathogenic organisms (Chapman et al., 2014) and making this an important selection criterion.

Strains of *L. reuteri* showed a high adherence capacity that could possibly enhance the epithelial barrier *in vitro* within 24 h (Jensen et al., 2012). *L. pentosus* E108, *L. plantarum* B282 and *L. paracasei* subsp. *paracasei* E94 showed good adhesion to Caco-2 cells (Argyri et al., 2013), while *L. casei* 12668-1 and *E. faecalis* 18156-3 showed strong adhesion ability to intestinal cells (Federici et al., 2014). *P. pentosaceus* CIAL-86 showed excellent adhesion and good anti-adhesion activity against

Escherichia coli CIAL-153 (García-Ruiz et al., 2014).

Strains of *L. plantarum* N8, N9, ZL5 ZL4 and *L. casei* were able to exert a significant *in vitro* inhibitory activity against *Campylobacter jejuni* and effectively inhibited the adhesion and invasion of HT-29 cells by *C. jejuni* (Wang et al., 2014). The adhesion ability of *Lactobacillus* probiotics could promote good residence time in the intestine, exclusion of pathogens and interaction with host cells to protect epithelial cells and induce immune modulation (Ouweland et al., 1999).

The difficulties of studying bacterial adhesion *in vivo* led to the development of *in vitro* models for preliminary studies of adherent strains (Vesterlund et al., 2005). Tests such as hydrophobicity and autoaggregation are performed because these cell surface traits are considered necessary for adhesion. These traits facilitate temporary colonization as well as protection of the host system because of the biofilm formation over the host tissue. Some studies have shown that hydrophobicity and autoaggregation are important for promoting the colonization of probiotics in ecological niches such as the intestinal tract or the urogenital tract (Pelletier et al., 1997; Del Re et al., 2000; Giaouris et al., 2009).

Cell surface hydrophobicity is one of the physicochemical properties that facilitate the first contact between the microorganism and the host cells (Schillinger et al., 2005). The initial and reversible contact stage is mediated by a complex of physicochemical interactions, including hydrophobicity and charges, which are ubiquitously thought to be nonspecific but important properties (Pelletier et al., 1997). Isolates that exhibit high hydrophobicity values are associated with high capacity for autoaggregation and adherence to Caco-2 cells (Kotzamanidis et al., 2010). *Lactobacillus* that showed an affinity for an apolar solvent above 40% generally presented more elevated hydrophobic characteristics (Giaouris et al., 2009). Dias et al. (2013) and Ren et al. (2014) reported *Lactobacillus* strains with high hydrophobicity of 59% and 54.75%, respectively.

The autoaggregation and coaggregation of probiotics are necessary processes for the occurrence of adhesion to the intestinal epithelium and the formation of barriers that prevent colonization by pathogenic microorganisms (Del Re et al., 2000). Aggregation is a phenotype related to cell adherence properties (Pelletier et al., 1997; Kos et al., 2003). According to Del Re et al. (2000), strains with values lower than 10% are designated as non-autoaggregating. Strains of *L. salivarius* and *L. plantarum* showed high capacity for autoaggregation (Ren et al., 2012). *L. salivarius* subsp. *salicinius*, *L. acidophilus* and *L. plantarum* showed relatively high values for autoaggregation (46, 45 and 34%, respectively) as compared to the reference *L. rhamnosus* strain (33%) (Ren et al., 2014). Four isolates of *Lactobacillus* showed autoaggregation values higher than 90% (Bautista-Gallego et al., 2013).

The coaggregation abilities of the *Lactobacillus* species with potential pathogens might prevent the colonization of the gut by pathogenic bacteria (Bao et al., 2010). Thus, probiotic strains should show the ability to coaggregate with the pathogenic strains tested, but the percentage of coaggregation is strain-specific (Collado et al., 2007). In general, lactobacilli have a higher coaggregation with *Listeria monocytogenes* (Dias et al., 2013). This property may be related to the formation of mixed species biofilms, as reported by Veen and Abee (2011) for *L. monocytogenes* and *Lactobacillus*.

PHYSIOLOGICAL DESIRABLE CRITERIA

Probiotics can improve the function of the immune system and general health of the host. This review examines the main effects of physiologically desired criteria for a probiotic strain. Some of the health effects are listed in Table 2.

Lactose intolerance

Primary lactose malabsorption, which is accompanied by a continuous drop in lactase activity during childhood and adolescence and hypolactasia in adulthood, is a normal physiological process in humans. It can result in gastrointestinal discomfort after consuming lactose-containing products, a condition called lactose intolerance (LI).

Symptoms can be unpleasant and include abdominal pain, bloating, flatulence and diarrhoea. Some dairy products, like cheese, contain little or no lactose, whereas yoghurt is often better tolerated than milk (De Vrese, 2014; Kies, 2014). The European Food Safety Authority (EFSA) gave a positive opinion on lactose-reduced foods, the use of lactase-enzyme as a dietary supplement and yoghurt containing viable yoghurt-bacteria (Kies, 2014). The ability of microorganisms to ferment the lactose in milk is an important technological property (Zárate and Chaia, 2012). Accordingly, many studies have focused on the metabolism of lactose to potentially probiotic microorganisms (Iqbal et al., 2010; Rhimi et al., 2010; Zárate and Chaia, 2012).

The lactose-hydrolysing enzyme β -galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23) is an enzyme that catalyses the hydrolysis of lactose (a disaccharide found abundantly in milk) to glucose and galactose (Ustok et al., 2010). Possible sources of the enzyme are plants, animal organs, bacteria, yeasts, fungi and moulds. Amongst these, the microbial sources are clearly preferable and are mostly used for both reactions because of their ease of fermentative production, high activities and generally good stability. β -Galactosidase has long been used as an important biocatalyst in the dairy

Table 2. Some of the beneficial effects on the health of the host and mechanisms of probiotic strains reported in scientific studies.

Health effect	Mechanism	Authors
Relief lactose intolerance	Action of the enzyme β -galactosidase	De Vrese et al. (2014)
Treatment and prevention of allergy	Pre-hydrolyzing β -lactoglobulin	Pescuma et al. (2015)
Decline in risk associated with tumor development	Decreased levels of enzymes: β -glucuronidase, azoreductase, nitroreductase and activation of pro-carcinogens	Vasiljevic and Shah (2008)
Hypocholesterolemic effect	BSH activity	Peres et al. (2014)
Inhibition of <i>Helicobacter pylori</i> and intestinal pathogens	Secretion protein components or organic acid, decreases the ability of adhesion of <i>H. pylori</i> to gastric epithelial cells, reduces inflammation of the mucosa, and stabilizes the gastric barrier.	Kabir et al. (1997); Zheng et al. (2014)
Intestinal immunomodulating effect	β -Supra-regulation of IL-6 in the cecum	Lähteinen et al. (2014)
Decreased HIV infection	Exposure of the CD4 receptor by lactobacilli cells by inhibition of HIV-1	Su et al. (2013)

industry as well as in synthetic glycochemistry (Iqbal et al., 2010). β -Galactosidases produced by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 77 were characterized as stable at the pH range of 7-9 and the temperature range of 20-37°C, retaining 80-90% of their initial activities. As a result, these enzymes could be considered as potential candidates for the hydrolysis of lactose in milk and milk products (Ustok et al., 2010).

Rhimi et al. (2010) conducted a study where the gene encoding β -galactosidase from the dairy *S. thermophilus* strain LMD9 was cloned, sequenced and expressed in *E. coli*. The purified recombinant enzyme was a powerful biocatalyst for the lactose from whey extract, which is a cheap source of D-galactose and D-glucose. The relevant importance is seen when one considers that these monosaccharides are used in the production of low-calorie or hypocaloric sweeteners. Moreover, this protein efficiently cleaves lactose in milk, and may thus aid in overcoming the lactose intolerance problem generated by milk products. The LI disease affects nearly 70% of the world population, so the consumption of treated products can be a good way to incorporate dairy foods and nutrients into the diets of individuals with lactose intolerance (Vasiljevic and Shah, 2008; Kailasapathy, 2013).

Prevention and reduction of diarrhoea

Disruption of intestinal microbiota by antibiotics is a major risk factor for diarrhoea and colonization by *Clostridium difficile* (Lawley et al., 2012). This is a common complication for most types of antibiotics, especially broad spectrum antibiotics such as clindamycin, beta lactams and 3rd generation cephalosporins. Rates of *C.*

difficile infection have increased worldwide over the years (McFarland, 2009).

Probiotics have several beneficial health applications, such as reduction of colonization of pathogens (Vandenplas et al., 2014). Diarrhoea can be prevented by interrupting one of the potential contributing mechanisms: competition to inhibit the related receptor for growth of pathogens (nutrients, adhesion site), production of defensin or bacteriocin, reduction of the pH of the gut and stimulation of the host immune system (Ng et al., 2009). The effectiveness of probiotics is specific to the species and strain of disease, so the chosen probiotic strain should be linked to the disease (McFarland, 2009).

Studies with strains of *L. plantarum*, *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in BALB/c mice have shown their importance in strengthening the colonization resistance of the faeces bacteria, suppressing proliferation of opportunistic pathogens (including enteric bacterium and *Enterococcus*) and restoration of the microbiota balance (Tian et al., 2014). A mixture of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Lc. lactis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* was tested in an animal model of infection by *C. difficile* and demonstrated the ability to prevent diarrhoea and enterocolitis triggered by *C. difficile* (Bolla et al., 2013).

Prevention of inflammatory bowel disease

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the two major forms of inflammatory bowel disease (IBD) and both diseases lead to high morbidity and health care costs (Reiff and Kelly, 2010). Evidence suggests that an abnormality in the response of the innate and adaptive immunity plays an important role in intestinal inflammation (Liu, 2009). Probiotic cultures may reduce the relapse of

the disease after treatment with steroids and/or surgery. Thus, the presence of a diverse microbial population in the gastrointestinal tract and changes that occur during IBD provide adequate support for the use of probiotics in the treatment of this disease (Fedorak and Demeria, 2012).

Huang et al. (2013) reported *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *L. plantarum* K68 isolated from *fu-tsai*, a traditional fermented food in Taiwan. *L. plantarum* K68 ameliorated dextran sulphate sodium induced UC in BALB/c mice through its anti-inflammatory and immunomodulatory activities and may be effective in treating other inflammatory diseases. Juarez et al. (2013) also reported a beneficial effect of *L. reuteri* CRL1101 in decreasing tumor necrosis factor alfa (TNF- α) production in lipopolysaccharide-treated macrophages, indicating it to be a candidate probiotic for the prevention and control of systemic inflammatory diseases.

Prevention of allergies

The use of probiotics in treatment and prevention of allergies, allowing an adequate stimulation of the immune system, is once again an attractive proposition. Several authors have reported promising results that clearly support the efficacy of probiotics in the prevention of some allergic diseases, thereby justifying experimental trials with a focus on selection of strains to be used and the time of administration of these probiotics (Pelucchi et al., 2012).

Prescott and Bjorkstén (2007) affirmed that allergic disease results from a fundamental failure of underlying immune regulation. Microbial exposure arguably provides the strongest environmental signal for normal postnatal maturation of the immune system and also induces the maturation of antigen presenting cells and T-regulatory cells, which are essential for programming and regulating the T-cell response.

Lactobacillus rhamnosus GG reduced the prevalence of atopic eczema in children (Rautava et al., 2002). Specific probiotics may modulate early microbial colonization, which represents the first intervention target in allergic disease, together with their ability to reverse the increased intestinal permeability characteristics in children with atopic eczema and food allergy. Probiotics also enhance gut-specific IgA responses, which are frequently defective in children with food allergy. In addition, probiotics have the potential to alleviate allergic inflammation both locally and systemically.

However, unfortunately, contradictory results among studies do not currently allow a recommendation for probiotic use in the prevention of allergy. These contradictions arise from study variations such as the type of population studied in terms of age, type of allergic

disease, disease stage, number of patients included, genetic background, environment (Butel, 2014). Therefore, a cautionary note should be made amidst the continuing public enthusiasm for probiotics until the results are more conclusive (Prescott and Bjorkstén, 2007).

Probiotics and *Helicobacter pylori*

H. pylori is a pathogenic intestinal agent that causes infection over time, which can trigger chronic gastritis and peptic ulcer, and increase the risk of gastric malignancies. Probiotics do not seem to eliminate the population of *H. pylori*, but they can reduce the inflammation associated with these bacteria in both animals and humans (Vasiljevic and Shah, 2008; Kailasapathy, 2013).

A recombinant *L. lactis* expressing Urease B could serve as an antigen-delivering vehicle for the development of an edible vaccine to control *H. pylori* infection. Urease is an important virulence factor that is required for colonisation of the gastric mucosa by *H. pylori* as it catalyses the conversion of urea into ammonium and CO₂, thereby raising pH close to neutrality. Urease B is an effective and common antigen of *H. pylori* and it has been widely investigated as a potential antigen for the development of prophylactic and therapeutic vaccines against *H. pylori* infection (Del Giudice et al., 2001; Zhang et al., 2014).

LAB increases the eradication rate of *H. pylori* infection. They inhibit *H. pylori* growth through secretion of protein components or organic acid, decrease the adherence capacity of *H. pylori* to gastric epithelial cells, reduce mucosal inflammation and stabilize the gastric barrier (Kabir et al., 1997; Zheng et al., 2014). Zheng et al. (2014) reported that *L. pentosus* LPS16 had a broad spectrum action against *H. pylori*.

Modulation of the immune system

Probiotic cultures may influence the body's immune function. Evidence from *in vitro* systems and animal and humans models suggests that these microorganisms can increase both specific non-specific immune responses, possibly by the activation of macrophages, increased levels of cytokines, increased activity of natural killer cells and/or increased levels of immunoglobulins (Singh et al., 2011; Kailasapathy, 2013).

Lee et al. (2011) evaluated the activity of selected probiotic lactobacilli on immune function by measuring lymphocyte proliferation and IFN- γ . Strains of *L. gasseri* and *L. plantarum* induced higher release of interferon- γ cytokines. *L. fermentum* LA12 and *L. plantarum* (CJMA1, CJLP56, CJLP133, CJLP243, BJ53 and CJNR26) were

more effective at inducing lymphocyte proliferation than the positive control. These strains were characterized as beneficial in terms of immune modulation.

A popular Brazilian fresh cheese (Minas Frescal cheese) containing *L. acidophilus* LA14 and *Bifidobacterium longum* BL05 was fed for 2 weeks to adult Wistar rats. The authors concluded that this probiotic cheese may be a viable alternative to for enhancing the immune system and could be used to prevent infections, particularly those related to the physical overexertion of athletes (Lollo et al., 2012).

Kotzamanidis et al. (2010) affirmed that *L. reuteri* DC421, *L. rhamnosus* DC429 and *L. plantarum* 2035 strains exhibited regulatory activity of early immune responses in both air pouches and intestines that was characterized by stimulation of polymorphonuclear chemotaxis, phagocytic activity, combination of TLR2/TLR4/TLR9 signalling and secretion of a certain cytokine profile. The activation of these specific immune responses by these non-pathogenic microorganisms aids in achievement of homeostasis and provides the healthy host with a higher capacity to resist any inflammatory response.

Reducing the risk associated with mutagenicity and carcinogenicity

Antigenotoxicity, antimutagenicity and anticarcinogenicity are potential functional properties of probiotics that have received much attention recently. Substantial evidence has been obtained from *in vitro* and animal model studies that support significant anticancer effects of probiotics (Kailasapathy, 2013; Serban, 2014). Genotoxic substances or environmental or autochthonic agents generated within the body can induce genetic changes or damage, leading to mutations and carcinogenesis (Wogan et al., 2004). The best candidates as antimutagens could be natural dietary components, including LAB (Ambalam et al., 2011).

Butyrate is generated from lactate formed by LAB and *Bifidobacterium* (Duncan and Flint, 2013). Butyrate exerts potent effects on a variety of colonic mucosal functions such as inhibition of inflammation and carcinogenesis, reinforcement of various components of the colonic defence barrier and decreasing oxidative stress. In addition, butyrate may promote satiety (Hamer et al., 2008). *L. plantarum* and *Bifidobacterium Bb12* have intrinsic antigenotoxic potential and may have protective effects against the early stages of colon cancer (Burns and Rowland, 2004).

A *L. rhamnosus* (Lr 231) strain isolated from human faeces possesses the ability to bind with acridine orange (AO), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]-quinoxaline (MeIQx) but not 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD), indicating a

variation in binding and antimutagenic activity. Instantaneous binding of AO and MNNG by Lr 231 can assist in the rapid removal of mutagens and may thereby prevent their absorption in the intestine. The binding of MNNG and MeIQx by Lr 231 results in a modification of the spectrum of mutagenic agents, implying residual dysmutagenesis associated biotransformation and subsequent detoxification of mutagenic agents. Thus, a potential probiotic human strain of Lr 231 possesses the ability to bind, biotransform and detoxify mutagens, and this property can be useful in formulating fermented foods for removal of potent mutagens (Ambalam et al., 2011).

Sah et al. (2014) reported that probiotic organisms had a statistically significant effect on proteolytic activity that enhanced the generation of peptides with potential antioxidant and antimutagenic properties, with good correlation between proteolytic and antioxidant or antimutagenic activities. The peptides generated by milk fermentation with *Lactobacillus* strains may contribute a variety of bioactive compounds that can have a positive effect on human health and could be applied commercially in new products or in the production of new anticancer peptides.

CONCLUSION

Probiotic strains can be selected from different environments and food matrices for incorporation into various food products, thereby increasing food functionality and promoting beneficial effects on consumer health. However, these effects require rigorous selection criteria for the establishment of probiotic strains that are safe and functional and that have desirable technological and physiological characteristics. Some screening methods were discussed in this review. Although knowledge has been gained from the existing trials and scientific publications, human studies are still needed to elucidate the mechanisms of interaction between strains and host, since probiotic effects may be strain specific.

Abbreviations: LAB, Lactic acid bacteria; GIT, gastrointestinal tract; GRAS, generally regarded as safe; CFU, colony forming units; MDR, multidrug resistance; OM, outer membrane; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; BSH, bile salt hydrolase; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide oxidases; SOD, superoxide dismutase; AP, agar plate; SC, secondary culture; EPS, exopolysaccharides; EFSA, European Food Safety Authority; CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis; IBD, inflammatory bowel disease; TNF- α , Tumor necrosis factor alfa; NPD, 4-nitro-o-phenylenediamine, MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; MeIQx, 2-amino-3,8-dimethylimidazo-

[4,5-f]-quinoxaline; AO, acridine orange.

Conflict of interests

The authors have not declared any conflict of interest.

REFERENCES

- Ahmed Z, Wang Y, Anjum N, Ahmad A, Khan ST (2013). Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II. *Food Hydrol.* 30(1):343-350.
- Ambalam P, Dave JM, Nair BM, Vyas BRM (2011). *In vitro* mutagen binding and antimutagenic activity of human *Lactobacillus rhamnosus* 231. *Anaerobe* 17(5):217-222.
- Ammor MS, Flórez AB, Mayo B (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 24(6):559-570.
- Anandharaj M, Silvasankari B (2014). Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *J. Biosci. Bioeng.* 118(2):153-159.
- Ao X, Zhang X, Zhang X, Shi L, Zhao K, Yu J, Dong L, Cao Y, Cai Y (2012). Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products. *J. Dairy Sci.* 95(3):1073-1084.
- Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ, Tassou CC (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* 33(2):282-291.
- Arief II, Wulandari Z, Aditia EL, Baihaqi M (2014). Physicochemical and microbiological properties of fermented lamb sausages using probiotic *Lactobacillus plantarum* IIA-2C12 as starter culture. *Procedia Environ. Sci.* 20(1):352-356.
- Babot JD, Argañaraz-Martínez E, Saavedra L, Apella MC, Perez Chaia A (2014). Selection of indigenous lactic acid bacteria to reinforce the intestinal microbiota of newly hatched chicken - relevance of *in vitro* and *ex vivo* methods for strains characterization. *Res. Vet. Sci.* 97(1):8-17.
- Badel S, Bernardi T, Michaud P (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotech. Adv.* 29(1): 54-66.
- Balciunas EM, Martínez FAC, Todorov SD, Franco BDGM, Conventi A, Oliveira RPS (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32(1):134-142.
- Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, Yong L, Shuiquan W, Ximei D, Yanyan W, Zhang H (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy Food Control products. *Food Control* 21(5):695-701.
- Barbosa J, Gibbs PA, Teixeira P (2010). Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control* 21(5):651-656.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Sci.* 315(5819): 1709-1712.
- Bautista-Gallego J, Arroyo-López FN, Rantsiou K, Jiménez-Díaz R, Garrido-Fernández A, Coccolin L (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Res. Int.* 50(1):135-142.
- Beal C, Fonseca F, Cornieu G (2001). Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* 84(11): 2347-2356.
- Begley M, Gahan CGM, Hill C (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(4):625-651.
- Begley M, Hill C, Gahan CCM (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(3):1729-1738.
- Blana VA, Grounta A, Tassou CC, Nychas GJE, Panagou EZ (2014). Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiol.* 38(1):208-218.
- Bolla PA, Carasi P, Bolla MDLA, De Antoni GL, Serradell MDLA (2013). Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 21(1):28-33.
- Brazil (2007). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa n°46, from November 24th. Aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União, Nov 24, 2007. Available at <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=INM&numeroAto=00000046&seqAto=000&valorAto=2007&orgao=MAPA&codTipo=&desitem=&desitemFim=> Accessed September 10, 2014. (Online).
- Bremer E, Kramer R (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In Storz G, Hengge-Areolis R (Eds.), *Bacterial stress response*. ASM Press, Washington, D.C.
- Briggiler-Maró M, Mercanti D, Reinheimer JA, Quiberoni A (2011). Performance of spontaneous phage-resistant derivatives of *Lactobacillus plantarum* in fermented milk manufacture. *Int. Dairy J.* 21(11):857-862.
- Briggiler-Maró M, Zacarias MF, Vinderola G, Reinheimer JA, Quiberoni A (2014). Biological and probiotic characterisation of spontaneous phage-resistant mutants of *Lactobacillus plantarum*. *Int. Dairy J.* 39(1):64-70.
- Brogden KA, Roth JA, Stanton TB, Bolin CA, Minion FC, Wannemuehler MJ (2000). *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 3rd edn. ASM Press, Washington DC.
- Buckenhüskes HJ (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12(1-3):253-271.
- Burgain J, Scher J, Francius G, Borges F, Corgneau M, Revol-Junelles AM, Cailliez-Grimal C, Gaiani C (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Adv. Colloid Interface Sci.* 213(1):21-35.
- Burns AJ, Rowland IR (2004). Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutat. Res.* 551(1-2):233-243.
- Burns P, Cuffia F, Milesi M, Vinderola G, Meinardi C, Sabbag N, Hynes E (2012). Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter *Lactobacilli* in soft cheeses. *Food Microbiol.* 30(1):45-50.
- Butler MJ (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Med. Maladies Infect.* 44(1):1-8.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P (2004). Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnol. Prog.* 20(1): 248-254.
- Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int. J. Food Microbiol.* 149(3):185-193.
- Chapman CMC, Gibson GR, Rowland I (2014). Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and *in vitro* adhesion to bladder cells by urinary tract pathogens. *Anaerobe* 27(1):71-76.
- Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, Jin Q (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 33(1):325-332.
- Clark S, Potter ED (2007). Cottage Cheese. In: *Handbook of food products manufacturing: health, meat, milk, poultry, seafood and vegetables*. hoboken. pp. 618-633.
- Coelho MC, Silva CCG, Ribeiro SC, Dapkevicius MLNE, Rosa HJD (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 191(1):53-59.
- Collado MC, Meriluoto JS, Salminen S (2007). Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different method. *J. Microbiol. Methods.* 71(1):71-74.
- Coman MM, Cecchini C, Verdenelli MC, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A (2012). Functional foods as carriers for SYNBI®, a probiotic bacteria combination. *Int. J. Food Microbiol.* 157(3):348-352.

- Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(6):3060-3067.
- Corzo G, Gilliland SE (1999). Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 82(3):472-480.
- Cotter PD, Hill C (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 67(3):429-453.
- De Souza Barbosa MDS, Todorov SD, Ivanova I, Chobert JM, Haertlé T, de Melo Franco BDG (2015). Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiol.* 46(1): 254-262.
- De Vrese M, Laue C, Offick B, Soeth E, Repenning F, Thoß A, Schrezenmeier J (2014). A combination of acid lactase from *Aspergillus oryzae* and yogurt bacteria improves lactose digestion in lactose maldigesters synergistically: A randomized, controlled, double-blind cross-over trial. *Clin. Nutr.* 14(1):1-6.
- De Vuyst L, Vin FD, Degeest FVB (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11(9):687-707.
- Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C, Rappuoli R (2001). The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu. Rev. Immunol.* 19(1): 523-563.
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioni M, Palenzona D (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31(6):438-442.
- Dias FS, Duarte WF, Santos MRRM, Ramos EM, Schwan RF (2013). Screening of *Lactobacillus* isolated from pork sausages for potential probiotic use and evaluation of the microbiological safety of fermented products. *J. Food Protect.* 76(6):991-998.
- Duncan SH, Flint HJ (2013). Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas* 75(1):44-50.
- Erkkilä S, Petäjä E (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci.* 55(3): 297-300.
- FAO / WHO (2002). Orientações para a avaliação de probióticos na alimentação. London, Ontario: Organização para Alimentação e Agricultura do relatório das Nações Unidas e do Grupo de Trabalho da Organização Mundial da Saúde (2002), pp 1-11.
- Federici S, Ciarcocchi F, Campana R, Ciandrini E, Blasi G, Baffone W (2014). Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from Ciauscolo salami produced in Central Italy. *Meat Sci.* 98(4):575-584.
- Fedorak R, Demeria D (2012). Probiotic bacteria in the prevention and the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin. North A.* 41(4):821-842.
- Fonseca F, Beal C, Corrieu G (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *J. Dairy Res.* 67(1):83-90.
- Foschino R, Fiori E, Galli A (1996). Survival and residual activity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures under different conditions. *J. Dairy Res.* 63(2):295-303.
- Foster JW (1993). The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* 175(7):1981-1987.
- Franciosi E, Settanni L, Cavazza A, Poznanski E (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *Int. Dairy J.* 19(1):3-11.
- Fröhlich-Wyder MT, Guggisberg D, Badertscher R, Wechsler D, Wittwer A, Imier S (2013). The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus parabuchneri* on the eye formation of semi-hard cheese. *Int. Dairy J.* 33(2): 120-128.
- Gaglio R, Scatassa ML, Cruciani M, Miraglia V, Corona O, Di Gerlando R, Portolano B, Moschetti G, Settanni L (2014). *In vivo* application and dynamics of lactic acid bacteria for the four-season production of Vastedda-like cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 177(1): 37-48.
- García-Ruiz A, González de Llano D, Esteban-Fernández A, Requena T, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiol.* 44(1):220-225.
- Ge XY, Yuan J, Qin H, Zhang WG (2011). Improvement of L-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89(1):73-78.
- Giaouris E, Chapot-Chartier MP, Briandet R (2009). Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Int. J. Food Microbiol.* 131(1):2-9.
- Giraffa G (1995). Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* 12(1): 291-299.
- Gregoret V, Perezlindo MJ, Vinderola G, Reinheimer J, Binetti A (2013). A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. *Food Microbiol.* 34(1):19-28.
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharm. Ther.* 27(2): 104-119.
- Harty DWS, Oakey HJ, Patrikakis M, Hume EBH, Knox KW (1994). Pathogenic potential of lactobacilli. *Food Microbiol.* 24(1-2):179-189.
- Hor YY, Liang MT (2014). Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. *Dermatol. Sin.* 32(3):141-147.
- Horvath P, Couité-Monvoisin AC, Romero DA, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R (2009). Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int. J. Food Microbiol.* 131(1): 62-70.
- Huang HY, Hsieh HY, King VAE, Chi LL, Tsen JH (2014). To pre-challenge lactic acid bacteria with simulated gastrointestinal conditions is a suitable approach to studying potential probiotic properties. *J. Microbiol. Methods.* 107(1):138-146.
- Huang HY, Korivi M, Tsai CH, Yang JH, Tsai YC (2013). Supplementation of *Lactobacillus plantarum* K68 and fruit-vegetable ferment along with high fat-fructose diet attenuates metabolic syndrome in rats with insulin resistance. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013(1):1-12.
- Iqbal S, Nguyen TH, Nguyen TT, Maischberger T, Haltrich D (2010). beta-Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galactooligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 345(10):1408-1416.
- Ishibashi N, Yamazaki S (2001). Probiotics and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2):465-470.
- Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L (2012). *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 153(1-2):218-222.
- Juarez GE, Villena J, Salva S, de Valdez GF, Rodriguez AV (2013). *Lactobacillus reuteri* CRL1101 beneficially modulate lipopolysaccharide-mediated inflammatory response in a mouse model of endotoxemic shock. *J. Funct. Foods* 5(4):1761-1773.
- Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y (1997). Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 41(1):49-55.
- Kailasapathy K (2013). Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits-a review. *Int. J. Fermented Foods* 2(1):1-17.
- Kargozari M, Moini S, Akhondzadeh Basti A, Emam-Djomeh Z, Gandomi H, Revilla Martin I, Ghasemlou M, Carbonell-Barrachina AA (2014). Effect of autochthonous starter cultures isolated from Siahmazgi cheese on physicochemical, microbiological and volatile compound profiles and sensorial attributes of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage. *Meat Sci.* 97(1):104-114.
- Kies AK (2014). Authorised EU health claims related to the management of lactose intolerance: reduced lactose content, dietary lactase supplements and live yoghurt cultures. *Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised Eu Health Claims*, pp. 177-211.
- Kodali VP, Das S, Sen R (2009). An exopolysaccharide from a probiotic: Biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity. *Food Res. Int.* 42(5-6):695-699.
- Kolozym-Krajewska D, Dolatowskib ZJ (2012). Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochem.* 47(12): 1761-1772.
- Korbekandi H, Mortazavian AM, Iravani S (2011). Technology and stability of probiotic in fermented milks. In Shah N, Cruz AG, Faria JAF (Eds.), *Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and*

- benefits to the human health. Nova Science Publishers. NewYork. pp. 131-189.
- Kos B, Kovic JS, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94(6):981-987.
- Kotzamanidis C, Kourelis A, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N, Yianguou M (2010). Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 140(2-3):154-163.
- Kulisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A (2002). Two antioxidative strains as promising probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 72(3):215-224.
- Lähteinen T, Lindholm A, Rinttilä T, Junnikkalaa S, Kanta R, Pietilä TA, Levonenc K, Ossowska I, Solano-Aguilarb G, Jakava-Viljanenc M, Palva A (2014). Effect of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 as a feeding supplement on the performance and immune function of piglets. *Vet. Immunol. Immunop.* 158(1-2):14-25.
- Lamothe GT, Jolly L, Mollet B, Stingle F (2002). Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Arch. Microbiol.* 178(3):218-228.
- Landeta G, Cuñel JA, Carrascosa AV, Muñoz R, De Las Rivas V (2013). Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Sci.* 95(2):272-280.
- Lawley TD, Clare S, Walker AW, Stares MD, Connor TR, Raisen C, Gouldin D, Rad R, Schreiber F, Brandt C, Deakin LJ, Pickard DJ, Duncan SH, Flint HJ, Clark TG, Parkhill J, Dougan G (2012). Targeted restoration of the intestinal microbiota with a simple, defined bacteriotherapy resolves relapsing *Clostridium difficile* disease in mice. *PLoS Pathog.* 8(10):995-1002.
- Lee J, Yun HS, Cho KW, Oh S, Kim SH, Chun T, Kim B, Whang KY (2011). Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: immune modulation and longevity. *Int. J. Food Microbiol.* 148(2):80-86.
- Leite MO, Leite DC, Del Aguilá EM, Alvares TS, Peixoto RS, Miguel ML, Silva JT, Paschoalin VMF (2013). Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *J. Dairy Sci.* 96(7):4149-4159.
- Li W, Ji J, Rui X, Yu J, Tang W, Chen X, Jiang M, Dong M (2014). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*. *LWT-Food Sci. Technol.* 59(2): 732-739.
- Liu C, Lu J, Lu L, Liu Y, Wang F, Xiao M (2010). Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresour. Technol.* 101(14):5528-5533.
- Liu X, Liu W, Zhang Q, Tian F, Wang G, Zhang H, Chen W (2013). Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli*. *Food Control* 30(2):563-568.
- Liu ZJ (2009). Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 15(46):5784-5788.
- Lollo PCB, Cruz AG, Morato PN, Moura CS, Carvalho-Silva LB, Oliveira CAF, Faria F, Amaya-Farfan J (2012). Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. *J. Dairy Sci.* 95(7):3549-3558.
- Lopez-Kleine L, Monnet V (2011). Lactic Acid Bacteria Proteolytic System. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, Four-Volume Set. Academic Press. pp. 49-55.
- Luo Z, Gasasira V, Huang Y, Liu D, Yang X, Jiang S, Hu W (2013). Effect of *Lactobacillus salivarius* H strain isolated from Chinese dry-cured ham on the color stability of fresh pork. *Food Sci. Hum. Wellness* 2(3-4):139-145.
- Mahony J, van Sinderen D (2014). Novel strategies to prevent or exploit phages in fermentations, insights from phage-host interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 32(1):8-13.
- Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17(2):204-210.
- Marteau P, Gerhardt MF, Myaras A, Bouvier E, Trivins F, Rambaud JC (1995). Metabolism of Bile Salts by Alimentary Bacteria during Transit in the Human Small Intestine. *Microb. Ecol. Health D.* 8(4):151-157.
- Mättö J, Alakomi HL, Vaari A, Virkajärvi I, Saarela M (2006). Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *Int. Dairy J.* 16(9):1029-1037.
- McFarland LV (2009). Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe* 15(6):274-280.
- McGann LE (1978). Differing actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents. *Cryobiology* 15(4):382-390.
- Miller RA, Britigan BE (1997). Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol.* 10(1):1-18.
- Monteagudo-Mera A, Rodríguez-Aparicio L, Rúa J, Martínez-Blanco H, Navasa N, García-Armeño MR, Ferrero MA (2012). *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J. Funct. Foods* 4(2):531-541.
- Morelli L (2007). *In vitro* assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *Int. Dairy J.* 17(11):1278-1283.
- Muñoz-Atienza E, Araújo C, Magadán S, Hernández PE, Herranz C, Santos Y, Cintas LM (2014). *In vitro* and *in vivo* evaluation of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming. *Fish Shellfish Immunol.* 41(2):570-580.
- Muñoz MCC, Benomar N, Lerma LL, Gálvez A, Abriouel H (2014). Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Alorña table olives throughout fermentation process. *Int. J. Food Microbiol.* 172(1):110-118.
- Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm. Bowel Dis.* 15(2):300-310.
- Nikolic M, López P, Strahinic I, Suárez A, Kojic M, Fernández-García M, Topisirovic L, Golic N, Ruas-Madiedo P (2012). Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 158(2):155-162.
- Noh DO, Gilliland S (1993). Influence of Bile on Cellular Integrity and Galactosidase Activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 76(5):1253-1259.
- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Grönlund MM, Isolauri E, Salminen SJ (1999). Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *Int. Dairy J.* 9(9):623-630.
- Paik HD, Lee JY (2014). Investigation of reduction and tolerance capability of lactic acid bacteria isolated from kimchi against nitrate and nitrite in fermented sausage condition. *Meat Sci.* 97(4):609-614.
- Palomino JM, Toledo del Árbol J, Benomar N, Abriouel H, Martínez Cañamero M, Gálvez A, Pulido R (2014). Application of *Lactobacillus plantarum* Lb9 as starter culture in caper berry fermentation. *LWT - Food Sci. Technol.* 60(2):788-794.
- Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, Perry K, Stemmer WPC, Ryan CM, del Cardayre S (2002). Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. *Nat. Biotechnol.* 20(7): 707-712.
- Pedersen TB, Ristagn D, McSweeney PLH, Vogense FKY, Ard Y (2013). Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. *Int. Dairy J.* 33(2):112-119.
- Pelletier C, Bouley CC, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon-Fontaine MN (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5):1725-1731.
- Pelucchi C, Chatenoud L, Turati F, Galeone C, Moja L, Bach JF, La Vecchia C (2012). Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. *Epidemiology* 23(3):402-414.
- Pereira CI, Crespo MTB, Romão MVS (2001). Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int. J. Food Microbiol.* 68(3):211-216.
- Peres CM, Alves M, Mendoza AH, Moreira L, Silva S, Bronze MR, Vilas-Boas L, Peres C, Malcata X (2014). Novel isolates of lactobacilli

- from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT - Food Sci. Technol.* 59(1):234-248.
- Perin LM, Miranda RO, Todorov SD, Franco BDGM, Nero LA (2014). Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *Int. J. Food Microbiol.* 185(1):121-126.
- Pescuma M, Elvira MH, Haertlé T, Chobert JM, Mozzi F, Valdez GF (2015). *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CRL 454 cleaves allergenic peptides of β -lactoglobulin. *Food Chem.* 170(1):407-414.
- Prescott S, Björkstén B (2007). Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120(2):255-262.
- Ranadheera CS, Evans CA, Adams MC, Baines SK (2014). Effect of dairy probiotic combinations on *in vitro* gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. *J. Funct. Foods* 8(1):18-25.
- Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E (2002). Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109(1):119-121.
- Reale A, Di Renzo T, Rossi F, Zotta T, Lucumini L, Preziosi M, Parente E, Sorrentino E, Coppola R (2015). Tolerance of *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT-Food Sci. Technol.* 60(1):721-728.
- Reiff C, Kelly D (2010). Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int. J. Med. Microbiol.* 300(1):25-33.
- Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Du S, Ye F, Liu C, Liu H, Wang M, Li Y, Sun Y, Li X, Tian M, Jin N (2014). *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe* 30(1):1-10.
- Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Li X, Tian M, Dub S, Guob H, Liu C, Zhub N, Sunb D, Li Y, Jin N (2012). Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment. *Anaerobe* 18(5):508-515.
- Rhimi M, Boisson A, Dejob M, Boudebouze S, Maguin E, Haser R, Aghajari N (2010). Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a β -galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. *Res. Microbiol.* 161(7):515-525.
- Rincon-Delgado MI, Lopez-Hernandez A, Wijaya I, Rankin SA (2012). Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. *J. Dairy Sci.* 95(3):1128-1139.
- Rivas FP, Castro MP, Vallejo M, Marguet E, Campos CA (2014). Sakacin Q produced by *Lactobacillus curvatus* ACU-1: functionality characterization and antimicrobial activity on cooked meat surface. *Meat Sci.* 97(4):475-479.
- Rivera-Espinoza Y, Gallardo-Navarro Y (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol.* 27(1):1-11.
- Ross RP, Desmond C, Fitzgerald G, Stanton C (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *J. Appl. Microbiol.* 98(6):1410-1417.
- Rubio R, Jofré A, Martín B, Aymerich T, Garriga M (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiol.* 38(1):303-311.
- Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, Casquete R, Serradilla MJ, Córdoba MG (2009). Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci.* 83(3):460-467.
- Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84(3):197-215.
- Sah BNP, Vasiljevic T, McKechnie S, Donkor ON (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chem.* 156(1):264-70.
- Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71(4):394-406.
- Schillinger U, Guigas C, Holzapfel HW (2005). *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.* 15(12): 1289-1297.
- Senz M, Lengerich BV, Bader J, Stahl U (2015). Control of cell morphology of probiotic *Lactobacillus acidophilus* forehanced cell stability during industrial processing. *Int. J. Food Microbiol.* 192(1):34-42.
- Serban DE (2014). Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Lett.* 345(2):258-270.
- Shah NP (2000). Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dair. *Foods J. Dairy Sci.* 83(4):894-907.
- Shalaby AR (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29(7):675-690.
- Shao Y, Zhang W, Guo H, Pan L, Zhang H, Sun T (2015). Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* 50(1):250-258.
- Sharma P, Tomar SK, Goswami P, Sangwan V, Singh R (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Res. Int.* 57(1):176-195.
- Sidira M, Kandyliis P, Kanellaki M, Kourkoutas Y (2015). Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on the evolution of flavor compounds in probiotic dry-fermented sausages during ripening. *Meat Sci.* 100(1):41-51.
- Singh K, Kallali B, Kumar A, Thaker V (2011). Probiotics: A review. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 1(2):287-290.
- Smit G, Smit BA, Engels WJM (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(3):591-610.
- Smukowski M, Wendorff WL, Ping Y, Rao RD (2003). Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. *J. Dairy Sci.* 86(suppl. 1): 364.
- Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P (2008). CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(3):181-186.
- Su Y, Zhanga B, Su L (2013). CD4 detected from *Lactobacillus* helps understand the interaction between *Lactobacillus* and HIV. *Microbiol. Res.* 168(5):273-277.
- Talwalkar A, Miller CW, Kailasapathy K, Nguyen MH (2004). Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39(6):605-611.
- Tammam JD, Williams AG, Banks J, Cowie G, Lloyd D (2001). Membrane inlet mass spectrometric measurement of O₂ and CO₂ gradients in cultures of *Lactobacillus paracasei* and a developing Cheddar cheese ecosystem. *Int. J. Food Microbiol.* 65(1-2):11-22.
- Tian P, Xu B, Sun H, Li X, Li Z, Wei P (2014). Isolation and gut microbiota modulation of antibiotic-resistant probiotics from human feces. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* 79(4):405-412.
- Tripathi MK, Giri SK (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods* 9(1):225-241.
- Tulumoglu S, Kaya HI, Simsek Ö (2014). Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. *Anaerobe* 30(1):120-125.
- Tuomola E (1999). The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *Fems. Immunol. Med. Mic.* 26(2):137-142.
- Ustok FI, Tari C, Harsa S (2010). Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food Chem.* 119(3):1114-1120.
- Vandenplas Y, Huys G, Daube G (2014). Probiotics: an update. *J. Pediatr.* doi:10.1016/j.jpeds.2014.08.005
- Vasiljevic T, Shah NP (2008). Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.* 18(7):714-728.
- Veen SVD, Abee T (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peroacetic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 144(3):421-431.
- Vesterlund S, Palta J, Karp M, Ouwehand AC (2005). Measurement of bacterial adhesion-*in vitro* evaluation of different methods. *J. Microbiol. Method.* 60(2): 225-233.
- Vesterlund S, Vankerckhoven V, Saxelin M, Goossens H, Salminen S, Ouwehand AC (2007). Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates.

- Int. J. Food Microbiol. 116(3):325-331.
- Wang G, Zhao Y, Tian F, Jin X, Chen H, Liu X, Zhanga Q, Zhaoa J, Chena Y, Zhang H, Chen W (2014). Screening of adhesive lactobacilli with antagonistic activity against *Campylobacter jejuni*. Food Control 44(1):49-57.
- Welman AD, Maddox IS (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria perspectives and challenges. Trends Biotechnol. 21(8):269-274.
- Whitehead HR, Cox GA (1935). The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic Streptococci: A preliminary note. NZJ. Dairy Sci. Technol. 16(1):319-320.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. Semin. Cancer Biol. 14(6):473-486.
- Xiào Z, Lu RJ (2014). Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. Biotechnol. Adv. 32(2):492-503.
- Ye L, Zhao H, Li Z, Wu JC (2013). Improved acid tolerance of *Lactobacillus pentosus* by error-prone whole genome amplification. Bioresource Technol. 135(1):459-463.
- Yee AL, Maillard M, Roland N, Chuat V, Leclerc A, Pogačić T, Valence F, Thierry A (2014). Great interspecies and intraspecies diversity of dairy propionibacteria in the production of cheese aroma compounds. Int. J. F. Microbiol. 191(1):60-68.
- Zago M, Fomasari ME, 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 Microbiol. 28(5):1033-1040.
- Zárate G, Pérez Chaia A (2012). Feeding with dairy *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 reduces the incidence of Concanavalin-A induced alterations in mouse small intestinal epithelium. Food Res. Int. 47(1):13-22.
- Zhang H, Qiu Y, Zhao Y, Liu X, Liu M, Yu A (2014). Immunogenicity of oral vaccination with *Lactococcus lactis* derived vaccine candidate antigen (UreB) of *Helicobacter pylori* fused with the human interleukin 2 as adjuvant. Mol. Cell. Probes 28(1):25-30.
- Zhang Q, Lin S, Nie X (2013). Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum*. Food Control 32(2):498-500.
- Zheng PX, Fang HY, Yang HB, Tien NY, Wang MC, Wu JJ (2014). *Lactobacillus pentosus* strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. J. Microbiol. Immunol. Infect. 1-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.014>