



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Liane Caroline Sousa Nascimento

**SELEÇÃO DE NOVAS LINHAGENS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-
LÁTICAS PROBIÓTICAS E APLICAÇÃO DE *E. faecium* EM
LEITE**

São José do Rio Preto - SP
2017

Liane Caroline Sousa Nascimento

**Seleção de Novas Linhagens de Bactérias Ácido-Láticas Probióticas e
Aplicação de *E. faecium* em Leite**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Orientador:

Prof^a. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto - SP
2017

Nascimento, Liane Caroline Sousa.

Seleção de novas linhagens de bactérias ácido-láticas probióticas e aplicação de *E. faecium* em leite / Liane Caroline Sousa

Nascimento. -- São José do Rio Preto, 2017

131f. : il., tabs.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Alimentos funcionais. 3. Derivados do leite. 4. Bactérias produtoras de ácido láctico. 5. Fermentação. 6. Fatores de virulência. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 641.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Liane Caroline Sousa Nascimento

**Seleção de Novas Linhagens de Bactérias Ácido-Láticas Probióticas e
Aplicação de *E. faecium* em Leite**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna
UNESP - São José do Rio Preto, SP
Orientadora

Prof^a. Dra^a Kátia Sivieri
UNESP - Araraquara, SP

Prof^a. Dra^a Sabrina Neves Casarotti
UFMT – Cuiabá, MT

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Conti Silva
UNESP - São José do Rio Preto, SP

Prof^a. Dr^a. Natália Soares Janzanti
UNESP - São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto - SP
2017

Dedico este trabalho à minha família: minha avó Neusa (in memoriam), por nos ensinar os valores de família; aos meus pais: Paraci e Celeste, por todo amor, carinho e companheirismo em cada etapa deste estudo e à minha filha: Luísa, minha maior inspiração e fonte de força.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca me abandonar, por iluminar meus passos, por me fazer acreditar, persistir, e me ajudar a vencer as barreiras ao longo do caminho.

À minha filha amada, Luísa Cristina, minha maior motivação. Desde o início, tudo que busco e alcanço: faço por você!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna, por ser muito mais que orientadora: parceira, ótima leitora, crítica e comentarista. Obrigada pelo apoio, pelo incentivo à pesquisa e por mostrar os caminhos.

Aos meus pais, pela grande força que deram desde o início do doutorado, principalmente no período de estágio que abdicaram do conforto do seu lar, para me acompanharem nesta jornada, essa conquista é nossa!! Às minhas irmãs, tios, primos, e Rosiane por cuidarem da Luísa, sempre que estive ausente.

À minha amada avó Neusa, por ser sempre tão amiga, conselheira, por ficar feliz a cada conquista alcançada. Obrigada pela torcida, você não está hoje aqui pra me abraçar por mais esta etapa vencida, mas sei que onde estás, cuidas de mim.

À CAPES pela bolsa concedida durante o período de estágio. Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, por oferecer toda a infraestrutura para o desenvolvimento deste estudo.

Ao IFMA, pela oportunidade deste Doutorado Interinstitucional.

A todos os professores do Dinter: Ana Carolina, Maria Aparecida, Roger, Célia, Natália, Vanildo, Neusa, pela amizade, pelos ensinamentos e pela força neste doutorado.

À Banca Examinadora pelos esclarecimentos, sugestões e contribuições para melhoria deste trabalho.

Aos amigos do Dinter, turma maravilhosa que levarei sempre no coração. Em especial aos que estiveram ao meu lado no período do estágio, ajudando a diminuir a saudade de casa, fazendo deste lugar inesquecível: Manoel, Pedro, Maron, Flávia, Adeval, Marcelo e Valdenia.

Aos colegas, e companheiros do Laboratório de Leites e Derivados, por todo ensinamento, amizade, ajuda nos experimentos e por tornarem meus dias aqui mais felizes. Obrigada: Sabrina, Taís, Vivian, Cecília, Dani, Bruna e Walisson. Às meninas

maravilhosas do Laboratório de Cereias, pela companhia, pelos passeios, pelas guloseimas: Mariana, Flávia e Jéssica.

Obrigada Sabrina por tudo que já falei, pela imensa ajuda na realização das análises e pelas metodologias disponibilizadas. Obrigada também: Ao Bruno Carneiro, Mariana e Lara, por disponibilizarem outros laboratórios, materiais e equipamentos para realização de algumas análises.

Ao Manoel Filho, pelo apoio incondicional, pelos desentendimentos do início, que viraram um grande afeto. Obrigada pela grande ajuda nas análises, na estatística, na formatação, por estar sempre presente me ouvindo e me aconselhando. Você me conquistou, fez valer a pena!!! Valeu!!!

À minha amiga e irmã Samia Lopes por sempre estar ao meu lado, desde a infância; te agradeço por todo o apoio na tradução e nas aulas de inglês.

Às pessoas maravilhosas que conheci, e que estavam sempre dispostas a me ajudar com um sorriso estampado no rosto, os técnicos de laboratório: Luíz e Ginaldo. À Natália, sempre presente e nos ajudando em tudo!

Obrigada a todos que me ajudaram de forma direta e indireta para que este trabalho fosse realizado, por me fazerem crescer como pessoa e como profissional.

RESUMO

A busca por alimentos que proporcionem melhorias na saúde e bem estar dos consumidores é uma tendência mundial. Os produtos lácteos fermentados estão incluídos entre os alimentos que atendem a esta demanda. O objetivo desta pesquisa foi selecionar novas linhagens de bactérias ácido-láticas (BAL) potencialmente probióticas e seguras, bem como avaliar a aplicação das cepas selecionadas em leite. Na primeira etapa, o potencial probiótico (capacidade de hidrólise de sais biliares [BSH], capacidade de autoagregação, coagregação com *Lactobacillus* spp. e *Listeria* spp. e hidrofobicidade e tolerância em diferentes valores de pH e concentrações de NaCl) e a segurança (susceptibilidade a antibióticos e degradação da mucina) foram avaliados em vinte cepas de BAL, previamente isoladas de queijo muçarela de búfala e identificadas como *Lactobacillus helveticus* (SJRP56 e SJRP191), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (SJRP49), *Lactobacillus fermentum* (SJRP42), *Enterococcus durans* (SJRP14, SJRP17, SJRP25, SJRP26 e SJRP68), *Enterococcus faecium* (SJRP20, SJRP28, SJRP65, SJRP69) e *Enterococcus* sp. (SJRP04, SJRP11, SJRP16, SJRP101, SJRP120, SJRP122 e SJRP125). Seis cepas apresentaram atividade de BSH e a maioria delas apresentou elevada capacidade de autoagregação e hidrofobicidade. Algumas cepas apresentaram capacidade de coagregação com outras BAL e patógenos. A maioria das cepas cresceu bem em pH neutro e a tolerância ao NaCl foi dependente da temperatura. Nenhuma das BAL degradou a mucina; entretanto, algumas apresentaram resistência aos antibióticos testados. Na segunda etapa, considerando as características probióticas e de segurança, as cepas *E. faecium* SJRP20 e *E. faecium* SJRP65 foram selecionadas para testes complementares, incluindo tolerância às condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI), adesão as células Caco-2, produção da enzima β -galactosidase e presença de genes associados à virulência e produção de aminas biogênicas. Ambas as cepas resistiram bem às condições do TGI, apresentaram baixa propriedade de adesão, são produtoras de β -galactosidase e não apresentaram genes relacionados à adesão, agregação e colonização. *E. faecium* SJRP65 apresentou poucos genes relacionados a resistência a antibióticos e fatores de virulência. Em função disso, foi considerado com boas propriedades funcionais e com características interessantes para aplicação em produtos lácteos. Na terceira etapa, foi avaliada a aplicação de *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 potencialmente probióticos em leite: cinética de acidificação,

pós-acidificação, resistência às condições simuladas do TGI e capacidade de sequestro de radicais livres. *E. faecium* SJRP20 em leite apresentou maior velocidade máxima de acidificação ($V_{\text{máx}} = 7,11 \times 10^{-3} \text{ upH/min}$), enquanto que *E. faecium* SJRP65 apresentou menor taxa de acidificação. Não houve diferença na composição centesimal das amostras de leite fermentado inoculado com as cepas de *E. faecium*. Durante a estocagem refrigerada houve redução do pH e aumento da acidez em todas as amostras de leite fermentado. Os produtos fermentados por ambas as cepas resistiram bem às condições simuladas do TGI, com elevada viabilidade ao longo do período de estocagem. O leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 apresentou elevada capacidade de sequestro de radicais livres. Com o aumento da concentração de produto e do tempo de estocagem, foi maior a capacidade antioxidante. A fermentação do leite por *E. faecium* potencialmente probióticos apresentou bons resultados, e a cepa *E. faecium* SJRP20 reuniu as melhores características tecnológicas para aplicação em produtos lácteos fermentados funcionais: apresentou maior velocidade de acidificação, menor tempo para atingir a velocidade máxima, maior estabilidade às condições do TGI durante a estocagem refrigerada e alta capacidade de sequestro de radicais livres.

Palavras-chave: Alimentos funcionais; fermentação; viabilidade; fatores de virulência; produtos lácteos.

ABSTRACT

The search for food which improves consumer health and well-being is a worldwide trend. The fermented dairy products are included among food which satisfies this demand. The aim of this research was to select new strains of lactic acid bacteria (LAB) potentially probiotic and safe, as well as to evaluate the application of selected strains in milk. In the first stage, the probiotic potential (bile salt hydrolase capacity [BSH], capacity of auto-aggregation, co-aggregation with *Lactobacillus* spp. and *Listeria* spp., hydrophobicity, tolerance in different pH values and concentrations of NaCl) and safety (susceptibility to antibiotics and mucin degradation) were evaluated in twenty LAB strains, previously isolated of water- buffalo mozzarella cheese and identified as *Lactobacillus helveticus* (SJRP56 and SJRP191), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (SJRP49), *Lactobacillus fermentum* (SJRP42), *Enterococcus durans* (SJRP14, SJRP17, SJRP25, SJRP26 and SJRP68), *Enterococcus faecium* (SJRP20, SJRP28, SJRP65, SJRP69) and *Enterococcus* sp. (SJRP04, SJRP11, SJRP16, SJRP101, SJRP120, SJRP122 and SJRP125). Six strains presented BSH activity and most of them presented high capacity of auto-aggregation and hydrophobicity. Some strains presented capacity of co-aggregation with other LAB and pathogens. The majority of strains grew well in neutral pH and the tolerance to NaCl was dependent on the temperature. None of the LAB degraded the mucin; however, some of them presented resistance to the tested antibiotics. In the second stage, considering the probiotic features and safety, the strains *E. faecium* SJRP20 and *E. faecium* SJRP65 were selected for complementary tests, including tolerance to the simulated GIT conditions, adhesion to Caco-2 cells, production of β -galactosidase enzyme and presence of genes associated to the virulence factors and production of biogenic amines. Both strains resisted well to the GIT conditions, presented low property of adhesion, β -galactosidase activity and they did not present genes related to adhesion, aggregation and colonization. *E. faecium* SJRP65 presented few genes related to the resistance to antibiotics and virulence factors. According to this, it was considered with good functional properties and with interesting characteristics for application in dairy products. In the third stage, the application of potentially probiotic *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 in milk was evaluated: acidification kinetics, post acidification, resistance to the simulated GIT conditions

(GIT) and free radicals scavenging capacity. *E. faecium* SJRP20 in milk presented higher maximum speed ($V_{\text{máx}} = 7,11 \times 10^{-3} \text{upH/min}$), while the *E. faecium* SJRP65 presented lower acidification rate. There was not difference in the gross composition of the samples of fermented milk inoculated with *E. faecium* strains. During the refrigerated storage, there was a pH reduction and an increase in acidity for all fermented samples. The products fermented by both strains resisted well to the simulated GIT conditions, with high viability during the storage period. The milk fermented by *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 presented high free radicals scavenging capacity. With the increase of the product concentration and the storage time, the antioxidant capacity was higher. The milk fermentation by potentially probiotic *E. faecium* presented good results, and the *E. faecium* SJRP20 strain combined the best technological characteristics for application in functional fermented dairy products: presented higher speed of acidification, lower time to reach the maximum speed, higher stability to the GIT conditions during the refrigerated storage and high free radicals scavenging capacity.

Keywords: Functional food; fermentation; viability; virulence factors; dairy products.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2: SCREENING FOR NOVEL POTENTIAL PROBIOTIC *Lactobacillus* spp. AND *Enterococcus* spp. STRAINS

Figure 1. Growth of *L. fermentum* (—●— SJRP42), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (—■— SJRP49), *L. helveticus* (—▲— SJRP56, —▼— SJRP191), *E. durans* (—◆— SJRP14, —⊖— SJRP17, —⊞— SJRP25, —△— SJRP26, —◇— SJRP68), *E. faecium* (—*— SJRP20, —★— SJRP28, —+— SJRP65, —×— SJRP69) and *Enterococcus* sp. (—⊕— SJRP04, —⊞— SJRP11, —⊗— SJRP16, —⊞— SJRP101, —⊞— SJRP120, —■— SJRP122, —⊞— SJRP125) strains in MRS broth at pH values 5, 7 and 9 (a, b and c, respectively), shown as OD (600 nm) measurements. The results are represented as an average of three readings..... 69

Figure 2. Growth of *L. fermentum* (—●— SJRP42), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (—■— SJRP49), *L. helveticus* (—▲— SJRP56, —▼— SJRP191), *E. durans* (—◆— SJRP14, —⊖— SJRP17, —×— SJRP25, —△— SJRP26, —◇— SJRP68), *E. faecium* (—*— SJRP20, —★— SJRP28, —+— SJRP65, —×— SJRP69) and *Enterococcus* sp. (—⊕— SJRP04, SJRP11, —⊗— SJRP16, —⊞— SJRP101, —⊞— SJRP120, —■— SJRP122, —⊞— SJRP125) strains in MRS broth with 0.5, 1.0 and 3.0% NaCl at 30 °C (a, b and c, respectively) and in MRS broth with 0.5, 1.0 and 3.0% NaCl at 37 °C (d, e and f, respectively), shown as OD (600 nm) measurements. The results are represented as an average of three readings..... 71

CAPITULO 3: COMPORTAMENTO DE *Enterococcus faecium* POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS EM LEITE: PERFIL DE ACIDIFICAÇÃO, PÓS-ACIDIFICAÇÃO, RESISTÊNCIA ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL E CAPACIDADE DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES.

Figura 1: Curvas de acidificação de leite reconstituído a 12%, pasteurizado e fermentado com as culturas *E. faecium* SJRP20 e *E. faecim* SJRP65, até atingir o pH 4,6. 114

Figura 2: Capacidade de sequestro de radicais livres pelo método ABTS⁺. Concentração de leite fermentado: ■ - 10 mg/mL, ■ - 50 mg/mL, ■ - 100 mg/mL; ■ - 150 mg/mL, ■ - 200 mg/mL. ^{A, B, C} Letras maiúsculas iguais, para a mesma cepa, em diferentes tempos; e ^{a, b, c} letras minúsculas iguais, entre cepas, no mesmo tempo e para a mesma concentração, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).... 122

Figura 3: Capacidade de sequestro de radicais livres pelo método DPPH*. Concentração de leite fermentado: ■ - 10 mg/mL, ■ - 50 mg/mL, ■ - 100 mg/mL; ■ - 150 mg/mL, ■ - 200 mg/mL. ^{A, B, C} Letras maiúsculas iguais, para a mesma cepa, em diferentes tempos; e ^{a, b, c} letras minúsculas iguais, entre cepas, no mesmo tempo e para a mesma concentração, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).... 123

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: SCREENING FOR NOVEL POTENTIAL PROBIOTIC *Lactobacillus* spp. AND *Enterococcus* spp. STRAINS

Table 1: Bile salts hydrolase activity of LAB strains in MRS agar modified with salts of taurocholic and taurodeoxycholic acid.	61
Table 2: Auto-aggregation (%) of the LAB strains tested in different temperatures: 4 °C (refrigerated storage temperature), 37 °C (optimal growth temperature), and 42 °C (fermentation heating temperature).	64
Table 3: Co-aggregation capacity and hydrophobic potential of LAB strains with indicating microorganisms.	66
Table 4: Profile of antibiotics susceptibility of LAB strains. The concentrations of antibiotics are expressed in µg per disc.	75
Table 5: Viability of <i>E. faecium</i> SJRP20 and SJRP65 after simulated GI tract conditions (log CFU/mL).	78
Table 6: Presence of genes implicated in adhesion, aggregation and colonization in LAB strains.	81
Table 7: Presence of genes implicated in virulence factors and antibiotic resistance in LAB strains.	84

CAPITULO 3: COMPORTAMENTO DE *Enterococcus faecium* POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS EM LEITE: PERFIL DE ACIDIFICAÇÃO, PÓS-ACIDIFICAÇÃO, RESISTÊNCIA ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL E CAPACIDADE DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos de acidificação de <i>Enterococcus faecium</i> SJRP20 e SJRP65 em leite.	115
Tabela 2: Composição centesimal ¹ de leite fermentado por <i>E. faecium</i> SJRP20 e SJRP65.	116
Tabela 3: Valor de pH e acidez ¹ de leite fermentado por <i>E. faecium</i> SJRP20 e SJRP65, durante o armazenamento refrigerado (1, 14 e 28 dias).	117
Tabela 4: Viabilidade de <i>E. faecium</i> SJRP20 e SJRP65 (log UFC/mL) sob condições simuladas do TGI durante o armazenamento.	118

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	17
2.	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
CAPITULO 1		21
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....		22
1.	Bactérias ácido-láticas (BAL)	22
1.1	<i>Lactobacillus</i>	24
1.2	<i>Enterococcus</i>	25
2.	Probióticos.....	27
2.1	Contribuições dos probióticos para saúde: mecanismos de ação.....	30
2.1.1.	Regulação da microbiota intestinal e modulação do sistema imune.....	31
2.1.2	Ação hipocolesterolêmica	32
2.1.3	Redução dos riscos carcinogênicos	33
2.1.4	Alívio dos sintomas da intolerância à lactose	33
2.1.5	Alívio da ocorrência de diarreias	34
2.2	CrITÉrios para avaliação de cepas probióticas	36
2.3	Estudo da segurança de cepas probióticas	37
3.	Leite fermentado.....	38
CONSIDERAÇÕES FINAIS		40
REFERENCIAS		42
CAPÍTULO 2		50
Screening for novel potential probiotic <i>Lactobacillus</i> spp. and <i>Enterococcus</i> spp. strains		51
ABSTRACT		51
1.	INTRODUCTION.....	52
2.	MATERIALS AND METHODS	53
2.1.	LAB strains.....	53
2.2.	Evaluation of the probiotic potential	54

2.2.1. Bile salts hydrolase (BSH) activity	54
2.2.2. Auto-aggregation and co-aggregation assay.....	54
2.2.3. Cell surface hydrophobicity	55
2.2.4. Tolerance to pH and NaCl.....	56
2.3. Safety of the LAB strains	56
2.3.1. Mucin degradation.....	56
2.3.2. Susceptibility to antibiotics	57
2.4. Selection of potential probiotic strains	57
2.5. Tolerance to simulated GIT conditions	57
2.6. Adherence to Caco-2 cells.....	58
2.7. β -galactosidase enzyme activity	59
2.8. Confirmation of the presence of genes implicated in adhesion, aggregation and colonization, and genes encoding virulence factors, antibiotic resistance and biogenic amines production	60
2.9. Statistical Analyses.....	60
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	60
3.1. Evaluation of the probiotic potential	60
3.1.1. Bile salts hydrolase (BSH) activity	60
3.1.2. Auto-aggregation and co-aggregation properties	62
3.1.3. Cell surface hydrophobicity	67
3.1.4. Tolerance to pH and NaCl.....	68
3.2. Safety of LAB strains	72
3.2.1. Mucin degradation.....	72
3.2.2. Susceptibility to antibiotics	73
3.3. Selection of LAB strains for additional tests.....	77
3.4. Tolerance to simulated GI tract conditions	77
3.5. Adherence to caco-2 cells.....	79
3.6. β -galactosidase enzyme activity	79
3.7. Presence of genes implicated in adhesion, aggregation and colonization, and genes encoding virulence factors and antibiotic resistance	80
4. CONCLUSION	88
REFERENCES	89
CAPITULO 3	101
Comportamento de <i>Enterococcus faecium</i> potencialmente probióticos em leite.....	102
RESUMO	102

ABSTRACT	104
1. INTRODUÇÃO	106
2. MATERIAL E MÉTODOS	108
2.1. Leite reconstituído	108
3.0. RESULTADOS	113
3.1. Parâmetros cinéticos de acidificação	113
3.2. Composição centesimal de leite fermentado com <i>E. faecium</i> SJRP20 e SJRP65	115
3.3. Sobrevivência de <i>E. faecium</i> sob condições simuladas do TGI	117
3.4. Capacidade de sequestro de radicais livres	120
4.0 CONCLUSÃO	125
REFERENCIAS	125
CONCLUSÃO GERAL	131

1. INTRODUÇÃO GERAL

As bactérias ácido-láticas (BAL) estão amplamente distribuídas na natureza; são encontradas naturalmente em diversos alimentos: produtos lácteos, vegetais, grãos, carnes e derivados, e podem também ser habitantes dos tratos gastrointestinal, respiratório superior e urogenital inferior de diferentes espécies animais (RESENDE et al., 2011). Nos alimentos, auxiliam nas características sensoriais, funcionais e de bioconservação destes produtos. Tais bactérias utilizam, preferencialmente, a lactose como fonte de carbono.

Algumas espécies de BAL apresentam efeito benéfico sobre a microbiota intestinal e as funções fisiológicas do trato intestinal humano, sendo consideradas probióticas. Embora um grande número de gêneros e espécies de bactérias possa ser considerado potencialmente probiótico para uso comercial, as cepas de bactérias ácido-láticas são as mais importantes (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Dentre os diversos gêneros que integram este grupo, destacam-se na produção de alimentos funcionais: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, o gênero *Enterococcus*, com destaque para a espécie *E. faecium*, que tem sido isolada do trato gastrointestinal de humanos saudáveis (SILVA et al., 2015).

Os produtos contendo bactérias probióticas são considerados funcionais e a indústria de laticínios é a que apresenta maior disponibilidade de alimentos com probióticos, como iogurtes, leites fermentados e bebidas lácteas fermentadas (RAMOS et al., 2013). Estas bactérias podem ser também encontradas em alimentos infantis e preparações farmacêuticas, nos quais se utilizam frequentemente culturas iniciadoras (starters) e bactérias lácticas ou bifidobactérias como aditivos ou suplementos (SACCARO, 2008). Tais bactérias desempenham várias atividades metabólicas importantes na produção de derivados lácteos, tais como glicolítica, proteolítica, lipolítica e utilização de citrato para a produção de compostos aromáticos. Estas reações promovidas pelas BAL conferem características sensoriais desejáveis, aumentam sua vida útil e a qualidade sanitária dos alimentos.

É notório o crescimento do setor de produtos lácteos fermentados com alegações nutricionais e terapêuticas associadas. Em vista disso, empresas do ramo alimentício

buscam novas linhagens de BAL com essas características. Outra tendência desta indústria é a eliminação do uso de produtos químicos sintéticos e aditivos, como os conservantes.

A escolha da cepa bacteriana probiótica para aplicação em alimentos deve seguir uma série de critérios que visam à segurança do consumidor. De acordo com FAO/WHO (2002) deve-se: conhecer a identidade da cepa; realizar testes *in vitro* de resistência à acidez gástrica, aos ácidos biliares e às enzimas digestivas, atividade antimicrobiana em relação aos patógenos; avaliar a segurança (comprovar que a cepa é segura e não está contaminada em sua forma de administração); realizar testes *in vivo* para comprovação dos efeitos sobre a saúde do hospedeiro-alvo.

Relatos têm demonstrado os efeitos dos probióticos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em diversas patologias, como: diarreias, infecções do sistema urinário, distúrbios imunológicos, intolerância à lactose, hipercolesterolemia, alergias alimentares e alguns tipos de câncer (MC FARLAND, 2000).

Na indústria é comum o uso de culturas probióticas associadas a outros tipos de culturas para a fermentação de produtos específicos. No caso dos iogurtes, as bactérias probióticas são associadas às bactérias iniciadoras (starters) *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, que aprimoram o sabor e a textura do produto em menor tempo de fermentação (SAARELA et al., 2000).

Nesse sentido, sabe-se que apesar dos diversos produtos lácteos fermentados apresentarem fases de produções similares (padronização do conteúdo de gordura, aumento dos sólidos não gordurosos do leite, homogeneização, desaeração, tratamento térmico, fermentação e envase), alguns aspectos tecnológicos devem ser observados para a manutenção da viabilidade das culturas probióticas, tais como a determinação do tipo de cultura iniciadora mais adequada, temperatura, tempo de incubação e taxa de inoculação (FARIA et al., 2006), bem como a vida de prateleira do produto e a possível produção de bacteriocinas.

Recentemente, estudos realizados no Laboratório de Leite e Derivados do IBILCE – UNESP visando o isolamento, identificação e caracterização de bactérias ácido-láticas, demonstraram potencial probiótico e produção de bacteriocinas por

algumas cepas. Pretende-se estender esse estudo para vinte cepas de BAL mesófilas, isoladas e identificadas anteriormente, a fim de se identificar novas linhagens probióticas, que sejam seguras, apresentem potenciais benefícios à saúde humana, e que possam ser utilizadas no desenvolvimento de alimentos funcionais.

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho foi organizado em três capítulos para a melhor distribuição e entendimento dos assuntos abordados. O Capítulo I consiste da Revisão Bibliográfica do tema abordado na tese. O capítulo II foi redigido na forma de um artigo científico a ser submetido à publicação em periódico internacional classificado pelo Qualis B1 e trata da “Avaliação do potencial probiótico e segurança de BAL”. O capítulo III foi redigido em português, na forma de um artigo científico. Será feita a versão deste capítulo para o inglês para ser submetido à publicação em periódico internacional classificado pelo Qualis e trata da “Aplicação de *E. faecium* potencialmente probiótico em leite”.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial probiótico e a segurança de cepas de BAL, isoladas de queijo muçarela de búfala, bem como avaliar o comportamento de cepas selecionadas em leite.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o potencial probiótico das cepas pela atividade de hidrólise de sais biliares, auto-agregação, co-agregação, hidrofobicidade, tolerância a diferentes valores de pH e concentrações de NaCl.
- Avaliar a segurança das cepas pelas análises de degradação da mucina e sensibilidade a antibióticos.
- Selecionar cepas seguras e com elevado potencial probiótico para realizar testes adicionais de tolerância às condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI), aderência às células Caco-2, produção de β -galactosidase e presença de genes de virulência.
- Avaliar o comportamento das cepas selecionadas em leite: perfil de acidificação, viabilidade das cepas durante a estocagem, resistência às condições simuladas do trato gastrointestinal e capacidade de sequestro de radicais livres.

CAPITULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Bactérias ácido-láticas (BAL)

As bactérias ácido-láticas (BAL) são encontradas normalmente em produtos lácteos, bebidas, carnes, legumes e na microbiota natural dos tratos digestivo, respiratório superior e urogenital inferior dos animais. Elas compreendem a classe mais representativa de organismos probióticos e desempenham papel importante durante o processo de elaboração dos produtos fermentados, tais como: produção de ácido lático, redução do teor de lactose, melhorias nas características tecnológicas (sensorial, física e química) e melhoria na segurança alimentar (JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014).

As BAL são bactérias Gram-positivas e compreendem 13 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY et al., 2005). São considerados ainda, os gêneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella* e *Melissococcus* (CROWLEY; MAHONY; VAN SINDEREN, 2013). Estas bactérias constituem um grupo de micro-organismos muito heterogêneos, incluindo bastonetes e cocos, imóveis, catalase-negativos, não esporulados, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos, incapazes de hidrolisar gelatina, de produzir sulfeto de hidrogênio e os citocromos estão ausentes, o que impede a produção de energia via respiração (TORO, 2005). De acordo com a temperatura ótima de desenvolvimento, são definidos como mesofílicos (20-40 °C) ou termofílicos (40-50 °C). A maioria destas bactérias é inativada em temperaturas superiores a 70 °C.

As bactérias Gram-positivas são divididas em duas grandes classes filogenéticas: *Firmicutes* e *Actinomycetes*, com base em comparações do conteúdo de guanina + citosina (G + C) da sequência do DNA ribossomal. A classe *Firmicutes* abrange as bactérias cuja composição do DNA contém baixo conteúdo do par G + C. A classe *Actinomycetes* compreende as bactérias com conteúdo G + C superior a 50%. As bactérias do gênero *Bifidobacterium* exibem um conteúdo relativamente elevado de guanina + citosina (G + C) e, portanto, pertencem à classe das Actinobactérias. Por

outro lado, os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* contém baixo conteúdo de G + C e estão incluídos no filo *Firmicutes* (FRANCIOSI et al., 2008; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

As BAL são consideradas nutricionalmente exigentes, pois precisam de nutrientes específicos, tais como aminoácidos e vitaminas (SALMINEN; VON WRIGHT; OUWEHAND, 2004). Com relação ao metabolismo dos carboidratos, classificam-se como homofermentativas ou heterofermentativas. As homofermentativas utilizam a via Embden-Meyerhof-Parnas (ou via glicolítica) para transformar o carbono principalmente em ácido lático. Por outro lado, as bactérias heterofermentativas utilizam a via da 6-fosfogluconato/fosfoacetolase ou via das pentoses fosfatos para produzir além do ácido lático, CO₂, etanol, acetato e citrato a partir da glicose (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Estas bactérias são classificadas de acordo com suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, além de suas propriedades funcionais. Estudos laboratoriais *in vitro* para caracterização e seleção bacteriana para aplicação em alimentos levam em consideração os seguintes parâmetros: origem, segurança, capacidade de tolerar o baixo pH do suco gástrico e a bile, atingir o local de ação em um estado fisiológico viável, capacidade de adesão e colonização do TGI, produção de substâncias antimicrobianas, capacidade de estimular ação imune no hospedeiro e influenciar as atividades metabólicas, tais como a produção de vitamina (HILMI, 2010), além da capacidade de produzir gás, compostos aromáticos e voláteis.

Na fabricação de produtos lácteos fermentados são empregadas principalmente as BAL do gênero *Lactobacillus*. São também utilizadas bactérias do gênero *Bifidobacterium*, que apesar de não pertencerem ao grupo filogenético das BAL, compartilham características fisiológicas, bioquímicas e também alguns nichos ecológicos, como o TGI, com as BAL típicas (VASILJEVIC; SHAH, 2008). No processo de fermentação do leite, ocorre a acidificação e consequente redução do valor de pH, que reduz o crescimento de bactérias nocivas, tanto à qualidade do produto como à saúde humana (FARIA et al., 2006).

Na indústria de alimentos, em geral, são utilizadas bactérias de seis gêneros: *Lactococcus* (leite), *Lactobacillus* (leite, carne, vegetais e cereais), *Leuconostoc* (vegetais, leite), *Pediococcus* (vegetais, carne), *Oenococcus* (vinho) e *Streptococcus thermophilus* (leite) (INÊS et al., 2008).

1.1 *Lactobacillus*

Dentre as espécies de bactérias ácido-láticas mais utilizadas como probióticas grande destaque deve ser dado às bactérias do gênero *Lactobacillus*. Bactérias deste gênero pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família *Lactobacillaceae* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004).

Este é o mais numeroso gênero, compreendendo 106 espécies descritas, e a divisão baseia-se nas suas características fermentativas. Os *Lactobacillus* homofermentativos são: *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* e *Lb. salivarius*. As espécies obrigatoriamente heterofermentativas são: *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum* e *Lb. reuteri*. Dentre os *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos, destacam-se: *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus* (SALMINEN, VON WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

Os lactobacilos apresentam-se em formato de bastonetes, são mesófilos, não esporulados, acidúricos e se desenvolvem bem no intestino delgado (ROBINSON, 2002).

Dentre as várias espécies de *Lactobacillus*, *Lb. acidophilus* é a mais utilizada para aplicação em alimentos, está naturalmente presente na microbiota intestinal e no trato urogenital humano. Destaca-se por proteger o organismo da invasão de patógenos, auxilia na digestão da lactose, aumenta o valor nutricional dos alimentos devido à síntese de nutrientes, estimula a resposta imune intestinal e regula os níveis de colesterol no organismo (SACCARO, 2008).

O comportamento de lactobacilos probióticos em co-cultura com outras BAL tem sido estudado. Kruger et al. (2008) estudaram o perfil de acidificação e a inter-relação entre *St. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* e *Bifidobacterium*, na forma de cultura mista, numa formulação contendo 30% de extrato hidrossolúvel de soja, 36,6% de leite de vaca e 33,3% de soro de leite, para a produção

de uma bebida fermentada sabor morango. O produto fermentado apresentou estabilidade por 28 dias em suas características microbiológicas, porém, as características sensoriais foram afetadas por sua evidenciada acidez. Esse aumento da acidez foi atribuído ao *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; estudos demonstraram que esta bactéria prejudica a sobrevivência de outras BAL, por ser muito acidificante. Geralmente o *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é utilizado associado a outras culturas iniciadoras (KRUGER et al., 2008).

1.2 *Enterococcus*

Enterococcus sp. são bactérias Gram-positivas, catalase-negativas, que podem ser encontradas isoladas, aos pares ou em cadeias curtas, são anaeróbias facultativas, crescem bem em ampla faixa de temperatura (10 °C a 45 °C), na presença de 6,5% de cloreto de sódio e hidrolisam esculina na presença de sais biliares, podem sobreviver durante 30 minutos em temperaturas de 60 °C, bem como suportar ampla variação de pH (CORRÊA; FUENTEFRÍA; CORÇÃO, 2005). Inicialmente pertenciam ao gênero *Streptococcus* (estreptococos do grupo D). Da família *Enterococcaceae*, o gênero *Enterococcus* é amplamente distribuído na natureza e compreende 54 espécies (EUZÉBY, 2015), sendo *E. faecium* e *E. faecalis* as mais conhecidas.

Estas bactérias são naturalmente encontradas nos tratos gastrointestinal, geniturinário e cavidade oral de humanos e animais, fazem parte da microbiota de diversos alimentos, principalmente produtos lácteos, são também encontrados no solo, na água, em vegetais e em ambientes contaminados. O uso de bactérias deste gênero na redução da incidência de doenças, tal como invasão do rotavírus, e na redução do colesterol, tem trazido resultados satisfatórios, uma vez que estas bactérias ativam as enzimas hepáticas e agem no organismo de forma mais acentuada (REDONDO, 2008).

Enterococcus sp. estão sendo utilizados com sucesso na indústria alimentícia, estão sendo utilizados na maturação de queijos para melhorar a qualidade sensorial, em produtos lácteos são utilizados para melhoria dos atributos tecnológicos, do sabor e para ajudar na conservação, evitando o crescimento de patógenos (GIRAFÁ, 2003).

Estudos têm demonstrado o potencial probiótico de várias cepas de *Enterococcus* sp.; estes micro-organismos atuam na melhoria do equilíbrio microbiano no intestino e no tratamento de gastroenterites em humanos e animais (BAMWO; SANNI; TAN, 2012). Há espécies de *Enterococcus* com longa história de uso seguro no processamento de alimentos e são de grande interesse biotecnológico, devido à produção de bacteriocinas, além de outras características probióticas (REDONDO, 2008).

Apesar de várias pesquisas terem demonstrado a importância dos *Enterococcus* na fermentação de alimentos, garantindo a qualidade sensorial dos produtos, seu uso ainda é muito controverso. Alguns estudos, entretanto, demonstram que estes micro-organismos podem agir como patógenos emergentes, pois existe o risco de transferência de genes de virulência, e de resistência antimicrobiana para outros micro-organismos presentes no trato gastrointestinal (OUWEHAND et al., 2001). Algumas espécies foram identificadas como patógenos oportunistas no trato urinário (FRANZ; HOLZAPFEL; STYLES, 1999). Em função disso, vários estudos vêm sendo conduzidos visando demonstrar não só as características probióticas do *E. faecium*, mas, principalmente, a sua inocuidade em relação à saúde do consumidor.

Estudos desenvolvidos por Bamwo, Sanni e Tan (2012) demonstraram o potencial probiótico (tolerância ao pH e à bile, capacidade de hidrólise de sais biliares, capacidade de adesão, atividade hemolítica) e a atividade antimicrobiana (produção de bacteriocinas) das cepas *Enterococcus faecium* CM4 e CM1, isolados de leite de vaca. Além disso, testes de segurança (susceptibilidade à antibióticos) foram realizados e as cepas foram consideradas seguras. Essas cepas apresentaram características satisfatórias para utilização na indústria alimentícia, mas os autores afirmam que outros testes de segurança precisam ser realizados.

O potencial probiótico e a capacidade de produção de compostos antimicrobianos por *Enterococcus durans* LAB18s, foram avaliados por Pieniz et al. (2014). A cepa demonstrou tolerância em baixos valores de pH, e capacidade de sobrevivência na presença e ausência de sais biliares, não apresentou atividade hemolítica, e foi capaz de inibir o crescimento dos patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* e

Corynebacterium fimi. Além disso, *E. durans* LAB 18s apresenta características satisfatórias para uso na suplementação alimentar.

2. Probióticos

Os alimentos probióticos são normalmente definidos como produtos que contêm micro-organismos não patogênicos viáveis, capazes de conferir benefícios de saúde ao hospedeiro. Existem efeitos gastrointestinais específicos de probiótico, tais como o alívio de doenças inflamatórias intestinais, redução da diarreia aguda em crianças, diminuição do colesterol, produção de bacteriocinas e imunomodulação (ADAMS, 2010).

De acordo com 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” (ANVISA, 2008). De acordo com a FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/ World Health Organization, 2002), probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que oferecem benefícios ao organismo quando ingeridos em quantidades adequadas”.

Estudos da sobrevivência de cepas no intestino humano levaram a modificações na definição de probióticos, sendo considerados probióticos: “Os organismos que, quando ingeridos em quantidades adequadas como única cepa ou a combinação de diferentes cepas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (NAIR; TAKEDA, 2010).

Embora existam várias definições para o termo probiótico, em 2014 um grupo de especialistas revisou os termos. Um alinhamento internacional foi necessário para evitar que tais definições abram margens para novas interpretações que induzam os consumidores ao erro; assim, a definição da FAO/WHO, é ainda a mais aceita (HILL et al., 2014).

Para garantir um efeito contínuo, os probióticos devem ser ingeridos diariamente. Mudanças positivas na composição da microbiota intestinal devem ser

observadas com doses de 100 g de produto contendo 10^9 UFC de micro-organismos probióticos (10^7 UFC/g de produto), geralmente com a administração durante o período de 15 dias (SAAD, 2006). A capacidade do micro-organismo permanecer viável e efetivo na região-alvo deve ser estudada e confirmada para cada cepa ou ainda, para cada tipo de produto comercializado (VANDENPLAS; HUYS; DAUBEC, 2015).

Os efeitos benéficos dos probióticos são os principais fatores que estimulam as indústrias aumentarem a busca por cepas de bactérias probióticas para aplicação em diversos alimentos. Os micro-organismos usados como probióticos representam tipos diferentes tais como bactérias, leveduras ou bolores. No entanto, existem espécies de bactérias mais comumente utilizadas em cada gênero (AMARA; SHIBL, 2015), tais como:

- Do gênero *Lactobacillus*, são usadas as cepas das espécies: *acidophilus*, *sporogenes*, *plantarum*, *rhamnosus*, *delbrueckii*, *reuteri*, *fermentum*, *lactis*, *cellobiosus*, *brevis*, *casei*, *farciminis*, *paracasei*, *gasseri*, *crispatus*;
- Do gênero *Bifidobacterium*, usa-se comumente: *bifidum*, *infantis*, *adolescentis*, *longum*, *thermophilus*, *breve*, *lactis*, *animalis*;
- Do gênero *Streptococcus*, são usadas as espécies: *lactis*, *cremoris*, *salivarius*, *intermedius*, *thermophilus*, *diacetylactis*;
- Do gênero *Leuconostoc*: usa-se o *Leuc. mesenteroides*;
- Do gênero *Enterococcus*: usa-se o *E. faecium*;

Dentre as leveduras e bolores, usam-se mais comumente: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Candida pintolopesii*.

As BAL são as principais representantes dos probióticos usados pela indústria alimentícia (JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008). Estas são geralmente consideradas organismos GRAS (“*Generally Recognized As Safe*”), pelo longo período de uso seguro na produção de vários alimentos, além de possuírem potenciais benefícios nutricionais (INÊS et al., 2008).

Os benefícios apresentados por alimentos contendo cepas de BAL probióticas têm contribuído para a elevação da procura e consumo de alimentos funcionais. No

Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os alimentos funcionais através das resoluções: ANVISA nº 18/99 e 19/99, que preconizam que “o alimento ou o ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos e ou manutenção geral da saúde no que diz respeito ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes e à redução do risco de doenças, não sendo permitidas alegações de saúde que façam referências à cura ou prevenção de doenças” (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b). Esses alimentos devem ser enquadrados e registrados na categoria de alimento com alegações de propriedades funcionais e de saúde ou na categoria de substâncias biativas e probióticos isolados (BRASIL, 2016).

Os produtos com perfil probiótico desencadeiam um grande crescimento econômico em diversas regiões do mundo (PIRES et al., 2015). Os leites fermentados e os iogurtes probióticos são os principais alimentos funcionais comercializados (SANGWAN et al., 2011). O consumo de produtos lácteos funcionais foi pioneiro no Japão, e em 2004, já havia mais de 50 tipos de diferentes produtos probióticos disponíveis no mercado (SHAH, 2004).

No Brasil, o primeiro registro de patente de produto probiótico (BR 860411) foi em 1987; nos EUA, em 2004 já havia um crescimento deste mercado, mas o apogeu foi em 2011 (PIRES et al., 2015). Em 2007, no Brasil, os produtos lácteos funcionais foram responsáveis por 1% (US\$ 500 milhões) do total de vendas de alimentos, sendo a maior parte deste mercado (65%), composta por produtos probióticos (GRANATO et al., 2010). Em 2011, o mercado de iogurtes cresceu 10%, o equivalente a R\$ 5 bilhões (PIRES et al., 2015).

As bebidas lácteas apresentaram um aumento de registros e patentes de 2,5% entre 2008 e 2011, e a América Latina responsável por 0,8% do total registrado (LIBBY COSTIN, 2012). Dentre os países da América Latina, o Brasil ocupa o 2º lugar em registros de produtos probióticos e prebióticos, perdendo apenas para o México, com 57 registros até 2015 (PIRES et al., 2015).

2.1 Contribuições dos probióticos para saúde: mecanismos de ação

Os mecanismos através dos quais os probióticos exercem efeitos benéficos são ainda pouco esclarecidos, e ainda há muitos pontos de investigação em aberto. No entanto, os probióticos estão envolvidos na modificação do pH do intestino, antagonizam patógenos pela produção de compostos antimicrobianos, competem com os patógenos por ligação a receptores locais, bem como por nutrientes disponíveis e fatores de crescimento (AMARA; SHIBL, 2015), levando à prevenção de infecções e melhoria da microbiota intestinal (LUGIOYO et al., 2003).

Um dos mecanismos de ação dos probióticos é a capacidade de aderir à mucosa do TGI, garantindo sua sobrevivência e colonização nesse ecossistema. A adesão impede a expulsão das células probióticas, e permite a colonização temporária, a modulação imunológica e a redução da incidência de patógenos no organismo por exclusão competitiva (ADRIANA et al., 2016).

Dois fatores são necessários para adesão bacteriana à célula ou ao tecido do hospedeiro: um receptor (carboidrato específico ou um peptídeo) e um ligante (estrutura de superfície ou macromolécula). Inicialmente a adesão bacteriana é baseada em interações físicas não específicas no receptor, em seguida, ocorrem ligações específicas (adesinas) entre o ligante e receptores complementares. Quanto maior a capacidade de adesão bacteriana, maior será o efeito sobre a saúde do hospedeiro (ADRIANA et al., 2016).

Outra forma de ação dos probióticos na prevenção de doenças e na manutenção do bom estado de saúde do indivíduo é a produção de substâncias bioativas, tais como vitaminas, ácido linoléico conjugado, peptídeos bioativos, ácido gama-aminobutírico (GABA), entre outras (FERNÁNDEZ et al., 2015). Algumas cepas de BAL probióticas inibem o crescimento de micro-organismos indesejáveis e patogênicos nos alimentos pela produção de substâncias antimicrobianas, tais como: ácidos orgânicos e bacteriocinas (PENNA et al., 2015).

Os principais efeitos atribuídos aos probióticos são: regulação da microbiota intestinal e redução do risco de câncer do colón, do nível de colesterol sérico e da

ocorrência de diarreias (NAGPAL et al., 2012; FONTANA et al., 2013). Está associado também à ação de probióticos: alívio dos sintomas de intolerância à lactose e modulação do sistema imune (REID, 2012).

2.1.1. Regulação da microbiota intestinal e modulação do sistema imune

Os micro-organismos probióticos estimulam o crescimento de outros micro-organismos, modulam a microbiota da mucosa e a imunidade sistêmica, melhoram a nutrição e o equilíbrio microbiano no trato intestinal do hospedeiro. O tipo e número de espécies da microbiota intestinal são determinados por uma combinação de fatores (KOTZAMPASSIA; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2012). O aumento às respostas imunitárias não específicas pelas BAL probióticas, ocorrem por meio da ativação de macrófagos, do aumento dos níveis de citoquinas, do aumento da atividade das células natural *killer* e/ou do aumento dos níveis de imunoglobulinas (KAILASAPATHY, 2013).

Além disso, as BAL probióticas auxiliam a digestão pela produção de enzimas digestivas e estimulam o sistema imunológico. Podem também melhorar a disponibilidade de nutrientes no intestino devido às enzimas exógenas segregadas no TGI ou por enzimas endógenas disponíveis nas células bacterianas, que são liberadas quando são lisadas pelo efeito do ambiente ácido do estômago dos hospedeiros. Ambos os tipos de enzimas podem aumentar a atividade digestiva e a degradação de vários compostos que não são digeridos naturalmente pelo organismo (MARENGONI; ALBUQUERQUE, 2015).

O consumo de produtos contendo *Lb. acidophilus* e *B. bifidum* tem a potencialidade de melhorar os movimentos peristálticos do intestino, aumentando a absorção de nutrientes, prevenindo ou controlando infecções intestinais, bloqueando os receptores dos patógenos, inativando os efeitos das enterotoxinas e favorecendo o desenvolvimento de micro-organismos resistentes a patógenos, especialmente contra *Escherichia coli* (LEE et al., 1999).

Algumas alergias estão associadas a uma falha fundamental de regulação imune subjacente. 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 (ALMEIDA JUNIOR, 2015). O uso de probióticos no tratamento e na prevenção de alergias permite uma melhor estimulação do sistema imune, para seu funcionamento de forma adequada. A ação do probiótico no controle de alergias depende da cepa utilizada, bem como do tempo de administração desses probióticos (PELUCCHI et al., 2012).

2.1.2 Ação hipocolesterolêmica

O interesse da utilização de BAL e bifidobactérias no tratamento dietético da hipocolesteremia tem crescido. Jones et al. (2013) relataram em seus ensaios clínicos que o consumo de produtos probióticos levou a diminuição dos níveis de colesterol e de lipídios nos consumidores.

A ação de redução dos níveis de colesterol, deve-se a atividade hidrolase de sais biliares (BSH) de algumas cepas (KUMAR et al., 2012; JONES et al., 2013), os ácidos biliares são conservados eficientemente em condições normais por um processo denominado recirculação entero-hepática. Quando os níveis de colesterol estão elevados, há uma maior eliminação de ácidos biliares desconjugados nas fezes; nesses indivíduos, a atividade BSH de algumas BAL, leva a síntese de sais biliares no fígado em resposta homeostática, ocasionando uma redução dos níveis de colesterol sérico (KUMAR et al., 2012) .

Diferentes cepas do gênero *Bifidobacterium* foram avaliadas quanto à capacidade de assimilação do colesterol e a capacidade de hidrólise de sais biliares. Duas cepas identificadas *B. bifidum* (MB 107 e MB 109) foram capazes de reduzir os níveis de colesterol em ratos hipercolesterolêmicos em 81 e 50 mg de colesterol/grama de biomassa, respectivamente. Além disso, a maioria das cepas foi capaz de hidrolisar os sais de ácidos testados, e esta atividade foi diretamente relacionada à redução dos níveis de colesterol. Foi possível demonstrar ainda, neste ensaio que houve redução dos níveis

de colesterol total e do LDL, mas os níveis de HDL, não foram afetados (BORDONI et al., 2013).

2.1.3 Redução dos riscos carcinogênicos

Alguns estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, utilizando animais de laboratório, demonstraram resultados satisfatórios do efeito anticancerígeno com o uso de probióticos (KAILASAPATHY, 2013; SERBAN, 2014).

Segundo Erdman e Poutahidis (2017), os probióticos modulam o sistema imune, melhoram o funcionamento intestinal, garantem a saúde, e consequentemente, reduzem os riscos de incidência de câncer, e o surgimento de inflamações intestinais. Além disso, a interação da microbiota intestinal com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pode influenciar os estados psicológico e fisiológico do hospedeiro.

Os organismos probióticos apresentam importante atividade proteolítica, com produção de peptídeos com alta capacidade antioxidante ou antimutagênica. Os peptídeos gerados por fermentação de diferentes BAL probióticas podem contribuir com uma variedade de compostos bioativos, que podem ter efeito positivo na saúde humana. Esses peptídeos podem ser utilizados comercialmente em novos produtos, ou na produção de novos peptídeos anticancerígenos (SAH et al., 2014).

2.1.4 Alívio dos sintomas da intolerância à lactose

A β -galactosidase (lactase) é uma enzima produzida por alguns micro-organismos quando estão aderidos à membrana da mucosa do intestino delgado. Esta enzima realiza a hidrólise da lactose ingerida, em glicose e galactose, que são facilmente absorvidas na corrente sanguínea (SHIBY; MISHRA 2013). Um organismo com deficiência de produção da β -galactosidase, apresenta dificuldades de hidrólise da lactose e a sua consequente absorção pelo intestino. Assim, uma vez ingerida, a presença da lactose não-hidrolisada causa um significativo aumento da pressão osmótica das células, atraindo água e eletrólitos. Isso acarreta em uma dilatação intestinal, e consequentemente, aumenta a velocidade do trânsito da lactose para o colón, onde ela

sofrerá fermentação por bactérias microbianas, resultando em gases CO₂ e H₂, fezes acidificadas, distensão abdominal e hiperemia perianal (OLIVEIRA, 2013).

Uma vez que algumas culturas de BAL podem produzir a enzima β -galactosidase, esta propriedade é considerada importante para a indústria de laticínios e pode ser explorada de modo a ajudar os consumidores intolerantes à lactose. Além disso, durante a fermentação, as BAL, utilizam lactose como fonte de energia, assim a quantidade de lactose torna-se reduzida nos produtos fermentados (PENNA et al., 2015). A β -galactosidase bacteriana resiste às condições adversas do trato gastrointestinal, estando viável no duodeno e íleo, garantindo assim a hidrólise da lactose no intestino, aliviando os sintomas da intolerância à lactose (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

A fermentação da lactose e o aumento do teor de β -galactosidase foram observados *in vitro* por ação de *Lb. acidophilus* e *B. longum*. *S. thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* presentes no iogurte também compensam a insuficiência de β -galactosidase no organismo, aumentando, assim, a digestão da lactose, e diminuindo o tempo de trânsito gástrico. No entanto, avaliações sistemáticas indicam que os potenciais benefícios terapêuticos nestas condições são restritos a cepas específicas (PANDE et al., 2012).

2.1.5 Alívio da ocorrência de diarreias

Diferentes cepas de *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. reuteri*, *S. boulardii* e *Bifidobacterium* sp. são comumente usados para aliviar os sintomas da diarreia (TOMAS et al., 2004). Essas bactérias competem com os patógenos causadores das diarreias, impedindo que estes micro-organismos se instalem no epitélio intestinal, ou ainda pela produção de bacteriocinas, tais como a nisina. O *Lb. reuteri* DSM 17948 reduziu significativamente os sintomas de diarreia aguda em crianças hospitalizadas. Com a administração diária de 1×10^8 UFC do *Lb. reuteri* DSM 17948, os benefícios foram observados logo após 24 horas de ingestão do produto (DINLEYICI et al., 2015).

Estudos realizados por Tian et al. (2014) utilizando as cepas probióticas: *L. plantarum*, *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, demonstraram que tais

cepas ajudaram a fortalecer a resistência à colonização por bactérias fecais, suprimir a multiplicação de patógenos oportunistas e restaurar o equilíbrio da microbiota em camundongos BALB/c.

A dose de probióticos necessária varia muito em função da cepa e do produto. Embora a legislação exija uma quantidade mínima viável em torno de 10^7 log UFC/g ou mL de produto, em alguns alimentos, as cepas bacterianas mostraram-se eficazes em níveis mais baixos, enquanto que outras exigem quantidades maiores. *Bifidobacterium infantis* 35624 foi eficaz para aliviar os sintomas da Síndrome do Intestino Irritado (SII) na dosagem de 100 bilhões de UFC/dia, enquanto existem estudos com VSL#3 (mistura de cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus*, e *Bifidobacterium*) que utilizaram sachês com 300–450 bilhões de UFC três vezes ao dia. Sendo assim, não é possível estabelecer uma dose geral para os probióticos; a dosagem tem que estar baseada em estudos em humanos que mostrem um benefício para a saúde (GUARNER et al., 2011).

Inúmeras pesquisas já demonstraram os benefícios do consumo de probióticos viáveis à saúde do homem, citados anteriormente, porém, Adams (2010) relata esses efeitos positivos também no consumo de células probióticas mortas. Ele alega que as células mortas irão estimular o sistema de defesa do indivíduo, incluindo a modulação da resposta imune. Além disso, tais células mortas estimulam a produção de imunoglobulinas na mucosa e na parede intestinal, bucal ou urogenital dos consumidores. Alega, ainda, que muitas linhagens probióticas não resistem ao período de estocagem e nem a passagem do trato gastrointestinal, mas os metabolitos produzidos por elas, irão também conferir benefícios ao hospedeiro.

Almada et al. (2016) definiram como paraprobióticos, as células probióticas inativas, ou subprodutos metabólicos desses micro-organismos, que conseguem modificar a resposta biológica do hospedeiro. Os paraprobióticos são originados de células que perderam completamente sua viabilidade após serem expostas a fatores que levam a danos celulares, tais como ruptura do filamento de DNA, das membranas celulares ou danos mecânicos ao envelope celular. A ação dos probióticos sobre o hospedeiro apresentou resultados satisfatórios, mas, a elucidação dos mecanismos de ação de paraprobióticos, incluindo a determinação de compostos ativos específicos

responsáveis pelos efeitos benéficos, ainda não foram explicados, e são fundamentais para a legalização do uso dos paraprobióticos nos alimentos e também sua regulação por autoridades competentes.

2.2 Critérios para avaliação de cepas probióticas

Cepas de bactérias probióticas quando utilizadas na alimentação, deve conseguir não apenas sobreviver à passagem por meio do aparelho digestivo e mostrar sobrevivência ao ácido e à bile, mas ser capazes de proliferar no intestino. Os probióticos devem exercer seus benefícios sobre o hospedeiro por meio do crescimento e/ou da atividade no corpo humano (VANDENPLAS; HUYS; DAUBEC, 2015).

São vários os critérios que devem ser considerados na seleção de cepas microbianas para serem utilizadas como probióticas: além das características desejáveis aos produtos, devem ser considerados aspectos de segurança alimentar, mecanismos de ação, sobrevivência às condições do TGI e tolerância ao baixo pH do suco gástrico e ao sal, mesmo que temporariamente, adesão e colonização do epitélio intestinal, impedindo, dessa forma, o desenvolvimento de patógenos e realçando a imunidade inata (OLIVEIRA; DAMIN, 2003). Estes micro-organismos devem, ainda, resistir à ação da bile e das secreções produzidas no pâncreas e no intestino (COPPOLA; TURNES, 2004). Além das características desejáveis, os probióticos devem ser inócuos, manter-se viáveis no produto por longo tempo durante o transporte e estocagem refrigerada.

Esses micro-organismos devem ser capazes de inibir o crescimento de organismos patogênicos através da produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas e desconjugação de sais biliares (REDONDO et al., 2007; REDONDO, 2008), ou simplesmente por exclusão competitiva.

Adicionalmente, as cepas devem ser seguras para o consumo, não transmitindo genes de resistência a antibióticos e possuir propriedades anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas (COPPOLA; TURNES, 2004), bem como não apresentar genes de virulência e não afetar a mucosa intestinal.

2.3 Estudo da segurança de cepas probióticas

De acordo com a ANVISA, antes da liberação de um produto probiótico para consumo, vários testes devem ser feitos não apenas para comprovar a eficácia da(s) cepa(s) utilizada(s), mas também, que garantam a melhora e a saúde do consumidor. As alegações de segurança e eficácia referem-se a: 1. Caracterização do micro-organismo (identificação do gênero e da espécie da cepa; informação sobre o depósito da cepa em bancos de culturas internacionais e reconhecidos; origem e forma de obtenção do micro-organismo, incluindo informações se foi geneticamente modificado; se a bactéria é produtora de toxinas ou bacteriocinas); 2. Perfil de resistência a antimicrobianos e informações sobre a base genética de resistência antimicrobiana conforme metodologia da European Food Safety Authority (EFSA, 2012); 3. Determinação da atividade hemolítica; 4. Efeitos adversos provocados pelo consumo; 5. Demonstração da eficácia do produto na melhora da saúde do consumidor; 6. Estudo da viabilidade bacteriana durante a estocagem do produto (BRASIL, 2016). Além das comprovações de segurança do alimento, as diretrizes visam que todas as alegações sejam comprovadas cientificamente, e não induzam o consumidor ao engano (BRASIL, 2016).

Os critérios clínicos que comprovem a segurança devem ser feitos não apenas com a cepa bacteriana utilizada, mas também, com os produtos prontos para consumo (VANDEPLAS et al., 2015).

De acordo com a EFSA (2012), as BAL que forem utilizadas para alimentação diária, para serem consideradas seguras para ingestão humana e animal, não devem apresentar genes de resistência aos antimicrobianos adquiridos ou transferíveis, pois esses genes podem ser transferidos aos micro-organismos patogênicos. Outra preocupação é com a capacidade aminobiogênica, pois a ingestão de aminas biogênicas produzidas por essas bactérias, mesmo que em pequenas quantidades, podem causar efeitos toxicológicos aos consumidores (RUIZ et al., 2016).

Alguns postulados devem ser avaliados para garantir os benefícios probióticos ao hospedeiro. Os mais comuns são aqueles que relacionam os probióticos com a

estrutura e funcionamento normal do corpo humano, conhecidos como “postulados de estrutura–função”, esses são considerados mais genéricos, pois não é permitido mencionar doença ou patologia, e devem ser apoiados por resultados consistentes de estudos em humanos, duplo-cego, controlados com placebo com um bom desenho experimental. Apesar dos estudos em animais e *in vitro* serem importantes para desenvolver estratégias clínicas, não são considerados suficientes para documentar os referidos postulados (GUARNER et al., 2011). O objetivo dessas regulamentações é garantir que as alegações comerciais sejam claras, com base em provas científicas, para proteger os consumidores, promover a inovação e garantir o crescimento desses produtos no mercado (TOMAS, 2016).

3. Leite fermentado

Segundo os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) leites fermentados são produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite natural, ou leite reconstituído, acidificado por bactérias lácticas, resultando em consistência e textura típicas (BRASIL, 2000).

O leite apresenta em sua composição, nutrientes necessários para o metabolismo microbiano, sendo considerado um excelente substrato para o crescimento de micro-organismos. Os diversos tipos de leite fermentado são bastante interessantes do ponto de vista tecnológico, no entanto, o crescimento de cepas probióticas e a redução do pH acontece de forma lenta, devido à baixa atividade proteolítica das bactérias fermentadoras e por isso elas estão geralmente associadas a *S. thermophilus*, assim, com o uso da combinação de deferentes bactérias lácticas e iniciadoras, é possível garantir um produto com as características tecnológicas desejáveis, com potencial nutricional e benéfico à saúde (CANDY et al., 2008). Os alimentos fermentados têm se constituído importantes componentes da dieta, devido não somente às suas características nutricionais, mas também à capacidade de reduzirem o risco de doenças crônico-degenerativas (ROSSI et al., 2003).

A relação simbiótica entre BAL probióticas e as bactérias do iogurte podem ter impacto sobre a qualidade do produto, sendo possível elaborar produtos lácteos

fermentados, com excelentes propriedades sensoriais e boa sobrevivência das BAL. Por isso, tem aumentado a diversidade destas combinações, uma vez que cada vez mais, estudos sobre as inter-relações entre as bactérias ácido-láticas estão sendo realizados (RODRIGUES; FELKL; BITENCOURT, 2013).

Dentre as linhagens utilizadas para fermentação em leites destacam-se *Lactobacillus* (*acidophilus*, *johnsonii*, *fermentum*, *casei*, *paracasei* e *rhamnosus*) e *Bifidobacterium* sp., pois estes trazem efeitos benéficos e positivos na fermentação do leite e produtos derivados (SHIBY; MISHIRA, 2013). Essas bactérias conferem aos produtos fermentados, características peculiares de sabor, aroma, viscosidade e outros aspectos sensoriais (SILVA, 2016). Champagne et al. (2010) demonstraram a ação fermentadora das cepas probióticas: *Lb. helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175, em cultura pura e em co-cultura com *S. thermophilus* ST5, e obtiveram bons resultados, demonstrando a produção de isoflavonas e vitamina B por estas bactérias, em leite fermentado de soja. Coelho et al. (2016) mostraram que o consumo diário de $1,6 \times 10^{10}$ de *Lb. casei* Shirota, vivos, em leite fermentado, foi eficiente no combate à giardíase em crianças naturalmente infectadas.

A ação fermentativa sobre os açúcares e a acidificação do leite por BAL conferem maior viabilidade destas bactérias e torna o leite fermentado um ambiente inóspito para o crescimento de outros micro-organismos, tais como os patogênicos, conferindo maior segurança para o consumo.

No leite fermentado, os micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final e durante seu prazo de validade. Devido às suas propriedades físico-químicas, o leite fermentado é considerado o melhor produto alimentício para transportar linhagens probióticas, quando comparado com outras matrizes, tais como, queijos e sorvetes (CRUZ et al., 2009; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Diversos estudos descritos na literatura usaram cepas de BAL probióticas em leites fermentados. *L. acidophilus* La-5 (Chr. Hansen) foi testado por Duarte et al. (2016) na produção de leites fermentados e a capacidade de inibir patógenos foi avaliada *in vitro*. Apesar de a matéria-prima atender aos padrões exigidos pela

legislação, a fermentação demorou 24 horas, até atingir valor de pH de 4,57 e 0,8 g de ácido láctico/100 mL. Das 30 colônias do *Lb. acidophilus* La-5 obtidas após a fermentação do leite, 26% foram capazes de inibir *E. coli*, 13,3% inibiram *L. monocytogenes* e 16,6% inibiram *S. aureus*. A atividade antimicrobiana direta produzida por *Lb. acidophilus* La-5 pode ser devido à produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono, acetaldeído ou bacteriocinas, entre outros, porém não foi confirmada a natureza do composto inibidor.

Ruiz et al. (2016) isolaram 191 culturas de colostro de cabras, sendo 30 isolados identificados como BAL. Nas BAL foram avaliados: o potencial probiótico, as propriedades tecnológicas e a segurança, para posterior aplicação em leites fermentados. Algumas BAL apresentaram boas características probióticas, com destaque para *Lac. garvieae* P27M15, que apresentaram alta resistência ao baixo pH, e *Lac. lactis* V22M11, V42M18 e V23M15, que apresentaram as melhores propriedades tecnológicas, sendo maior atividade acidificante (*Lac. Lactis* V22M11); maior atividade proteolítica (*Lac. lactis* V42M18) e maior atividade autolítica após 24 horas de incubação (*Lac. lactis* V23M15). Vários isolados de colostro de cabra apresentaram características desejáveis para aplicação na indústria alimentícia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por isolados bacterianos com potencial probiótico, para aplicação em produtos fermentados é a tendência atual em diferentes campos da Ciência e Tecnologia de Alimentos. Estas bactérias além de conferir atributos tecnológicos aos alimentos, se produzirem compostos antimicrobianos, podem ser usadas para bioconservação dos alimentos, e ainda, tem o potencial de conferir benefícios à saúde dos consumidores.

No entanto, antes da utilização de cepas probióticas em alimentos, vários critérios devem ser avaliados, tanto no que diz respeito à viabilidade bacteriana, como em relação à segurança da cepa. Alguns aspectos relacionados às características dos probióticos, mecanismos de ação e critérios de segurança foram discutidos nesta revisão. Ainda, é necessária a administração diária, por um período prolongado, para que os benefícios sejam alcançados, e os efeitos são específicos a cada indivíduo.

Apesar de muitas cepas terem sido caracterizadas como seguras e potencialmente probióticas, ainda são necessários estudos para identificação e caracterização de novas cepas, com características distintas daquelas disponíveis, e ainda, é necessária a comprovação *in vivo* dos benefícios à saúde, uma vez que esses benefícios são específicos de cada cepa.

REFERENCIAS

- ADAMS, C. A. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 37-46, 2010.
- ADRIANA, N.; ILONA, M.; KATARZYNA, S. L. E.; ZDZISŁAWA, L.; BIETA, K. E. Adherence of probiotic bacteria to human colon epithelial cells and inhibitory effect against enteric pathogens – *In vitro* study. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, p. 532-539, 2016.
- ALMADA, C. N.; ALMADA, C. N.; MARTINEZ, R. C. R.; SANT'ANA, A. S. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 96-114, 2016.
- ALMEIDA JUNIOR, W. L. G. **Seleção de bactérias do ácido láctico (BAL) autóctones de leite caprino com potencial probiótico e avaliação funcional em queijo caprino artesanal**. 2015. 113 f. Dissertação. Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina.
- AMARA, A. A.; SHIBL, A. Role of probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, p. 107-114, 2015.
- BAMWO, K.; SANNI, A.; TAN, H. Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 144, p. 229-241, 2012.
- BORDONI, A.; AMARETTI, A.; LEONARDI, A.; BOSCHETTI, E.; DANESI, F.; MATTEUZZI, D.; RONCAGLIA, L.; RAIMONDI, S.; ROSSI, M. Cholesterol-lowering probiotics: *in vitro* selection and *in vivo* testing of bifidobacteria. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, p. 8273-8281, 2013.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº18 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Poder Executivo, Brasília, DF, 1999a.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº19 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que de Procedimentos para Registro de Alimentos com Alegação de propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Poder Executivo, Brasília, DF, 1999b.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Substâncias Bioativas e Probióticos: lista de alegação de propriedades funcionais aprovadas. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegações>> Acesso em: 12 de fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Oficializar os "Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados". Resolução nº5, de 13 de Novembro de 2000. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Poder Executivo, Brasília, DF, 27 de novembro 2000. Seção 1, p. 9.

CANDY, D. C. A., HEATH, S. J., LEWIS, J. D. N., THOMAS, L. V. Probiotics for theyoungandthenotsoyoung. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, p. 215–221, 2008.

CHAMPAGNE, C. P.; TOMPKINS, T. A.; BUCKLEY, N. D.; GREEN-JOHNSON, J. M. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. **Food Microbiology**, v.27, p.968-972, 2010.

COÊLHO, M. D.G; RAMOS, L. L.; PEREIRA, R. B.; ROCHA, L. O.; LINO, F. P. S.; COÊLHO, F. A. S. Avaliação do consumo de *Lactobacillus casei* Shirota para o controle de giardíase em crianças. **Revista Patologia Tropical**, v. 45, p. 169-178, 2016.

COPPOLA, M. M; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1297-1302, 2004.

CORRÊA, A. A.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Resistência a antimicrobianos em enterococos isolados de amostras de fezes de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 155-159, 2005.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, p. 93-109, 2013.

CRUZ, A. G; BURITI, F. C. A.; SOUZA, C. H. B.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Probioticcheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food ScienceandTechnology**, v. 20, p. 344–354, 2009.

DINLEYICI, E. C.; DALGIC, N.; GUVENC, S.; METIND, O.; YASA, O.; KURUGOLF, Z.; TUREL, O.; TANIR, G.; YAZAR, A. S.; ARICA, V.; SANCAR, M.; KARBUZ, A.; ERENJ, M.; OZEN, M.; KARAI, A.; VANDENPLAS, Y. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 shortens acute infectious diarrhea in a pediatric outpatient setting. **Jornal de Pediatria**, v. 91, p. 392-396, 2015.

DUARTE, M. C. K. H.; CORTEZ, N. M. S.; MACEDO, N. C.; FRANCO, R. M. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 3, p. 1-10, 2016.

EFSA. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, p. 2740, 2012.

ELZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Enterococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>. Acesso em 12.nov.2015.

ERDMAN, S. E.; POUTAHIDIS, T. Gut microbiota modulate host immune cells in cancer development and growth. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 105, p. 28-34, 2017.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, ON, Canada, 2002.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; LE GUERROUE, J. L. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.4, p. 511-516, 2006.

FERNÁNDEZ, M.; HUDSON, J. A.; KORPELA, R.; REVES-GAVILÁN, C. G. L. Impact on human health of microorganisms present in fermented dairy products: An Overview. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-13, 2015.

FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUNOZ-QUEZADA, S.; GIL, A. Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109, Suppl. 2, p. S35-50, 2013.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CARLIN, S.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. A factoryscale application of secondary adjunct cultures selected from lactic acid bacteria during Puzzone di Moena cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 2981-2991, 2008.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H.; STYLES, M. E. *Enterococci* at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 1-24, 1999.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic outline of the procaryotes. In: Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd ed., Release 5.0), New York: Springer. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>. 2004.

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

GUARNER, F.; KHAN, A. G.; GARISCH, J.; ELIAKIM, R.; GANGL, A.; THOMSON, A. KRABSHUIS, J.; LEMAIR, T. World Gastroenterology Organization Global Guidelines: Probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.46, p. 468-481, 2011.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 215–222, 2003.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; R CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506–514, 2014.

HILMI, H. T. A. **Lactic acid bacteria and their antimicrobial peptides: induction, detection, partial characterization, and their potential applications.** 110f. Dissertation. University of Helsinki Finland - Department of Food and Environmental Sciences, 2010.

INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. Revisão: As bactérias do ácido láctico do vinho – Parte 1. **Ciência Técnica Vitivinícola**, v. 23, n. 2, p. 81-96, 2008.

JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 2005, 790p.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; PAULA, A. T. , SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; PENNA, A. L. B. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo Mozzarella cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**.v.6, p. 141–156, 2014.

JONES, M. L.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; MARTONI, C.J.; PRAKASH, S. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 13, p. 631–642, 2013.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B. P. H. J; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, v. 25, p. 745-761, 2008.

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

KOTZAMPASSIA, K.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 288– 296, 2012.

KRUGER, R.; KEMPKA, A. P.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substrato soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. **Alimentos e Nutrição**,v. 19, n. 1, p. 43-53, 2008.

KUMAR, R.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Bile salt hydrolase (BSH) activity screening of *Lactobacilli*: *in vitro* selection of indigenous *Lactobacillus* strains with potential bile salt hydrolysing and cholesterol-lowering ability. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 4, p. 162–172, 2012.

LEE, Y. K., NOMOTO, K., SALMINEN, S., GORBACH, S. L. **Handbook of probiotics**. New York: John Wiley& Sons, Inc., 1999. 211p.

LIBBY COSTIN. Innovations and trends in functional soft drinks and dairy. **Global Portfolio Marketing Director**, Tetra Pak Packaging Solutions S.p.A. p. 3-19, 2012.

LUGIOYO, G. M.; D. CABRERA; M. E. MIRAVET; R. NÚÑEZ; Y. DELGADO; H. CABRERA; J. MARTÍ. Identificación y detección de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias aisladas de la zona exclusiva económica al sur de Cuba. **Serie Oceanológica**, v. 1, p. 59-67, 2003.

MARENGONI, N. G.; ALBUQUERQUE, D. M. Quantification of intestinal bacteria, operating cost and performance of fingerlings Nile tilapia subjected to probiotics. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 43, p. 367-373, 2015.

NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; BEHARE, P. V.; JAIN, S.; YADAV, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 334, n. 1, p. 1-15, 2012.

NAIR, G. B; TAKEDA, Y. **Probiotics foods in health and disease**. New Delhi: Oxford; p. 11-89, 2010.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p 172-176, 2003.

OLIVEIRA, V. C. D. **Alergia à proteína do leite de vaca e intolerância à lactose: abordagem nutricional e percepções dos profissionais da área de saúde**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

OUWEHAND, A. C.; ISOLAURI, E.; HE, F.; HASHIMOTO, H.; BRENNO, Y.; SALMINEN, S. Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, p. 144-145, 2001.

PANDE, R.; BAGAD, M.; DUBEY, V.; GHOSH, A. R. Prospectus of probiotics in modern age diseases. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, supplement, p. 1963-1974, 2012.

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. **Epidemiology**, v. 23, p. 402-414, 2012.

PENNA, A. L. B.; DE PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; SILVA, L. F.; DIAMANTINO, V. R.; TODOROV, S. D. Overview of the functional lactic acid bacteria in fermented milk products. In: Ravishankar, R. V.; Jamuna, B. A. **Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods**. Boca Raton: CRC Press, 2015, p. 113-148.

PIENIZ, S.; ANDREAZZA, R.; ANGHINONI, T.; CAMARGO, F.; BRANDELLI, A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. **Food Control**, v. 37, p. 251-256, 2014.

PIRES, E. A.; FERREIRA, M. A.; VIEIRA, R. B.; BARBOSA, C. A.; SANTOS, F. L. Perfil dos documentos de patente referentes a tecnologias e produtos probióticos, prebióticos e simbióticos na América Latina. **Cadernos de Prospecção**, v. 8, p. 142-149, 2015.

RAMOS, A. C. S. M.; STAMFORD, T. L. M.; MACHADO, E. C. L. M.; LIMA, F. R. B.; GARCIA, E. F.; ANDRADE, S. A. C.; SILVA, G. M. S. Elaboração de bebidas lácteas fermentadas: aceitabilidade e viabilidade de culturas probióticas. **Ciências Agrárias**, v.34, p.2817-2828, 2013.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 4, p.1-7, 2010.

REDONDO, N. C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. 93f. Dissertação. (Mestrado em Alimentos e Nutrição, Área Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

REDONDO, N. C.; BEDANI, R.; PAULY, N. D.; MIGUEL, D. P.; ROSSI, E. A. Sobrevivência do *Enterococcus faecium* CRL 183 às condições do trânsito gastrointestinal. In: **7º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2007.

REID, G. Microbiology: categorize probiotics to speed research. **Nature**, v. 485, p.446-446, 2012.

RESENDE, M. F. S.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; MOREIRA, J. L. S.; NUNES, A. C.; CUNHA, A. F.; ACÚRCIO, L. B.; ANDRADE, E. H. P.; COSTA, H. H. S.; DRUMMOND, A. F. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p.1567-1573, 2011.

ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology Handbook**. New York: Wiley-Interscience, 2002. 765p.

RODRIGUES, M. X.; FELKL, G. S.; BITENCOURT, J. V. M. Importância das bactérias lácticas para a indústria de alimentos. **UNINGÁ Review**, v. 1, p. 5-14, 2013.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINE, R. C.; CARLOS, I. Z.; OLIVEIRA, M. G.; VALDEZ, G. F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Archivos Latinamericanos de Nutricion**, v.53, p. 47-51, 2003.

RUIZ, P.; BARRAGÁN, I.; SESEÑA, S.; PALOP, M. M. L. Functional properties and safety assessment of lactic acid bacteria isolated from goat colostrum for application in food fermentations. **International Journal of Dairy and Technology**, v. 69, p. 559-568, 2016.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., MÄTTÖ, J., MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p.197-215, 2000.

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 Chemistry**, v. 156, p. 264-70, 2014.

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade do leite fermentado**. 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 628p. 2004.

SANGWAN, V.; TOMAR, S. K.; SINGH R. R. B.; SINGH, A. K.; ALI B. Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. **Journal Food of Science**, v. 76, p. 58-93, 2011.

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

SHAH, N. P. Probiotics and prebiotics. **Agro-Food Industry Hi-tech**, v. 15, p. 13-16, 2004.

SHIBY, V.K.; MISHRA, H.N. Fermented milks and milk products as functional foods - A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.53, p. 482-496, 2013.

SILVA, J. G. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo minas artesanal de Araxá, Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2016.

SILVA, T. M.; RODRIGUES, L. Z.; CORDEVILLA, C. F.; SILVA, C. B.; MENEZES, C. R. Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos. **Ciência e Natureza**, v. 37, p. 49-55, 2015.

TIAN, P.; XU, B.; SUN, H.; LI, X.; LI, Z.; WEI, P. Isolation and gut microbiota modulation of antibiotic-resistant probiotics from human feces. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, p. 405-412, 2014.

TOMAS, L. V. Probiotics– the journey continues. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, p. 469-480, 2016.

TOMAS, M. S.; OTER, C. M.; OCANA, V.; NADER-MACIAS, H. M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen peroxide. **Methods in Molecular Biology**, v. 268, p. 337-346, 2004.

TORO, C. R. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune.** 173 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Universidade do Paraná, Curitiba, 2005.

VANDEPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, p. 6-21, 2015.

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

CAPÍTULO 2

**Screening for Novel Potential Probiotic *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp.
strains**

Screening for novel potential probiotic *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains

Liane Caroline Sousa Nascimento¹, Sabrina Neves Casarotti², Svetoslav Dimitrov Todorov³, Ana Lúcia Barretto Penna¹

¹ São Paulo State University - UNESP, Department of Food Engineering and Technology, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² Federal University of Mato Grosso – UFMT, Department of Food and Nutrition, 78060-900 Cuiabá, MT, Brazil.

³ Federal University of Viçosa, Department of Veterinary, 36570-900 Viçosa, MG, Brazil.

ABSTRACT

Due to the increasing search for novel probiotic bacteria strains with particular technological profile for commercial purposes, the objective of this research was to evaluate the probiotic potential and safety of twenty lactic acid bacteria (LAB) strains. The bile salts hydrolase (BSH) activity, capacity of auto-aggregation, co-aggregation with *Lactobacillus* spp. and *Listeria* spp., hydrophobicity, and tolerance of the strains in different pH values and NaCl were evaluated *in vitro*. The safety tests of mucin degradation, and susceptibility to antibiotics were also performed. Six strains presented BSH activity and most of them presented high value of auto-aggregation and hydrophobicity. Some strains presented co-aggregation capacity with other LAB and pathogens. Most of strains grew up in neutral pH values and the NaCl tolerance was temperature dependent. None of the strains degraded the mucin; however, some of them presented resistance to antibiotics. Considering the probiotic features and safety, the strains *Enterococcus faecium* SJRP20 and SJRP65 were selected for complementary tests, including tolerance to gastrointestinal tract (GIT), adhesion to Caco-2 cells, β -galactosidase activity, and presence of genes encoding virulence factors. Both strains resisted well to the GIT conditions, presented low adhesion property, are β -galactosidase enzyme producers and did not present genes implicated in adhesion,

aggregation and colonization. *E. faecium* SJRP65 showed fewer genes related to antibiotic resistance and virulence factors. *E. faecium* SJRP65 presented good functional properties, with interesting features for application in dairy products.

Keywords: *Enterococcus faecium*; tolerance to gastrointestinal tract; virulence factors; antibiotic resistance.

1. INTRODUCTION

It is notorious and expanding the knowledge of positive associations established between the intestinal microbiota and the human health. The most common way of deliver to consumers health promoting microorganism is through fermented dairy products, moreover, it is priority for the food industry the search for novel probiotic microorganisms which could be used in innovative physiologically active and nutritive products. Probiotics are living microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host (FAO/WHO 2002).

Among several microorganisms, yeasts and lactic acid bacteria (LAB) are mainly considered probiotics. Bacteria belonging to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are more commonly used in the fermented food production; however probiotic potential of several other genera of LAB, such as *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium* and others were also explored, due to their technological advantage in the food industry and health promoting properties (Górska et al. 2007; Ashraf and Shah 2014).

Lactobacillus spp. and *Enterococcus* spp. are ubiquitous bacteria. Because of their specific metabolite characteristics, ability to withstand heat stress and other adverse environmental conditions, they can play essential technological role in several fermented food products and are part of microbiota of various commercial fermented products (Favaro et al. 2015; Penna et al. 2015). Both genera confer technological functionality in fermented food production, such as contribution to the safety and sensory characteristics by the production of organic acids, antimicrobial compounds, such as bacteriocins, and aromatic volatile compounds (acetaldehyde, acetoin, and diacetyl), and also contribute to the texture (production of proteases and lipases),

nutritional and beneficial value by the production of bioactive compounds and vitamins (Martin-Platero et al. 2009; Ahmadova et al. 2013; Favaro et al. 2014; Pingitore et al. 2014; Santos et al. 2015).

In order to a bacterial strain be considered probiotic, first off all, selected microorganism must be safe, non-pathogenic, without virulence and antibiotics resistance genes, genetically stable and viable in high population (about 10^7 - 10^9 CFU/mL of product) (De Paula et al. 2014). Following, the microorganisms must not only survive to the passage through the digestive system and survive under the acid and bile environment, but also be able to proliferate in the intestine (Vandeplans et al. 2015), to present adhesion and colonization of the intestinal cells, as well as to present therapeutic benefits, besides showing technological and sensory properties in food systems.

Considering that gut microbiota plays a pivotal role in host metabolism, the objectives of this study were to investigate the probiotic potential of twenty LAB strains, select safety novel strains for the development of new functional fermented products and thereby improve their quality.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. LAB strains

Twenty mesophilic LAB strains from Department of Food Engineering and Technology, UNESP culture collection were used: *Lactobacillus helveticus* (SJRP56 and SJRP191), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (SJRP49), *Lactobacillus fermentum* (SJRP42), *Enterococcus durans* (SJRP14, SJRP17, SJRP25, SJRP26 and SJRP68), *Enterococcus faecium* (SJRP20, SJRP28, SJRP65, SJRP69), and *Enterococcus* sp. (SJRP04, SJRP11, SJRP16, SJRP101, SJRP120, SJRP122 and SJRP125), previously isolated from the processing of water-buffalo mozzarella cheese and identified by 16S rRNA gene sequencing (Silva et al. 2015; Silva 2015).

The strains of *Lactobacillus* and *Enterococcus* were cultured in Man-Rogosa-Sharpe - MRS broth (Difco, Becton Dickinson Co., Sparks, MD, USA) and stored at -80

°C, in the presence of sterile glycerol (20%, w/v) as a crioprotector. Before their use, the LAB cultures were maintained at room temperature to their defrosting and harvested by centrifugation. For revitalization the isolated LAB strains were inoculated (2%, v/v) in 10 mL of MRS broth, and incubated aerobically for 24 h at 37 °C (Von Mollendorff et al. 2007).

2.2. Evaluation of the probiotic potential

For the strains selection, preliminary tests of the probiotic potential evaluation were realized. The strains which presented the best results were selected for additional tests, aiming their future application in fermented milk. All tests were realized in triplicate, in three different moments (n=9).

2.2.1. Bile salts hydrolase (BSH) activity

The bile salts hydrolase activity was evaluated according to Kumar et al. (2012), with some modifications. The strains were activated in MRS broth for 18 h at 37 °C, and 10 µL of each strain were spotted, separately, in MRS agar plates, supplemented with 0.5% (w/ v) of sodium salt of taurodeoxycholic acid (TDC; T0875, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) or taurocholic acid (TC; T4009, Sigma Aldrich) and 0.37 g/L of CaCl₂ (Vetec, Duque de Caxias, Brazil). Plates were incubated anaerobically at 37 °C for 72 h. The presence of white precipitated bile acid around spots was considered as a positive result. MRS plates without addition of TDC or TC were used as negative control.

2.2.2. Auto-aggregation and co-aggregation assay

The strains were activated in MRS broth during 24 h at 37 °C and harvested by centrifugation (7.000 x g for 10 min at 20°C), washed twice and diluted in sterile saline

solution (0.85% NaCl). Cell suspension (1 mL) was transferred to a 2-mL sterile tube to obtain the optical density at 660 nm - $OD_{660\text{ nm}} = 0.3$, and the samples were incubated at 4 °C, 37 °C and 42 °C. After 60 min, the cell suspension was centrifuged (300 x g, 2 min, 20 °C) and the $OD_{660\text{ nm}}$ of the supernatant was determined. The auto-aggregation was determined using the Equation 1 (Todorov et al. 2011), wherein OD_0 refers to initial OD and OD_{60} refers to the OD value measured after 60 min.

$$\%auto - aggregation = [(OD_0 - OD_{60}) / OD_0] \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

For the co-aggregation assay, the investigated LAB strains and the co-aggregation partners microorganisms *Lb. fermentum* SJRP30 and *Lb. casei* SJRP37 were cultivated in 10 mL of MRS broth and the strains of *L. monocytogenes* ATCC 7644 and *L. innocua* ATCC 33090 in BHI at 30 °C. The cultures were cultured for 24h, cells were harvested (7.000 x g for 10 min at 20 °C), washed twice in 0.85% sterile saline solution to obtain the $OD_{660\text{ nm}} = 0.3$. The experimental protocol for the study of co-aggregation was the same used for auto-aggregation. The co-aggregation trials were performed in the presence of 500 µL of LAB cells in combination with 500 µL of the co-aggregation partners microorganism cells in a sterile plastic cuvette. The co-aggregation was determined using the Equation 2 (Todorov et al. 2011), wherein OD_0 refers to initial OD and OD_{60} refers to the OD value measured after 60 min.

$$\%co - aggregation = [(OD_0 - OD_{60}) / OD_0] \times 100 \quad (\text{Equation 2})$$

2.2.3. Cell surface hydrophobicity

The ability of the LAB cells surface to adhere to hydrophobic compounds was evaluated according to the methods reported by Doyle and Resenberg (1995). The strains were activated in MRS broth during 24 h at 37 °C and harvested by centrifugation (6.700 x g for 6 min at 4°C), washed twice in phosphate buffer 0.1 M, pH=6.5, suspended in the same solution, and the $OD_{580\text{ nm}}$ was measured (OD_0). Cell suspension (1.5 mL) was added to 1.5 mL of n-hexadecane (Sigma Aldrich) and vortexed for 2 min. The aqueous and organic phases were separated in room

temperature for 30 min. An aliquot of 1 mL of the aqueous phase was removed to determine the OD_{580 nm}. The percentage of hydrophobicity was determined by the Equation 3, wherein OD₀ refers to OD initial and the OD₃₀ refers to OD value measured after 30 min.

$$\%hydrophobicity = [(OD_0 - OD_{30}) / OD_0] \times 100 \quad (\text{Equation 3})$$

2.2.4. Tolerance to pH and NaCl

The cells capacity to tolerate different pH values (3.0, 5.0, 7.0, and 9.0) and NaCl concentrations (0, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 and 7.0 [w/v]: Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) in MRS broth was performed *in vitro*, according to Todorov et al. (2008). All tests were realized in sterile flat-bottom 96-well micro titer plates (TPP, Trasadingen, Switzerland). Each well was filled with 180 µL of modified MRS broth (pH or NaCl) and 20 µL of LAB culture activated in MRS broth. The optical density was measured to obtain OD_{600 nm} = 0.2. The strains were incubated at 37 °C for the pH test, and at 5 °C, 30 °C, and 37 °C for the NaCl tests. These temperatures were chosen to simulate the optimum growth temperature (30 °C), the natural human body temperature (37 °C) and the refrigerated storage of dairy products (5 °C). Every hour for 12 h, the OD_{600 nm} was recorded using microplate reader Asys Expert Plus UV (Biochrom Ltd. Cambridge, UK).

2.3. Safety of the LAB strains

To evaluate the safety of LAB strains, the mucin degradation test and the susceptibility to antibiotics were carried out. All tests were repeated on three independent occasions and in triplicate each time (n=9).

2.3.1. Mucin degradation

The LAB strains ability of degrade mucin was evaluated according to Peres et al. (2014) and Zhou et al. (2001). *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Salmonella enterica*

subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 and *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) were used as positive and negative control, respectively.

2.3.2. Susceptibility to antibiotics

The antibiotics were chosen according to the list recommended by the European Food Safety Authority (EFSA, 2012). The LAB cultures were activated in MRS broth, incubated for 18 - 24 h to obtain 10^7 - 10^8 CFU/mL, and spread onto the surface of MRS broth (Difco), supplemented with 1% of agar. The antibiotic discs (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) were manually placed on the surface and plates were incubated for 24 h aerobically. The diameters of the inhibition zones surrounding the disks were measured in millimeters and susceptibility of isolates was scored as a resistant, moderately susceptible and susceptible, according to the cut-off values proposed by Charteris et al. (1998) for *Lactobacillus* strains and by Cavalieri et al. (2005) for *Enterococcus* strains.

2.4. Selection of potential probiotic strains

The LAB strains which presented the highest probiotic potential and were considered safe after the mucin degradation test and the susceptibility to antibiotics, were submitted to additional tests to check probiotic potential and safety properties: tolerance to simulated gastrointestinal tract (GIT) conditions, adherence to caco-2 cells, β -galactosidase enzyme activity, the presence of genes implicated in adhesion, aggregation and colonization, and genes encoding virulence factors and antibiotic resistance.

2.5. Tolerance to simulated GIT conditions

The simulated gastro and enteric phase were prepared according to Bautista-Gallego et al. (2013), with slight modifications. Simulated gastric juice was prepared in a buffer solution with NaCl (2.05 g/L), KH_2PO_4 (0.6 g/L), CaCl_2 (0.11 g/L) and KCl (0.37 g/L). The pH was adjusted to 2.0 with 1 M NaCl. Simulated enteric juice was

prepared using Na₂HPO₄ heptahydrated (50.81 g/L) and NaCl (8.5 g/L). The pH was adjusted to 8.0 with anhydrous KH₂PO₄. All chemicals were from Vetec. The solutions were autoclaved at 121 °C for 15 min and stored until use.

The LAB strains were grown in MRS broth (as described previously for mucin degradation analysis), harvested by centrifugation (10.000 x g, 10 min, 4 °C) and pellets washed in phosphate buffer saline (PBS) solution (pH 7.2, 0.1 M). Then, the LAB cells were re-suspended in the synthetic gastric juice to obtain 10⁸-10⁹ CFU/mL. Before use, pepsin from porcine gastric mucosa (P7000; 3 g/L, Sigma Aldrich) was added in this solution, and the cells were incubated at 37 °C for 120 min in a water bath. Harvested LAB cells from the gastric digestion step were washed in PBS, and the enumeration was performed by plating serial dilution on the surface of MRS agar (Difco), at times 0 (T₀) and 120 min (T₁₂₀) of the analysis, followed by incubation of the plates at 37 °C for 48 h.

To simulate the small intestine conditions, simulated enteric juice was used. Before use, pancreatin from porcine pancreas (P3292; 1 g/L, Sigma Aldrich) and bile salts (70168; 3 g/L, Sigma Aldrich) were added. The harvested LAB cells from the gastric phase were washed in PBS solution, and re-suspended in the same volume of the simulated enteric juice. Then, the samples were incubated for 360 min at 37°C in a water bath. The count was realized as described previously (T₃₆₀). All solutions of enzymes were daily fresh prepared and filter-sterilized using a 0.22 µm membrane filter (Merck Milipore Ltd., Cork, Ireland) prior to use. All tests were repeated on two independent occasions and in triplicate each time (n=6).

2.6. Adherence to Caco-2 cells

Caco-2 cell line ATCC HTB-37 (Manassas, VA, USA) was typically cultivated in Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Aldrich) supplemented with 20% heat inactivated fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, Brazil), a mix of penicillin (100 UI/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (Sigma Aldrich), and a solution of non-essential amino acids at 1% (Sigma Aldrich). The cells were maintained at 37 °C, in an atmosphere of 5% CO₂. The adhesion assay was realized as described by

Ranadheera et al. (2012), with modifications. In summary, the Caco-2 cells were seeded in a concentration of 10^5 cells/well into 24-wells tissue culture plates (Biotechnology Nest Co. Ltda., Wuri, China) and they were incubated at 37 °C in an atmosphere of CO₂ at 5% (Thermo Electrone, Sunnyvale, CA, USA) until the formation of a monolayer (15-17 days). One day before the adhesion assays, the medium was replaced to the same medium, but without antibiotics. Before the adhesion, the monolayer was washed once with PBS (pH 7.4, 0.1 M), to remove all vestiges of antibiotics. *E. faecium* strains (SJRP20 and SJRP65) were activated in MRS broth and incubated for 18-24 h to obtain 10^8 - 10^9 CFU/mL, then an aliquot of 1 mL was transferred to the monolayers of Caco-2 cells and incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ during 2 h. The cells were washed individually at least three times with PBS to remove the non-adherent bacteria. Then, 1 mL of Triton X-100 (0.5% v/v, Sigma Aldrich) was added for detaching the cells from each well and the plates were incubated for 5 min at 37 °C. The suspension (1 mL) of cell lysates was transferred to a tube containing 9 mL of saline solution for serial dilutions, followed by plating on MRS agar, in triplicates, to determine the adhesion capacity. The adhesion was calculated by the rate between the number of adhered bacteria and the total number of bacteria initially added to the wells. All tests were repeated on two independent occasions and in triplicate each time (n=6).

2.7. β -galactosidase enzyme activity

The β -galactosidase enzyme activity was determined using paper discs impregnated with o-nitrophenol- β -D-galactopyranose (ONPG Disks, Fluka, Buchs, SG, Switzerland), according to the manufacturer' instructions. The test was performed in three independent experiments in duplicate. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as negative and positive controls, respectively. All tests were repeated on two independent occasions and in triplicate each time (n=6).

2.8. Confirmation of the presence of genes implicated in adhesion, aggregation and colonization, and genes encoding virulence factors, antibiotic resistance and biogenic amines production

The DNA from the selected strains were extracted using QIAgen DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAgen GmbH, Hilden, NRW, Germany), followed by DNA concentration estimation using NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The screening of genes related to adhesion, aggregation and colonization, resistance to antibiotics, virulence factors, and production of biogenic amines was carried out. PCR were performed and amplified products were separated by electrophoresis in 0.8 to 2.0% (w/v) agarose gels in $0.5 \times$ TAE buffer. Gels were stained in $0.5 \times$ TAE buffer containing 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ethidium bromide (Sigma Aldrich). The analyses werw done in triplicate on three different occasions ($n = 9$).

2.9. Statistical Analyses

The results presented as Mean $\pm$ standard deviation. Results were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test, considered the level of significance 5% ($p < 0.05$), using the software OriginPro® (Northampton, USAs), version 8.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Evaluation of the probiotic potential

3.1.1. Bile salts hydrolase (BSH) activity

The bile salts hydrolase (BSH) activity was observed in 6 of the 20 strains evaluated at least in one of sodium bile salts tested (TC or TDC) and they are described in the Table 1. Only *Lb. fermentum* SJRP42, *Enterococcus* sp. SJRP122 and *E. faecium* SJRP20 were able to grow on MRS containing the TC and TDC salts. On the other hand, the growth of all strains of *E. durans* was completely inhibited. *E. faecium*

SJRP65 was able to hydrolase TC while *E. faecium* SJRP69 and *Enterococcus* sp. SJRP16 were able to hydrolase TDC (Table 1). The deconjugation of bile salts by LAB strain is an important feature, emphasizing its functional qualities as a potential probiotic strain. The BSH enzyme is efficient on the hydrolysis of glycoconjugate and tauroconjugate bile salts.

Different species of LAB can present the ability to deconjugate bile salts. A study performed by Moser and Savage (2001) revealed that *Lb. buchneri* JCM1069 can hydrolase TDC, however it was not able to hydrolase TC, which is similar to the results observed for the strains *E. faecium* SJRP69 and *Enterococcus* sp. SJRP16 (Table 1).

Table 1: Bile salts hydrolase activity of LAB strains in MRS agar modified with salts of taurocholic and taurodeoxycholic acid.

	Strains	Taurocholic acid	Taurodeoxycholic acid
<i>Lactobacillus</i>	SJRP42 (<i>L. fermentum</i>)	+	+
	SJRP49 (<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	-	-
	SJRP56 (<i>L. helveticus</i>)	-	-
	SJRP191 (<i>L. helveticus</i>)	-	-
<i>Enterococcus</i> sp.	SJRP04	-	-
	SJRP11	-	-
	SJRP16	-	+
	SJRP101	-	-
	SJRP120	-	-
	SJRP122	+	+
	SJRP125	-	-
<i>E. durans</i>	SJRP14	-	-
	SJRP17	-	-
	SJRP25	-	-
	SJRP26	-	-
	SJRP68	-	-
<i>E. faecium</i>	SJRP20	+	+
	SJRP28	-	-
	SJRP65	+	-
	SJRP69	-	+

E. faecium EM485 and EM925, isolated from Brazilian Coalho cheeses, were both able to grow in the presence of 0.5% of the sodium salts of taurocholic acid (TC), taurodeoxycholic acid (TDC), glycocholic acid (GC), and glycodeoxycholic acid (GDC), although they showed the ability to deconjugate only GDC and TDC (Santos et al. 2015).

The advantages of using BSH enzyme producer strains are: detoxification of bile salts ensuring higher permanency of the strains in the gastrointestinal tract (Tanaka et al. 1999), enhance on the nutrient absorption, change the membranes (increasing the resistance to bile, intestinal defensins and lysozyme), change the digestive functions, help on the cholesterol reduction (Liong and Shah 2006; Kumar et al. 2012), and prevention of some kinds of cancers. Strains containing BSH-active may have much more potential to reduce serum cholesterol levels in humans, since, in general, the bile salts deconjugated compared to the conjugated bile salts are less soluble in the aqueous solution, thus the salts will be diminished and excreted from the human body through feces (Kumar et al. 2012).

3.1.2. Auto-aggregation and co-aggregation properties

For all strains, the auto-aggregation was affected by the incubation temperature ($p < 0.05$), and the values were superior at 4° C for the majority of strains. Moreover, there was significant difference ($p < 0.05$) among the auto-aggregation values for each bacterial group, considering all the incubation temperatures (Table 2). The highest auto-aggregation capacity was shown by the genera *Enterococcus* among the tested LAB strains (Table 2). The strains *Enterococcus* sp. SJRP11 and SJRP16, *E. durans* SJRP14 and SJRP17, and *E. faecium* SJRP20, presented auto-aggregation higher than 56%, while *E. durans* SJRP68, *E. faecium* SJRP69 and *Enterococcus* sp. SJRP101 and SJRP122 presented auto-aggregation average lower than 36% at the three evaluated temperatures.

The capacity of adherence to the intestinal mucous surface makes an essential role in the definition of a probiotic culture. The intestine colonization by probiotic

strains can generate beneficial biological responses: they can influence the immune system and increase the competition with pathogens in the intestine (Adams 2010), and prevent their elimination from the GIT by peristalsis.

Cell adhesion is a multistep process involving contact of the bacterial cell membrane and interacting surfaces. When the adhesion occurs and the bacterium begins to colonize the GIT, it avoids the pathogens attachment through the block of the interaction with specific cell receptors or inhibiting its fixation by enteric interactions (Kos et al. 2003).

Table 2: Auto-aggregation (%) of the LAB strains tested in different temperatures: 4 °C (refrigerated storage temperature), 37 °C (optimal growth temperature), and 42 °C (fermentation heating temperature).

Strains		4 °C	37 °C	42 °C
<i>Lactobacillus</i>	SJRP42 (<i>L. fermentum</i>)	62.70 ^{Aa} ± 0.45	51.65 ^{Cb} ± 0.22	56.94 ^{Ba} ± 0.21
	SJRP49 (<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	53.40 ^{Ac} ± 0.29	47.46 ^{Bd} ± 0.26	45.47 ^{Cc} ± 0.00
	SJRP56 (<i>L. helveticus</i>)	59.95 ^{Ab} ± 0.16	58.14 ^{Ba} ± 0.14	49.89 ^{Cb} ± 0.39
	SJRP191 (<i>L. helveticus</i>)	53.42 ^{Ac} ± 0.20	50.49 ^{Bc} ± 0.20	49.71 ^{Bb} ± 0.20
<i>Enterococcus</i> sp.	SJRP04	63.1 ^{Ab} ± 0.30	59.95 ^{Bb} ± 0.26	53.35 ^{Cc} ± 0.45
	SJRP11	71.03 ^{Ba} ± 0.27	73.25 ^{Aa} ± 0.14	60.25 ^{Ca} ± 0.23
	SJRP16	61.43 ^{Ac} ± 0.47	56.3 ^{Cc} ± 0.00	59.57 ^{Ba} ± 0.19
	SJRP101	24.04 ^{Cg} ± 0.24	27.27 ^{Bg} ± 0.28	30.59 ^{Af} ± 0.49
	SJRP120	56.91 ^{Ad} ± 0.45	54.02 ^{Bd} ± 0.48	57.61 ^{Ab} ± 0.41
	SJRP122	30.88 ^{Bf} ± 0.38	30.79 ^{Bf} ± 0.17	35.59 ^{Ad} ± 0.27
	SJRP125	48.72 ^{Ac} ± 0.12	44.62 ^{Bc} ± 0.31	34.82 ^{Cc} ± 0.45
<i>E. durans</i>	SJRP14	63.71 ^{Ab} ± 0.20	60.00 ^{Bb} ± 0.32	57.29 ^{Cb} ± 0.18
	SJRP17	70.63 ^{Aa} ± 0.42	62.36 ^{Ba} ± 0.49	61.8 ^{Ba} ± 0.38
	SJRP25	50.24 ^{Ac} ± 0.27	45.10 ^{Bd} ± 0.33	34.42 ^{Cd} ± 0.39
	SJRP26	45.83 ^{Cd} ± 0.46	52.17 ^{Ac} ± 0.38	50.00 ^{Bc} ± 0.38
	SJRP68	35.05 ^{Ac} ± 0.42	31.51 ^{Cc} ± 0.30	34.03 ^{Bd} ± 0.14
<i>E. faecium</i>	SJRP20	66.26 ^{Aa} ± 0.20	59.26 ^{Ba} ± 0.38	58.78 ^{Ba} ± 0.45
	SJRP28	45.88 ^{Cc} ± 0.43	53.80 ^{Ab} ± 0.47	52.36 ^{Bb} ± 0.21
	SJRP65	49.46 ^{Ab} ± 0.16	34.30 ^{Cc} ± 0.20	35.27 ^{Bc} ± 0.41
	SJRP69	26.77 ^{Bd} ± 0.19	31.05 ^{Ad} ± 0.05	23.49 ^{Ad} ± 0.54

The results are expressed as mean ± SD. ^{A, B, C} Equal capital letters in the same line did not present significant difference at the different temperatures ($p < 0.05$). ^{a, b, c, d} Equal lowercase letters in the same column, did not present significant difference, among the strains of the same species or genera.

There was significant difference on the co-aggregation values of tested strains with LAB ($p < 0.05$), which varied from 38.97 ± 0.46 (*E. faecium* SJRP69) to $61.49 \pm 0.46\%$ (*Enterococcus* sp. SJRP120) and from $41.81 \pm 0.30\%$ (*E. durans* SJRP68) to $72.37 \pm 0.27\%$ (*E. faecium* SJRP28) for *Lb. fermentum* SJRP30 and *Lb. casei* SJRP37, respectively, which can facilitate the presence of these strains in the human GIT. There was also difference ($p < 0.05$) on the co-aggregation values of tested strains with *L. innocua* and *L. monocytogenes*. The values ranged from $25.21 \pm 0.30\%$ (*Enterococcus* sp. SJRP101) to $67.59 \pm 0.17\%$ (*Enterococcus* sp. SJRP11) for *L. innocua* ATCC 33090 and from $24.24 \pm 0.36\%$ (*E. durans* SJRP68) to $61.60 \pm 0.11\%$ (*E. durans* SJRP17) for *L. monocytogenes* ATCC 15313. Additionally, superior co-aggregation values ($p < 0.05$) were recorded with *Lb. casei* for the majority of strains tested and the lowest values ($p < 0.05$) were observed for co-aggregation with *L. monocytogenes* ATCC 15313 (Table 3).

The LAB capacity of co-aggregation can increase the competition among the epithelial receptor cells of the intestine and it can decrease the presence of undesirable intestinal microorganisms due to the production of antimicrobial compounds or other factors. The disadvantage is that high values of co-aggregation can be a potential factor of virulence whereby the genetic material of the pathogen can be transferred by conjugation (Hemme and Foucaud-Scheunemann 2004). Moreover, if LAB don't produce antimicrobial compounds against co-aggregation partner, then high co-aggregation will facilitate presence of co-aggregation partner in the GIT. This process can be consider as a positive factor if co-aggregation partner is other beneficial bacteria, however, is undesirable. Related to this, the co-aggregation needs to be discussed taking part if there is production of bacteriocins by the LAB strain. The low levels of co-aggregation with pathogenic agents can play an important role on the biofilms formation prevention (Todorov et al. 2011). However, if the bacteriocin is active with the co-aggregation partner, the high co-aggregation can facilitate the action mode of the bacteriocin, facilitating the elimination of the co-aggregation partner of the GIT (Todorov et al. 2012).

Table 3: Co-aggregation capacity and hydrophobic potential of LAB strains with indicating microorganisms.

Strains		Co-aggregation with <i>L. fermentum</i> SJRP30	Co-aggregation with <i>L. casei</i> SJRP37	Co-aggregation with <i>L. innocua</i> ATCC 33090	Co-aggregation with <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 15313	Hydrophobic potential
<i>Lactobacillus</i>	SJRP42 (<i>L. fermentum</i>)	55.68 ^{Bb} ± 0.34	67.87 ^{Aa} ± 0.46	49.84 ^{Cc} ± 0.22	44.71 ^{De} ± 0.39	87.74 ^B ± 0.31
	SJRP49 (<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	49.24 ^{Bc} ± 0.49	57.63 ^{Ab} ± 0.49	49.35 ^{Bc} ± 0.46	33.22 ^{Cd} ± 0.25	72.49 ^C ± 0.07
	SJRP56 (<i>L. helveticus</i>)	59.43 ^{Ba} ± 0.18	57.67 ^{Ub} ± 0.33	62.95 ^{Aa} ± 0.43	45.65 ^{Db} ± 0.17	94.31 ^A ± 0.30
	SJRP191 (<i>L. helveticus</i>)	40.72 ^{Ud} ± 0.37	48.23 ^{Cc} ± 0.47	54.55 ^{Ab} ± 0.08	50.16 ^{Ba} ± 0.29	5.02 ^U ± 0.07
<i>Enterococcus</i> sp.	SJRP04	49.18 ^{Bc} ± 0.46	50.50 ^{Bc} ± 0.46	60.06 ^{Ab} ± 0.04	36.89 ^C ± 0.41	71.81 ^G ± 0.47
	SJRP11	59.14 ^{Bb} ± 0.32	59.51 ^{Bb} ± 0.42	67.59 ^{Aa} ± 0.17	56.36 ^{Ca} ± 0.19	92.61 ^F ± 0.04
	SJRP16	50.52 ^{Bd} ± 0.38	57.38 ^{Ac} ± 0.46	56.32 ^{Ac} ± 0.41	49.47 ^{Cd} ± 0.28	92.08 ^E ± 0.07
	SJRP101	42.96 ^{Bg} ± 0.29	46.04 ^{Af} ± 0.35	25.21 ^{Cg} ± 0.28	45.94 ^{Ae} ± 0.38	99.60 ^B ± 0.15
	SJRP120	61.49 ^{Ba} ± 0.46	63.38 ^{Aa} ± 0.17	40.00 ^{Df} ± 0.15	53.93 ^{Cc} ± 0.29	97.99 ^D ± 0.11
	SJRP122	45.10 ^{Cf} ± 0.17	53.98 ^{Ad} ± 0.41	42.57 ^{De} ± 0.29	49.72 ^{Bd} ± 0.38	98.30 ^C ± 0.20
	SJRP125	53.99 ^{Bc} ± 0.31	60.80 ^{Ab} ± 0.48	45.04 ^{Cd} ± 0.31	54.73 ^{Bb} ± 0.47	100.0 ^A ± 0.21
<i>E. durans</i>	SJRP14	57.72 ^{Ba} ± 0.32	65.34 ^{Ab} ± 0.39	56.68 ^{Cc} ± 0.35	55.36 ^{Db} ± 0.35	58.54 ^E ± 0.20
	SJRP17	57.59 ^{Da} ± 0.23	66.49 ^{Aa} ± 0.37	63.00 ^{Ba} ± 0.31	61.60 ^{Ca} ± 0.11	94.12 ^B ± 0.01
	SJRP25	49.25 ^{Bb} ± 0.27	51.92 ^{Ad} ± 0.28	45.10 ^{Cc} ± 0.16	42.13 ^{Dd} ± 0.23	84.74 ^C ± 0.45
	SJRP26	44.74 ^{Cd} ± 0.15	58.96 ^{Ac} ± 0.36	58.60 ^{Ab} ± 0.42	51.08 ^{Bc} ± 0.45	98.60 ^A ± 0.10
	SJRP68	47.00 ^{Ac} ± 0.06	41.81 ^{Be} ± 0.30	46.90 ^{Ad} ± 0.29	24.24 ^{Ce} ± 0.36	59.09 ^D ± 0.19
<i>E. faecium</i>	SJRP20	50.00 ^{Cb} ± 0.16	62.58 ^{Ac} ± 0.32	51.07 ^{Bc} ± 0.35	30.32 ^{Dd} ± 0.18	89.78 ^C ± 0.16
	SJRP28	52.36 ^{Ca} ± 0.08	72.37 ^{Aa} ± 0.27	54.62 ^{Bb} ± 0.03	45.47 ^{Da} ± 0.20	98.89 ^B ± 0.12
	SJRP65	48.29 ^{Cc} ± 0.44	66.18 ^{Ab} ± 0.45	58.01 ^{Ba} ± 0.27	39.65 ^{Dc} ± 0.19	98.94 ^B ± 0.01
	SJRP69	38.97 ^{Cd} ± 0.46	53.18 ^{Ad} ± 0.37	34.06 ^{Dd} ± 0.17	43.53 ^{Bb} ± 0.26	99.34 ^A ± 0.21

Results are expressed as mean percentage, followed by standard deviation (SD). Each result is represented as an average of three readings. ^{A, B, C, D} Equal capital letters in the same line did not present significant difference in the different temperatures ($p < 0.05$). ^{a, b, c, d} Equal lowercase letters in the same column, did not present difference between the groups of the same species or genera.

Since the tested strains were not able to produce inhibitory substances against pathogens (data not shown), a high co-aggregation of tested strains with *Listeria* sp. can facilitate the permanence of pathogens in the GIT. This way, the best results obtained for co-aggregation were from *Enterococcus* sp. SJRP101 ($25.21 \pm 0.28\%$) and *E. durans* SJRP68 ($24.24 \pm 0.36\%$), which presented low co-aggregation capacity with *L. innocua* ATCC 33090 and *L. monocytogenes* ATCC 15313, respectively (Table 3). High co-aggregation were found for *Enterococcus* sp. SJRP11 (67.59 ± 0.17) and *E. durans* SJRP17 ($61.60 \pm 0.11\%$), when co-aggregated with *L. innocua* ATCC 33090 and *L. monocytogenes* ATCC 15313, respectively (Table 3). Once these strains do not produce antimicrobial compounds, they could not avoid or reduce the development of pathogenic microorganisms when co-aggregated. We need to take in consideration that LAB produces several organic acids and can be responsible for drop down the environmental pH. This low pH can have a certain antimicrobial effect as well. However, *Listeria* spp. are acid tolerant, and this changes in pH cannot interfere with their viability.

Similar results were available in the literature. Todorov et al. (2014) observed that *E. faecium*, isolated of Portuguese meat products, presented auto-aggregation capacity of 12.77% and co-aggregation between 23.6% and 34.96%. The strain also produced antimicrobial substance which inhibited *L. monocytogenes* and *Lb. plantarum* and this higher co-aggregation will contribute to the food safety. Pingitore et al. (2012) observed that co-aggregation ability of *Enterococcus* strains isolated of Minas Frescal cheese is strain-specific, varying from 27.7% for *L. monocytogenes* to 86.5% for *E. faecium*. These low values of co-aggregation with *L. monocytogenes* may avoid the biofilm formation, and elimination the pathogenic agent from the food matrix.

3.1.3. Cell surface hydrophobicity

The cell surface hydrophobicity varied among the evaluated strains ($p < 0.05$). *Enterococcus* sp. SJRP125 presented 100% of hydrophobic potential, and 60% of the tested strains presented hydrophobicity values higher than 90%, however the *Lb. helveticus* SJRP191 presented only 5.02% of hydrophobic potential (Table 3).

The hydrophobicity is one of the physicochemical properties that can facilitate the first contact between the microorganisms and the cells of the host intestinal wall. Although it is natural for the bacteria a high or medium hydrophobic feature, the adhesion of cell surface differs considerably among the isolates, giving a particular standard for each bacteria, denoting different standards of polarities on the bacterial surface (Sánchez-Ortiz et al. 2015). Furthermore, the hydrophobicity of the bacterial surface can affect the capacity of adhesion and auto-aggregation of bacteria to different surfaces (Kos et al. 2003). The hydrophobicity of the bacterial surface can be associated to the growth of bacteria in hydrophobic substrates, biofilms formation and the adhesion to host cells, aggregation and cell flocculation. So, the strains with high levels of cell hydrophobicity can have an easier access to the soluble materials and organic matter linked to the intestinal mucous surface, facilitating the food digestion (Sánchez-Ortiz et al. 2015).

Other strains isolated from the same sample (water-buffalo mozzarella cheese), also presented high levels of hydrophobicity: 64.9% for *Lb. casei* SJRP35, 66.7% for *Leuc. citreum* SJRP44, 68.9% for *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57 and 72.2% for *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP58 (Jeronimo-Ceneviva et al. 2014).

3.1.4. Tolerance to pH and NaCl

The LAB strains resisted well to pH values varying from 5-9, and there was an increase of the OD after two hours, indicating cell growth and this increase continued during the 12 h of analysis (Figure 1); however, the tested strains were not viable in the pH value 3.0, since none of them presented an increase of OD during the 12 h of evaluation (data not shown). The LAB strains grew better in neutral conditions (pH = 7.0), similar to the intestine conditions; however, the lactobacilli tolerate less these pH values (neutral) than the *Enterococcus* (Figure 1). The strains *Enterococcus* sp. SJRP16, and *E. durans* SJRP29 and SJRP68 did not grow well at pH 5.0. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP49 was the only strain that did not grow in the pH 7 and 9 (Figure 1).

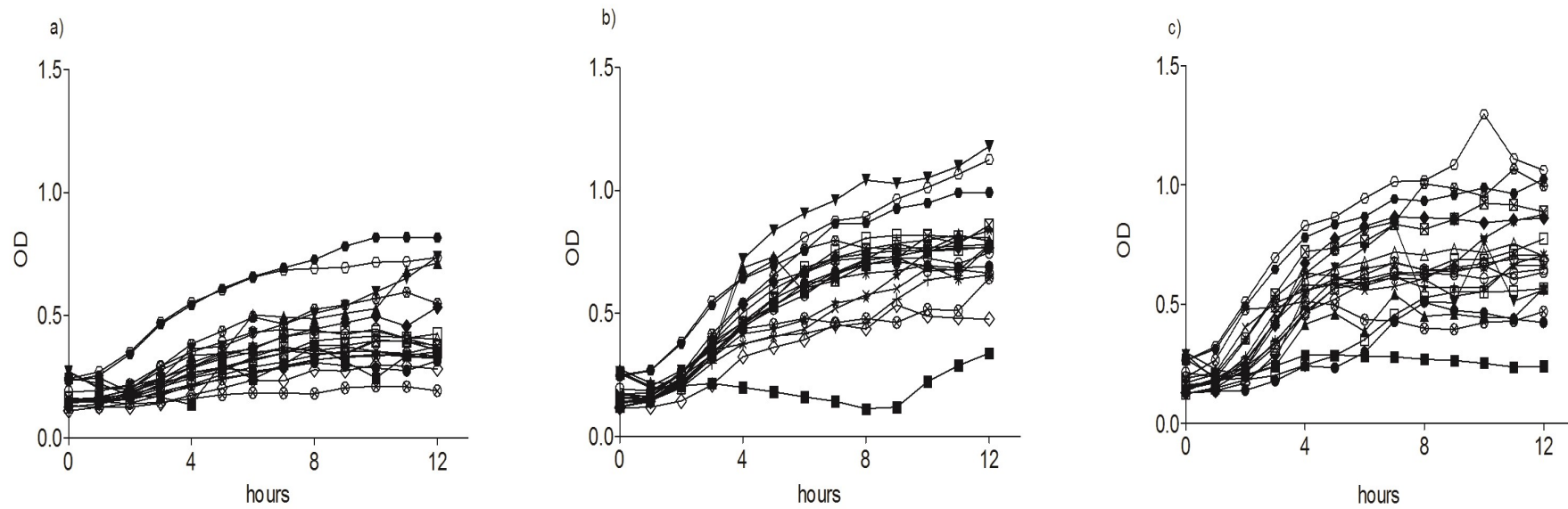


Figure 1. Growth of *L. fermentum* (● SJRP42), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (■ SJRP49), *L. helveticus* (▲ SJRP56, ▼ SJRP191), *E. durans* (◆ SJRP14, ◇ SJRP17, ▢ SJRP25, △ SJRP26, ◇ SJRP68), *E. faecium* (* SJRP20, ★ SJRP28, + SJRP65, × SJRP69) and *Enterococcus* sp. (⊕ SJRP04, ⊖ SJRP11, ⊗ SJRP16, ⊠ SJRP101, ⊡ SJRP 120, ⊣ SJRP 122, ⊤ SJRP 125) strains in MRS broth at pH values 5, 7 and 9 (a, b and c, respectively), shown as OD (600 nm) measurements. The results are represented as an average of three readings.

The secretions produced in the human stomach and intestine, such as organic acids, besides indispensable to the digestive process, are used for organism defense acting as barriers against invaders microorganisms. *In vitro* studies of tolerance to harsh acidic conditions and bile contents normally found in the stomach and upper parts of the intestine, respectively, together with the capability to inhibit pathogenic bacteria, have been successfully used to select potentially probiotic LAB (Tuo et al. 2013).

So, to verify the LAB probiotic potential is indispensable to evaluate its viability under the gastric and intestinal conditions. According to Gilliland et al. (1984), when absorption of 0.3 is reached after at least 2 hours of incubation at 37 °C in the presence of pH between 1.5 and 4.0, a microorganism can be considered tolerant or resistant to this pH value. Additionally, it is important to consider that after the consumption of some food, the stomachic pH which is normally around of 1.2-2.0, turns to 3.0-4.0, depending on the food. In the case of consumption of yogurt and fermented milk, the stomach pH increases considerably and can reach 5.0 (Cheng et al. 2004).

Among sixteen strains of *Enterococcus* spp. (*faecium*, *durans* and *casseliflavus*) isolated of sheep milk, thirteen samples (81.25%) presented resistance to pH 2.0, after 3 h of incubation, and only three strains did not resist to this low pH value (Acurcio et al. 2014). However, Todorov et al. (2011) observed that cultures of *Lactobacillus* (*curvatus*, *fermentum*, *delbrueckii*), *Pediococcus* and *E. faecium* isolated from smoked salmon presented a good growth in MRS broth when the pH values ranged between 5.0 and 11.0 and none of the strains grew in pH 3.0, which is consistent with this study.

Most of strains tolerate the different concentrations of salt, since they presented high viabilities at temperatures of 30 °C and 37 °C (Figure 2); however, the tolerance was restricted at 5 °C (data not shown). Most of the tested strains did not have significant values of OD, ranging between 0.3 and 0.4, at 5 °C, in all tested concentrations. The strains *E. durans* SJRP26 and SJRP68, *Lb. helveticus* SJRP56, *E. faecium* SJRP69 and *Enterococcus* sp. SJRP101, SJRP120, SJRP122 and SJRP125 presented OD values higher than 0.3 in the absence of NaCl after 12 h (data not shown); however, only *Lb. helveticus* SJRP56 and SJRP191, *E. faecium* SJRP69 and *Enterococcus* sp. SJRP101, SJRP122 and SJRP125 maintained these values in the

presence of 0.5% of NaCl (Figure 2). Only *Lb. helveticus* SJRP191 grew in the presence of 3% of NaCl at this temperature (data not shown). *Lactobacillus* is one of the most halotolerant between BAL, it has been reported growth in the presence of 10% NaCl. This tolerance is an important feature for its use in dairy products, especially in cheese (De Paula et al. 2014).

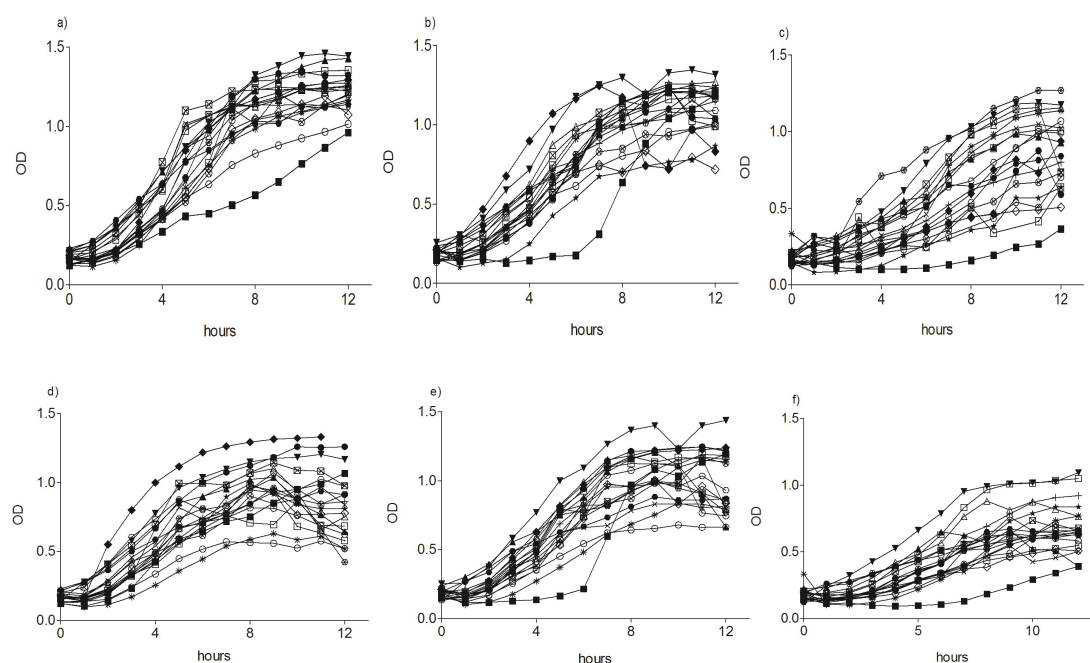


Figure 2. Growth of *L. fermentum* (—●— SJRP42), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (—■— SJRP49), *L. helveticus* (—▲— SJRP56, —▼— SJRP191), *E. durans* (—◆— SJRP14, —◇— SJRP17, —□— SJRP25, —△— SJRP26, —◇— SJRP68), *E. faecium* (—*— SJRP20, —★— SJRP28, —+— SJRP65, —×— SJRP69) and *Enterococcus* sp. (—⊕— SJRP04, —⊞— SJRP11, —⊗— SJRP16, —⊠— SJRP101, —⊡— SJRP120, —■— SJRP122, —⊞— SJRP125) strains in MRS broth with 0.5, 1.0 and 3.0% NaCl at 30 °C (a, b and c, respectively) and in MRS broth with 0.5, 1.0 and 3.0% NaCl at 37 °C (d, e and f, respectively), shown as OD (600 nm) measurements. The results are represented as an average of three readings.

At 30 °C, the LAB strains presented growth in the absence and in concentrations until 3.0% of NaCl, while in concentrations $\geq 5\%$ of NaCl, significant increase of the OD was not observed over the time for all tested strains. The strains *E.*

durans SJRP26 and SJRP68, *Enterococcus* sp. SJRP101 and SJRP120 presented OD values higher than 0.3 with 5% NaCl over the 12 h of analysis, and only *E. durans* SJRP68 grew in 7% of NaCl (data not shown).

The LAB strains grew in the absence and in concentrations until 3% NaCl at 37 °C, however the increase of OD over the time was lower than at 30 °C (Figure 2). None of the strains tolerate concentrations of 5% and 7% NaCl at this temperature (data not shown). However, these results are not surprising, since was well documented that *Enterococcus* spp. have a tolerance to presence of NaCl up to 6,5%, moreover, this characteristic is a part of physiological and biochemical identification of LAB (Dworkin et al. 2006).

3.2. Safety of LAB strains

3.2.1. Mucin degradation

None of the tested LAB strains degraded the mucin, being considered safe related to the maintenance of the host intestinal mucous integrity.

The mucin is a layer of mucous that coats the surface of the gastrointestinal tract of animals and plays an important role in the barrier system of the mucous. Whatever damage or disturbance of this mucin layer will compromise the defense function of the host mucous (Zhou et al. 2001). When the probiotic bacteria adhere to the intestinal epithelium, they protect it against pathogens in several ways: competing for intestinal sites, nutrients, modulating and stimulating the immune system (Koninkx et al. 2010). Initially, these probiotic bacteria adhere themselves directly to the mucous high layer, and help the production of the intestinal mucin, improving its interaction with the mucous (Kinoshita et al. 2008).

A particular LAB could adhere to the intestinal mucous and degrade it, then, the LAB toxicity in the intestinal mucous is considered an important safety aspect, as most probiotic are intended for oral consumption and consequently will reach the intestine. The probiotic bacteria adhere to the intestinal mucous and colonize the GIT,

and due to this colonization they promote their health benefits without damaging the host (Zhou et al. 2001).

Yung et al. (2016) demonstrated in their studies the inhibitory effect of the probiotic *Lb. rhamnosus* GG (LGG) on the *E. coli*, associating the potential of probiotics as a way to control the growth of pathogenic bacteria in food. Positive regulation of the MUC5AC and MUC5B genes when LGG and *E. coli* were added under different conditions further demonstrate the protective effect of LGG on HT29-MTX cells, possibly through bacterial-cell interactions. These results demonstrate the effects of probiotics on strengthening the intestinal mucus barrier against foodborne pathogens and possibly the development of preventive measures for food borne infections.

3.2.2. Susceptibility to antibiotics

All the twenty strains presented resistance to kanamycin (K); 95% of them were resistant to gentamycin (CN) and vancomycin (VA), and the percentages of strains resistant to streptomycin (ST) and clindamycin (DA) were also considerable (65% and 55%, respectively). All strains were resistant to at least two class of antibiotics, and most of the strains (80%) were classified as multi-drug resistant (MDR; resistant to three or more classes of antibiotics) (Table 4). Resistance to erythromycin can be a matter of concern because macrolides are common substitutes for individuals with penicillin allergy.

All the *Lactobacillus* were also resistant to gentamycin (CN), clindamycin (DA), kanamycin (K), vancomycin (VA), tetracycline (TE) and chloramphenicol (C) antibiotics, except *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP49, which presented moderate sensibility to clindamycin and sensible to vancomycin (Table 4). The resistance to vancomycin in *Lactobacillus* is an intrinsic resistance due to the particularities of the cell walls which present D-lactate instead of D-alanine in the peptidoglycan layer (Divya et al. 2012). The wide use of tetracycline in cows zootechnic practice is associated with the high levels of tetracycline resistance, such us the observed for

Lactobacillus. Furthermore, the natural or intrinsic resistance is codified by chromosomal genes and is untransferable.

Table 4: Profile of antibiotics susceptibility of LAB strains. The concentrations of antibiotics are expressed in µg per disc.

Antibiotic classification		β-Lactam	Glycopeptides	Aminoglycosides			Macrolides	Lincosamides	Tetracyclines	Others
Strains		AMP 10 µg/disc	VA 30 µg/disc	CN 10 µg/disc	K 30 µg/disc	ST 300 µg/disc	E 15 µg/disc	DA 2 µg/disc	TE 30 µg/disc	C 30 µg/disc
<i>Lactobacillus</i>	SJRP42 (<i>L. fermentum</i>)	S	R	R	R	R	MS	R	R	R
	SJRP49 (<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	R	S	R	R	R	R	MS	R	R
	SJRP56 (<i>L. helveticus</i>)	MS	R	R	R	R	MS	R	R	R
	SJRP191 (<i>L. helveticus</i>)	S	R	R	R	MS	MS	R	R	R
<i>Enterococcus</i> sp	SJRP04	MS	R	R	R	R	MS	S	MS	R
	SJRP11	MS	R	R	R	R	R	R	R	MS
	SJRP16	S	R	R	R	R	MS	R	S	S
	SJRP101	MS	R	R	R	R	MS	R	MS	R
	SJRP120	S	R	MS	R	MS	S	S	S	S
	SJRP122	MS	R	R	R	R	MS	R	MS	S
	SJRP125	S	R	R	R	R	R	R	MS	MS
<i>E. durans</i>	SJRP14	MS	R	R	R	S	R	R	S	S
	SJRP17	MS	R	R	R	R	MS	S	MS	MS
	SJRP25	S	R	R	R	S	MS	MS	S	S
	SJRP26	MS	R	R	R	R	MS	S	MS	R
	SJRP68	S	R	R	R	S	MS	R	S	S
<i>E. faecium</i>	SJRP20	S	R	R	R	MS	S	S	S	S
	SJRP28	MS	R	R	R	R	R	S	MS	MS
	SJRP65	S	R	R	R	MS	MS	MS	MS	MS
	SJRP69	MS	R	R	R	R	R	R	S	R

AMP = Ampicillin; VA = Vancomycin, CN = Gentamycin, K = Kanamycin, ST = Streptomycin, E = Erythromycin, DA = Clindamycin, TE = Tetracycline, C = Chloramphenicol, S = Sensible, MS = Moderately sensible, R = Resistant.

Enterococcus sp. SJRP120, among the *Enterococcus* sp., was the most sensible to antibiotics. It presented resistance to vancomycin (VA) and kanamycin (K), like all *Enterococcus* sp., was moderate sensibility to gentamycin (CN) and streptomycin (ST) and sensible to the other antibiotics (Table 4).

Considering the physicochemical properties of fermented food, stressors such as salt, low pH and additives could enhance the resistance to antimicrobial drugs by switching on specific genes (silent genes), increasing their expression or facilitating their dissemination between strains which coexist in the same place and at the same time (Ganjian et al. 2012).

The bacteria can become resistant to antimicrobials by mutation or as a result of the acquisition of resistance genes. In the latter case, resistance genes may reside on plasmids containing other genes that allow their selection in environments where there is no selective pressure by antibiotics (Linares-Rodriguez and Martibez-Menendez 2005). The emergence of antibiotic resistance is a complex phenomenon, which involves interactions between humans, animals, bacteria, drugs and the environment (Barbosa and Levy 2000).

Among the tested antibiotics, the ampicillin (AMP) resulted in higher inhibition halos and higher percentage of sensible strains (45%) and moderate sensibility strains (50%). Only *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus* SJRP49 presented resistance to ampicillin. *Enterococcus* sp. SJRP11 and SJRP 125 and *E. durans* SJRP14, and *E. faecium* SJRP28 and SJRP69, and *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus* SJRP49 were resistant to erythromycin (E) (Table 4).

The concern about antibiotics resistance is partly due to the indiscriminate use of this kind of medicine by human beings, agriculture, livestock, and LAB, pathogenic bacteria, and opportunistic bacteria can acquire and/or transmit antibiotic resistance and virulence genes by transposons and plasmids, resulting in conjugation or transformation (Grattepanche et al. 2008).

Cunha et al. (2013) reported in their study that all strains of *Lactobacillus* spp. isolated from fermented milk were resistant to vancomycin and sensible to

erythromycin, clindamycin and tetracycline. Additionally, the LAB strains presented different profiles of susceptibility to gentamycin and erythromycin and also for the other antimicrobial compounds.

Once LAB strains can be used in dairy food, a subject of concern regarding LAB as potential probiotic strains is the transference of resistance genes to pathogenic bacteria present in the GIT, which may pose a risk for the host (De Paula et al. 2015). Then, a strain resistant to antibiotics has to be carefully evaluated before to be applied as a commercial probiotic strain.

3.3. Selection of LAB strains for additional tests

The strains of *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 presented the best collected features to be used as probiotic, because they demonstrate production of the bile salts hydrolase enzyme, high capacity of auto-aggregation and hydrophobicity, low co-aggregation with pathogens, tolerance to different pH and NaCl, and low resistance to antibiotics, satisfying in an efficient way the desirable features in the selection process. Additional tests were realized to these two strains in order to complement their probiotic potential evaluation.

3.4. Tolerance to simulated GI tract conditions

Both LAB strains, *E. faecium* SJRP20 and SJRP65, survived until 360 min of analysis (Table 5), which is equivalent to the passage of the bacteria through the gastrointestinal tract in human beings. There was no significant difference on the populations between the initial phase and the gastric phase and the strains survived well during 2 h at pH 2.5. However, there was a reduction of 2 log CFU/mL when compared to the initial and enteric phases in both strains, existing statistic differences between the beginning and the end of the analysis. But, comparing the gastric phase and the enteric phase, even after the addition of bile and pancreatin and the increasing of pH to 8, the *E. faecium* SJRP20 do not differ statically on these phases, while the *E. faecium* SJRP65 presented reduction. Even with the reduction of the population on the pancreatic phase,

the quantity of viable bacteria was high, being 8.57 log CFU/mL to *E. faecium* SJRP20 and 8.14 log CFU/mL to *E. faecium* SJRP65 (Table 5) after 360 min. Studies conducted by Jeronimo-Ceneviva et al. (2014) using LAB strains isolated from the same source demonstrated lower cell viability after 360 min of analysis, from 2.79 log CFU/mL for *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP58 to 4.08 log CFU/mL for *Leuc. citreum* SJRP44.

Table 5: Viability of *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 after simulated GI tract conditions (log CFU/mL).

GIT/Strain	SJRP20	SJRP65
Initial	10.61 ^a ± 0.36	10.10 ^a ± 0.11
Gastric phase	9.23 ^{ab} ± 0.47	9.96 ^a ± 0.12
Enteric phase	8.57 ^b ± 0.34	8.14 ^b ± 0.43

^{a, b} Equal letters in the same column did not present significant difference ($p < 0.05$). The results are expressed as mean ± SD.

The benefic effect of the probiotic bacteria to the host is related with its concentration in the intestine lumen, whose value has to be, at least 7 log CFU/g of fecal content. According to the Brazilian Agency of Sanitary Vigilance of the Ministry of Health (Brazil 2016), a probiotic product presents benefits of health promotion, if the viable this must be maintained until the expiration date of the product and the conditions of use, distribution and distribution.

LAB which present high capacity of aggregation to the intestinal epithelium colonizes and survive well to the GIT conditions and, provide probiotic effects to the host can be considered interesting for application in fermented commercial products. *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 present strong potential for confer benefits to the consumer health.

Additionally, Amaral et al. (2017) evaluated the survival of Enterococci strains, including *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 in the presence of sixty-two commercial medications, commonly consumed by people, belonging to different groups (analgesic,

anti-inflammatory, antihypertensive, etc), and these two strains had shown more resistance to the presence of medications (77.42 % of resistance to the tested medications) in comparison with the probiotic *Lb. acidophilus* La-5 (72.58 of resistance to the tested medications). Considering that several studies have shown evidences of these medications' interferences in the probiotic properties, strains which resist to harsh conditions present an essential role for potential application in food or supplements.

3.5. Adherence to caco-2 cells

Both strains presented low adherence to Caco-2 cells; *E. faecium* SJRP20 presented $5.7\% \pm 0.9$ of adhesion capacity, while *E. faecium* SJRP65 presented $8.42\% \pm 0.81$. *E. faecium* SJRP65 presented similar adhesion to the reference *Lb. rhamnosus* GG, which presented 11.3% adherence to Caco-2 cells (Todorov et al. 2011), using the same method. Todorov et al. (2011) also observed adhesion ranging between 7.9 and 9.0 % among *E. faecium* (ET 05, ET 12 and ET 88), that are below the limits of the reference strain *Lb. rhamnosus* GG but close to the strains of the same species, used in this study.

High ability to adhere to mucosal surfaces the intestine plays an important feature because the strain may be able to activate the genes encoding antimicrobial compounds, such as bacteriocins, which may act against pathogens present in the GIT (De Paula et al. 2014). In contrast, the low capacity of adhesion to intestinal cells can result in reduced time for the excretion of probiotics in feces (Casarotti et al. 2014).

It is difficult to generalize the adherence of probiotic bacteria to Caco-2 cells *in vitro* to simulate the human GIT, because the defense system of the host, the competition with the microbiota, the mucous layer and the peristaltic flow *in vivo* can modify the bacterial adhesion (Lebeer et al. 2008). However, using *in vitro* assays is possible to understand the mechanisms of adhesion and provide important information about the difference between the strains and the bacterial species (Jensen et al. 2012).

3.6. β -galactosidase enzyme activity

In this study, both strains of *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 demonstrated the capacity to produce β -galactosidase enzyme. The production of this enzyme by LAB strains has a great importance for the consumer health, because β -galactosidase, popularly known as lactase, has the function of hydrolyze the lactose on the brush border of the small intestine, into galactose and glucose, which are rapidly assimilated in the blood flow.

The activity of β -galactosidase is a beneficial attribute for the probiotic potential of the LAB, being a common feature of the genera *Lactobacillus* and *Enterococcus* (Todorov et al. 2014). The dairy industry has invested in searches by β -galactosidase enzyme producer strains, in order to help consumers with problems of intolerance to lactose. The decline of the activity of the β -D-galactosidase enzyme is a biological feature of the human intestine. In intolerant people, the consumption of lactose, generate discomfort, gas retention, abdominal pain and flatulence. These symptoms are induced with the indigestion of the lactose in the large intestine, which is then fermented by the intestinal microbiota.

Studies have demonstrated that people with hypolactasia can consume fermented milk containing β -galactosidase enzyme producer strains, because it hydrolyze the lactose and helps the absorption of the monosaccharides in the intestine, and consequently relieves the symptoms of the intolerance (Gheytanchi et al. 2010).

β -galactosidase resists to the adverse environment of the intestinal lumen, persisting in the duodenum and in the ileum, being possible to occur the lactose hydrolyze in these places, increasing the tolerance to this disaccharide (Vasiljevic and Shah 2008). Gheytanchi et al. (2010) reported that the consumption of a combination of the probiotics *Lb. casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult seems to improve the lactose tolerance symptoms, and these effects can resist by, at least, 3 months after the suspension of that consumption.

3.7. Presence of genes implicated in adhesion, aggregation and colonization, and genes encoding virulence factors and antibiotic resistance

The strain *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 did not present any genes implicated in adhesion, aggregation and colonization (Table 6). Regarding antibiotics resistance, *E. faecium* SJRP20 presented the genes *vanC1*, *bcr(B)*, *erm(B)*, *erm(C)* and *ant(4')-Ia*, which encode for vancomycin, bacitracin, erythromycin and aminoglycoside resistance (Table 7). *E. faecium* SJRP65 showed less genes related to antibiotic resistance, only *ant(4')-Ia* and *ant(3')-III-a* genes were detected.

Table 6: Presence of genes implicated in adhesion, aggregation and colonization in LAB strains.

Gene	Encoded factor	<i>E. faecium</i>		References
		SJRP20	SJRP65	
<i>Mub</i>	adhesion proteins	-	-	Ramiah et al. (2007)
<i>mapA</i>	adhesion proteins	-	-	Ramiah et al. (2007)
<i>Ef-Tu</i>	elongation factor	-	-	Ramiah et al. (2007)
<i>EF 2662-cbp</i>	choline binding protein	-	-	Fortina et al. (2008)
<i>EF 1249-fbp</i>	fibrinogen binding protein	-	-	Fortina et al. (2008)
<i>EF 2380-maz</i>	membrane-associated zinc metalloprotease	-	-	Fortina et al. (2008)
<i>prgB</i>	surface protein	-	-	Fortina et al. (2008)

+ Means presence and – absence of genes.

Gaglio et al. (2016), evaluating the antimicrobial resistance and virulence of enterococci of surfaces of traditional equipment, raw materials and cheeses, found that of forty strains tested, all tested negative for vancomycin resistance, only two, showed high resistance to aminoglycosides and to erythromycin corroborating with the results found in this study. The main threat associated with these bacteria is that they can transfer resistance genes to pathogenic bacteria, which has been a major cause of concern for human and animal health (Zhou et al. 2012).

Besides the presence of vancomycin resistance gene *vanC1* in *E. faecium* SJRP20, the other genes *vanA*, *vanB*, *vanC2* and *vanC3* investigated by PCR,

resulted in negative amplification for any of the tested genes. However, both strains *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 presented the resistance phenotype to vancomycin and only *E. faecium* SJRP20 was positive for *vanC1* gene, indicating that this characteristic could be related to other resistance types, such as *vanD*, *vanE* or *vanG* (Courvalin 2006). Additionally, *vanA* and *vanB* are normally located on plasmid DNA, while *vanC*, *vanD*, *vanE* and *vanG* are located on bacterial chromosome (Martín-Platero et al. 2009). So, the major concern of spreading antibiotic resistance via horizontal gene transfer is associated with *vanA* and *vanB* genes, which are absent in both strains.

It is known that starter cultures used in fermented foods can be potential reservoirs of resistant genes; therefore, the risk of transfer of these genes to other bacteria is increased, and depending on the type and combination of virulence factors, the antibiotic resistance becomes crucial for the strain pathogenicity (Pieniz et al. 2015).

The *bcrABC* genes were identified in *Bacillus licheniformis* and encode for an ABC transporter that pumps the bacitracin molecule out of the bacterial cell. Bacitracin is a mixture of cyclic peptides which disrupt both Gram-positive and Gram-negative bacteria by interfering with cell wall and peptidoglycan synthesis. Homologues to the ABC transporter have been found in *B. subtilis*, *Streptococcus mutans* and *E. faecalis* (Charlebois et al. 2012). In *E. faecalis*, these genes have been associated with high-level bacitracin resistance. Additionally, this gene cluster was reported to be located on a transferable plasmid (Matos et al. 2009), which can be a concern for strains to be used in food applications.

The *erm(B)* and *erm(C)* genes, which encode for erythromycin resistance was positive for genotypic character in *E. faecium* SJRP20, however the gene is silent because it was not phenotypically expressed – the erythromycin resistance was not observed (Table 4). The presence of *erm(B)* gene is a result in accordance with the findings of other authors. In the study of Guerrero-Ramos et al. (2016), the *erm(B)* gene was the most prevalent in erythromycin resistant strains, and was observed in 17 of the 49 isolates.

The *ant(4')-Ia* and *ant(3')-III-a* genes are associated with aminoglycoside resistance. The main mechanism of aminoglycoside resistance is drug inactivation by

cellular aminoglycoside-modifying enzymes (Sattari 2009). These genes are also found in *Staphylococci* and *Pseudomonas*. In this study, although only two genes encoding aminoglycoside resistance were detected, both strains showed phenotypical resistance to aminoglycosides (resistant to gentamycin and kanamycin, and moderately sensible to streptomycin (Table 4).

Table 7: Presence of genes implicated in virulence factors and antibiotic resistance in LAB strains.

Gene	Encoded factor	<i>E. faecium</i>		References
		SJRP20	SJRP65	
Antibiotic resistance				
<i>aac (6')-Ii</i>	aminoglycoside resistance	-	-	Costa et al. (1993)
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	aminoglycoside resistance	-	-	Fortina et al. (2008)
<i>ant (4')-Ia</i>	aminoglycoside resistance	+	+	Fortina et al. (2008)
<i>aph (2'')-Ib</i>	aminoglycoside resistance	-	-	Fortina et al. (2008)
<i>aph (2'')-Ic</i>	aminoglycoside resistance	-	-	Fortina et al. (2008)
<i>aph (2'')-Id</i>	aminoglycoside resistance	-	-	Fortina et al. (2008)
<i>aph (3')-III-a</i>	aminoglycoside resistance	-	+	Fortina et al. (2008)
<i>bcr(B)</i>	bacitracin resistance	+	-	Manson et al. (2004)
<i>bcr(D)</i>	bacitracin resistance	-	-	Manson et al. (2004)
<i>bcr(R)</i>	bacitracin resistance	-	-	Manson et al. (2004)
<i>cat A(PIP501)</i>	chloramphenicol resistance	-	-	Aerestrup et al. (2000a)
<i>erm(A)</i>	erythromycin resistance	-	-	Sutcliffe et al. (1996)
<i>erm(B)</i>	erythromycin resistance	+	-	Sutcliffe et al. (1996)
<i>erm(B)</i>	erythromycin resistance	+	-	Gevers et al. (2003)
<i>erm(C)</i>	erythromycin resistance	-	-	Sutcliffe et al. (1996)
<i>Int</i>	transposon integrase gene	-	-	Gevers et al. (2003)
<i>int-Tn</i>	tetracycline resistance	-	-	Fortina et al. (2008)
<i>tet(K)</i>	tetracycline resistance	-	-	Aerestrup et al. (2000b)
<i>tet(L)</i>	tetracycline resistance	-	-	Aerestrup et al. (2000b)
<i>tet(M)</i>	tetracycline resistance	-	-	Aerestrup et al. (2000b)
<i>tet(O)</i>	tetracycline resistance	-	-	Aerestrup et al. (2000b)
<i>tet(S)</i>	tetracycline resistance	-	-	Aerestrup et al. (2000a)
<i>van A</i>	vancomycin resistance	-	-	Martin-Platero et al. (2009)
<i>van B</i>	vancomycin resistance	-	-	Martin-Platero et al. (2009)
<i>van C1</i>	vancomycin resistance	+	-	Miele et al. (1995)
<i>van C2</i>	vancomycin resistance	-	-	Dutka-Malen et al. (1995)
<i>van C2, van C3</i>	vancomycin resistance	-	-	Dutka-Malen et al. (1995)
<i>vatE</i>	streptogramin resistance	-	-	Robredo et al. (2000)

Table 7. Continuation

Gene	Encoded factor	<i>E. faecium</i>		References
		SJRP20	SJRP65	
Virulence				
<i>Ace</i>	adhesion of collagen	-	-	Martin-Platero et al. (2009)
<i>asa1</i>	aggregation substance	-	-	Vankerhoven et al. (2004)
<i>Ccf</i>	sex pheromones, chemotactic for human leukocytes; facilitate conjugation	+	-	Eaton and Gasson (2001)
<i>Cob</i>	sex pheromones, chemotactic for human leukocytes; facilitate conjugation	-	-	Eaton and Gasson (2001)
<i>Cpd</i>	sex pheromones, chemotactic for human leukocytes; facilitate conjugation	-	-	Eaton and Gasson (2001)
<i>cylA</i>	Cytolysin	-	-	Vankerhoven et al. (2004)
<i>efaA</i>	endocarditis antigen	+	+	Martin-Platero et al. (2009)
<i>Esp</i>	enterococcal surface protein	-	-	Vankerhoven et al. (2004)
<i>fsrA</i>	Gelatinase	-	-	Lopes et al. (2006)
<i>fsrB</i>	Gelatinase	-	-	Lopes et al. (2006)
<i>fsrC</i>	Gelatinase	-	-	Lopes et al. (2006)
<i>gelE</i>	Gelatinase	-	-	Vankerhoven et al. (2004)
<i>Hyl</i>	Hyaluronidase	-	-	Vankerhoven et al. (2004)
<i>mur2ed</i>	virulance of <i>Enterococcus</i> sp.	-	-	Arias et al. (2006)
<i>mur2f</i>	virulance of <i>Enterococcus</i> sp.	-	-	Chu et al. (1992)
<i>sprE</i>	serine protease	-	-	Lopes et al. (2006)
Biogenic amines				
<i>hdc1</i>	histidine decarboxylase	-	-	de Las Rivas et al. (2005)
<i>hdc2</i>	histidine decarboxylase	-	-	de Las Rivas et al. (2005)
<i>odc</i>	ornithine decarboxylase	-	-	de Las Rivas et al. (2005)
<i>tdc</i>	thyrosine decarboxylase	-	-	de Las Rivas et al. (2005)

+ Means presence and – absence of genes.

Multidrug-resistant enterococci are considered crucial drivers for the dissemination of antimicrobial resistance determinants within and beyond a genus. These organisms may pass numerous resistance determinants to other harmful pathogens, whose multiple resistances would cause adverse consequences. Therefore, an understanding of the coexistence epidemiology of resistance genes is critical (Martin et al. 2005), however such information remains limited.

Regarding the virulence factors, both strains *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 presented *efaA* gene (endocarditis antigen), and *ccf* gene (sex pheromones) was a feature of *E. faecium* SJRP20. Although sex pheromones (*ccf*, *cob*, *cpd*) are not considered as virulence factors, their production in enterococci may favor the dissemination of virulence determinants and promote acquisition of antibiotic resistance and other linked traits from other enterococci and lead to increased virulence (Eaton and Gasson 2001). Then, the presence of *ccf* gene, as well as the presence of gelatinase (*gelE*), enterococcal surface protein (*esp*), enterococcal surface adhesion (*ace*), aggregation substance (*agg*), cytolysin operon (*cylA*), surface adhesin gene (*efaA*), and biofilm formation has been associated to enterococcal virulence factors (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2016).

In the control group of vancomycin-susceptible enterococci, Sauer et al. (2009) observed absence of the studied virulence factors only in 11.1 % of clinical isolates, and the most prevalent gene was *ccf* (77.7 %, n = 42), while in the vancomycin-resistant enterococci group, the more prevalent gene was *esp* in 62.9 % isolates and *ccf* gene was a feature of only 5.6 % isolates. In the study of Sánchez-Valenzuela et al. (2010), only one isolate from swordfish (*Xiphias gladius*) fillet showed the *ccf* gene, similar to our findings. Despite the *ccf* determinant encodes for sex pheromone production, the authors do not consider the presence of *ccf* sex pheromone gene a concern for the safety of strains because of its very low incidence (4.2% among the isolate).

The endocarditis antigen (*efaA*), first identified from the antiserum of a patient with *E. faecalis* endocarditis bears similarity to adhesins encoded by genes in *Streptococci* (Sedgley et al. 2005). In the study of Martin et al. (2005), the virulent-

associated genes *efaAfm* and *efaAfs* were detected in 31.3 and 27.1% of *Enterococci*, respectively, isolated from chorizo (slightly fermented sausages) strains respectively. Perin et al. (2014) also observed *efaA* gene in *E. durans*, *E. fecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *Lc. lactis* and *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *vanA* gene in *E. fecalis*, *E. hirae* and *Lc. lactis* subsp. *lactis* isolated from raw goat milk.

The presence of virulence factors is a concern because they increase the ability of microorganisms to cause diseases and contribute to enhance infection risks, and *Enterococci* are often associated with nosocomial infections and cause human diseases such as bacteremia, endocarditis or urinary tract infections (Hwanhlem et al. 2013). Additionally, the virulence factors enable the bacteria to act as opportunistic pathogens (Ahmadova et al. 2013).

None of the genes related to biogenic amine production (*hdc1*, *hdc2*, *tdc* and *odc*) were detected in the tested strains. These results are interesting because enterococci are one of the main groups of LAB responsible for the production of biogenic amines in fermented dairy foods (Jiménez et al. 2013). On the other hand, the presence of these genes has been reported for *Lactobacillus* sp (Jeronymo-Ceneviva et al. 2014; Casarotti et al. 2017) and *Enterococcus* sp (Perin et al. 2014). Biogenic amines are formed as the result of bacterial decarboxylation of amino acids and these substances can accumulate in foods containing LAB due to their proteolytic activity. It is known that high concentrations of biogenic amines in food, from 50 to 100 mg, can be toxic to the consumers who have problems with the detoxification system, due to vasoactive and psychoactive properties of such substances (Perin et al. 2014). The toxic activity of biogenic amines impacts important physiological function in human, such as brain activity, immune response, cell growth and differentiation (Jiménez et al. 2013). For this reason, it is necessary to investigate if the strains which are candidates to be applied in food possess biogenic amines genes.

Considering the low incidence of virulence factors detected in the *E. faecium* SJRP65 strain, it is considered safe and stimulates further investigations about their technological behavior and future applications in fermented food products.

4. CONCLUSION

Considering all results into account it is important to mention that none of the LAB strains presented inhibitory activity against pathogenic microorganisms, and *E. faecium* SJRP20 and *Lb. fermentum* SJRP42 showed ability to hydrolyse the salts of taurocholic and taurodeoxycholic acids. Most of LAB strains presented high auto-aggregation and hydrophobicity, and they tolerate better the pH 5.0, and the tolerance to NaCl was higher at 30 °C. None of the LAB strains degraded the mucin and the susceptibility to antibiotics was strain-specific. *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 revealed to have good probiotic potential. Additionally, they resisted well to the simulated GIT, adhered to Caco-2 cell and produced β -galactosidase enzyme. The strain *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 did not present any genes implicated in adhesion, aggregation, colonization, and production of biogenic amines. *E. faecium* SJRP65 showed less genes related to antibiotic resistance and virulence factors. *E. faecium* SJRP65 presented good functional properties, with interesting features for application in dairy products. Further *in vivo* tests must be realized to guarantee their safety and probiotic potential prior their use in the food applications.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil, Project N° 2014/02131-8) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for the financial support. The authors would also like to thank Ms. José Manoel de Moura Filho for his assistance with statistical analysis.

REFERENCES

- Aarestrup FM, Agerso Y, Smidt PG, Madsen M, Jensen LB (2000 b) Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers , and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* 37:127–137.
- Aarestrup FM, Agersø Y, Ahrens P, Christian J, Madsen M, Jensen LB (2000 a) Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Vet Microbiol* 74:353-364.
- Acurcio LB, Souza MR, Nunes AC, Oliveira DLS, Sandes SHC, Alvim, LB (2014) Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. *Braz J Vet Res Ann Sci* 66:940-948.
- Adams, CA (2010) The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nut Res Rev* 23:37–46.
- Ahmadova A, Todorov SD, Choiset Y, Rabesona H, Zadi TM, Kuliyevev A, Franco BDGM, Chobert JM, Haertlé T (2013) Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control* 30:631-641.
- Amaral DMF, Silva LF, Casarotti SN, Nascimento LCS, Penna ALB (2017) *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications, under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *J Dairy Sci*: 100:933-949.
- Ashraf S, Shah N (2014) Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci* 54:938-956.
- Barbosa TM, Levy SB (2000) The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updates* 3:303-311.

Bautista-Gallego J, Jiménez-Días R, Arroyo-López F, Fernandes AG (2013) Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Res Int* 50:135-142.

Brazil, Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) (2008). Food with health claims, new food/ingredients, bioactive compounds and probiotics. http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm (in Portuguese). (accessed 29 October 2015).

Brazil, Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) (2016). Foods with claims of functional and health properties. <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes.htm> (in Portuguese). (accessed 12 February 2016).

Cavaliere SJ, Rankin ID, Harbeck RJ, Sautter RL, Mccarter YS, Sharp SE, Ortez JH, Spiegel CA (2005) Manual of antimicrobial susceptibility testing. American Society for Microbiology. Seattle, Washington.

Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A (2016) Virulence factors, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from retail shrimps. *LWT Food Sci Technol Int* 69:117-122.

Charlebois A, Jalbert LA, Harel J, Masson L, Archambault M (2012) Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*. *Plos One* 7(9):e44449.

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK (1998) Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Protect* 61:1636-1643.

Chu CP, Kariyama R, Daneo-Monroe L, Shockman GD (1992) Cloning and sequence analysis of the muramidase-2 gene from *Enterococcus hirae*. *J Bacteriol* 174:1619-1625.

Casarotti SN, Carneiro BM, Penna ALB (2014) Evaluation of the effect of supplementing fermented milk with quinoa flour on probiotic activity. *J Dairy Sci* 97:6027-6035.

Casarotti SN, Carneiro BM, Todorov SD, Nero LA, Rahal P, Penna ALB. *In vitro* assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water - buffalo Mozzarella cheese. *Ann Microb In press*. (DOI: 10.1007/s13213-017-1258-2).

Cheng G, Feng AN, Mei-Juan Z, Xiu-Hua Hao SJ, Yun-Xia HE (2004) Time- and pH-dependent colon-specific drug delivery for orally administered diclofenac sodium and 5-aminosalicylic acid. *World J Gastroentero* 10:1769-1774.

Costa Y, Galimand M, Leclercq R, Duval J, Courvalin P (1993) Characterization of the chromosomal *aac (6')-II* gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1896–1903.

Courvalin P (2006) Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 42:S25-S34.

Cunha AF, Acurcio LB, Assis BS, Oliveira DLS, Leite MO, Cerqueira MMOP, Souza MR (2013) *In vitro* probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from fermented milks. *Arq Bras Med Vet Zootec* 65:1876-1882.

de Dea Lindner J, Penna ALB, Demiate IM, Yamaguishi CT, Prado MRM, Parada JL (2013) Fermented foods and human health benefits of fermented functional foods. In: Soccol, C. R.; Pandey, A.; Larroche, C. *Fermentation Processes Engineering in the Food Industry*. Boca Raton: CRC Press, 2013, p. 263-298.

de Las Rivas B, Marcobal A, Munoz R (2005) Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiol Lett* 244:367-372.

de Paula AT, Jeronymo-Ceneviva AB, Silva LF, Todorov SD, Franco BDGM, Penna ALB (2014) *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Ann Microb* 65:899-910.

de Paula AT, Jeronymo-Ceneviva AB, Todorov SD, Penna ALB (2015) The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. *Food Rev Int* 31:147-171.

Divya JB, Varsha KK, Nampoothiri KM (2012) Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. *Appl Biochem Biotech* 167:1314-1324.

Doyle RJ, Rosenberg M (1995) Measurement of microbial adhesion to hydrophobic substrata. *Method Enzymol* 253:542-550.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 33:24-27.

Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (2006) *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria*. 3 Ed. Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. New York: Springer Science+Business Media, Inc.

Eaton TJ, Gasson MJ (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microb* 67:1628–1635.

EFSA (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance *EFSA Journal* 10:10 pp. doi:10.2903/j.efsa.2012.2740. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal. Accessed 28 July 2016.

Favaro L, Basaglia M, Casella S, Hue I, Dousset X, Franco BDGM, Todorov SD (2014) Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiol* 38: 228-239.

Favaro L, Penna ALB, Todorov SD (2015) Bacteriocinogenic LAB from cheeses - Application in biopreservation? Trends Food Sci. Technol 41:37-48.

FAO/WHO. (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London ON, Canada.

Fortina MG, Ricci G, Borgo F, Manachini PL, Arends K, Schiwon K, Abajy MY, Grohmann E (2008). A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. Int J Food Microbiol 123:204-211.

Gaglio R, Couto N, Marques C, Lopes MFS, Moschetti G, Pomba C, Settanni L (2016) Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. Int J Food Microbiol 236:107-114

Ganjian H, Nikokar I, Tieshayar A, Mostafaei A, Amirmozafari N, Kiani S (2012). Effects of salt stress on the antimicrobial drug resistance and protein profile of *Staphylococcus aureus*. Jundishapur J Microbiol 5:328-331.

Gevers D, Danielsen M, Huys G, Swings J (2003). Molecular Characterization of *tet* (*M*) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. Appl Environ Microb 69:1270-1275.

Gheyntanchi E, Heshmati L, Shargh BK, Nowroozi J, Movahedzadeh F (2010) Study on β -galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. Afr J Microbiol Res 4:454-458.

Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ (1984) Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J Dairy Sci 67:3045-3051.

Górska S, Grycko P, Rybka J, Gamian A (2007) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure and biosynthesis. Postepy Hig Med Dosw 14: 805-818.

Grattepanche F, Miescher-Schwenninger S, Meile L, Lacroix C (2008) Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. *J Dairy Sci* 88:421-444.

Guerrero-Ramos E, Molina-González D, Blanco-Morán S, Igrejas G, Poeta P, Alonso-Calleja C, Capita R (2016) Prevalence, antimicrobial resistance, and genotypic characterization of vancomycin-resistant *Enterococci* in meat preparations. *J Food Protect* 79:748-756.

Hemme D, Foucaud-Scheunemann C (2004) *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int Dairy J* 14:467–494.

Hwanhlem N, Biscola V, El-Ghaish S, Jaffrès E, Dousset X, Haertlé T, Kittikun AH, Chobert JC (2013) Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Mangrove Forests in southern Thailand as potential bio-control agents: Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L. *Probiotics Antimicrob Proteins* 5:264-278.

Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L (2012) In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 153:216-222.

Jeronimo-Ceneviva AB, De Paula AT, Silva LF, Todorov SD, Franco BDGM, Penna ALB (2014) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo mozzarella cheese. *Probiotics Antimicrob Proteins* 6:141-156.

Jiménez E, Ladero V, Chico I, Maldonado-Barragán A, López M, Martín V, Fernández L, Fernández M, Álvarez MA, Torres C, Rodríguez JM (2013) Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiol* 13:1-12.

Kinoshita H, Wakahara N, Watanabe M, Kawasaki T, Matsuo H, Kawai Y, Kitazawa H, Ohnuma S, Miura K, Horri A, Saito T (2008) Cell surface glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *Lactobacillus plantarum* LA 318 recognizes human A and B blood group antigens. *Res Microbiol* 159:685- 69.

- Koninkx JFJG, Tooten PCJ, Malago JJ (2010) Probiotic bacteria induced improvement of the mucosal integrity of enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to *Salmonella enteritidis* 857. *J Funct Foods* 2:225-234.
- Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 94:981-987.
- Kotzampassi K, Giamarellos-Bourboulis EJ (2012). Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. In *J Antimicrob Agents* 40:288-296.
- Kumar R, Grover S, Batish VK (2012) Bile salt hydrolase (BSH) activity screening of *Lactobacilli*: in vitro selection of indigenous *Lactobacillus* strains with potential bile salt hydrolysing and cholesterol-lowering ability. *Probiotics Antimicrob Proteins* 4:162-172.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC (2008) Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:728-764.
- Linares-Rodriguez JF, Martinez-Menendez JL (2005) Revision: Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23:86-93.
- Liong MT, Shah NP (2006) Effects of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats. *J Dairy Sci* 89:1390-1399.
- Lopes MDFS, Simões AP, Tenreiro R, Marques JJF, Crespo MTB (2006) Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol* 112:208-214.
- Manson JM, Keis S, Smith JMB, Cook GM (2004) Acquired bacitracin resistance in enterococcus faecalis is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3743-3748.
- Martin B, Garriga M, Hugas M, Aymerich T (2005) Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *J Appl Microbiol* 98:1177-1190.

- Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M (2009) Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int J Food Microbiol* 132:24-32.
- Matos R, Pinto VV, Ruivo M, Lopes MF (2009) Study on the dissemination of the *bcrABDR* cluster in *Enterococcus* spp. reveals that the *BcrAB* transporter is sufficient to confer high-level bacitracin resistance. *Int J Antimicrob Agents* 34:142-147.
- Mcauliffe O, Cano RJ, Klaenhammer TR (2005) Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microb* 71:4925-4929.
- Miele A, Bandera M, Goldstein BP (1995) Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in enterococci and to study gene organization in *vanA* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1772-1778.
- Moser SA, Savage DC (2001) Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl Environ Microb* 67:3476-3480.
- Penna ALB, de Paula AT, Casarotti SN, Silva LF, Diamantino VR, Todorov SD (2015). Overview of the functional lactic acid bacteria in fermented milk products. In: Rai R and Bai JA (Ed.), *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*. CRC Press: Taylor and Francis Group. USA, pp. 113-149.
- Peres CM, Alves M, Hernandez-Mendoza A, Moreira L, Silva S, Bronze MR, Vilas-Boas L, Peres C, Malcata FX (2014) Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT - Food Sci Technol* 59:234-246
- 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* 185:121-126.

- Pieniz S, Moura TM, Cassenego APV, Andreazza R, Frazzon APG, Camargo FAO, Brandelli A (2015) Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. Food Control 51:49-54.
- Pingitore EV, Todorov SD, Sesma F, Franco BDGM (2012) Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. Food Microbiol 32:38-47.
- Ramiah K, Van Reenen CA, Dicks LMT (2007) Expression of the mucus adhesion genes *Mub* and *MapA*, adhesion-like factor *EF-Tu* and bacteriocin gene *plaA* of *Lactobacillus plantarum* 423, monitored with real-time PCR. Int J Food Microbiol 116:405-409.
- Ranadheera CS, Evans CA, Adams MC, Baines SK (2012) In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. Food Res Int 49:619-625.
- Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB (2012) Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. Food Eng Rev 4:124-140.
- Robredo B, Singh KV, Torres C, Murray BE (2000) Streptogramin resistance and shared pulsed-field gel electrophoresis patterns in vanA-containing *Enterococcus faecium* and *Enterococcus hirae* isolated from humans and animals in Spain. Microb Drug Resist 6:305-311.
- Robredo B, Singh KV, Baquero F, Murray BE, Torres C (1999) From *vanA* *Enterococcus hirae* to *vanA* *Enterococcus faecium*: A study of feed supplementation with avoparcin and tylosin in young chickens. Antimicrob Agents and Chemother 43:1137-1143.
- Sánchez-Ortiz AC, Luna-González A, Campa-Córdova AI, Escamilla-Montes R, Flores-Miranda MDC, Mazón-Suástegui JM (2015) Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. Lat Am J Aquat Res 43:123-136.

- Sánchez-Valenzuela A, Benomar N, Abriouel H, Cañamero MM, Gálvez A (2010) Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol* 27:955-961.
- Santos KMO, Vieira ADS, Salles HO, Oliveira JS, Rocha CRC, Borges MF, Bruno LM, Franco BDGM, Todorov SD (2015) Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. *Brazilian J Microbiol* 46:237-249.
- Sattari M (2009) Prevalence of *ant(4')-Ia* gene among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using Multiplex-PCR method. *Pathol Res Pract* 12:59-68.
- Sauer P, Síla J, Vágnerová I (2009) Virulence factors in vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant enterococci in the University Hospital Olomouc. *Klin Mikrobiol Infekc Lek Journal* 15:44-47.
- Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, Dahlgren G (2005) Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol* 20:10-19.
- Silva LFS, Casella T, Gomes ESG, Nogueira MCL, Lindner JD, Penna ALB (2015) Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo Mozzarella cheese. *J Food Sci* 80:411-417.
- Silva LF (2015) Diversidade e evolução da microbiota láctica autóctone em queijo Muçarela de búfala e aplicação tecnológica dos isolados [Diversity and evolution of autochthonous lactic microbiota in water buffalo Mozzarella cheese and technological application of isolates]. **Thesis**. Department of Food Engineering and Technology, São Paulo State University, São José do Rio Preto, Brazil.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-kamradt A, Wondrack L (1996) Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2562-2566.

Tanaka H, Doesburg K, Iwasaki T, Mierau I (1999) Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J Dairy Sci* 82:2530-5.

Thomas, LV (2016) Probiotics – the journey continues. *Int J Dairy Technol* 69:469-480.

Todorov SD, Botes M, Guigas C, Schillinger U, Wiid I, Wachsman MB, Holzapfel WH, Dicks LM (2008) Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 104:465-477.

Todorov SD, Franco BDGM, Wiid IJ (2014) *In vitro* study of beneficial properties and safety of lactic acid bacteria isolated from Portuguese fermented meat products. *Benef microbes* 5:351-366.

Todorov SD, Furtado DN, Saad SM, Tome E, Franco BD (2011) Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *J Appl Microbiol* 110:971-986.

Todorov SD, Le Blanc JG, Franco BDGM (2012) Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. *J Microbiol Biotech* 28:973-984.

Tuan TN, Duc PM, Hatai K (2013) Overview of the use of probiotics in aquaculture. *Int J Fisheries and Aquaculture* 3:89-97.

Tuo Y, Zhang W, Zhang L, Ai L, Han X, Yi H (2013) Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Anaerobe* 21:22-27.

Vasiljevic T, Shah NP (2008) Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J* 18:714-728.

Vandeplans Y, Huys G, Daube G (2015) Probiotics: an update. *J Pediatrics* 91:6-21.

Vankerckhoven V, Autgaerden T, Van Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Goossens H (2004) Development of a multiplex PCR for the Detection of *asaI*, *gelE*,

cylA, *esp*, and *hyl* Genes in *Enterococci* and survey for virulence determinants among european hospital isolates of *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol 42:4473-4479.

Von Mollendorff JW, Todorov SD, Dicks LM (2007) Factors affecting the adsorption of bacteriocins to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus* sp. Appl Biochem Biotech 142:209-220.

Yung C, Wan M, Shah N, El-Nezami H (2016) *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances intestinal mucus barrier upon *Escherichia coli* infection, Conference proceeding. Paper presented at International scientific conference on probiotics and prebiotics 2016. In: Kysucke Nove Mesto, by PAMIDA International. ISBN - 978-80-89589-14-2

Zhou JS, Gopal PK, Gill HS (2001) Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. Int J Food Microbiol 63:81-90.

Zhou N, Zhang JX, Fan MT, Wang J, Guo G, Wei XY (2012) Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. J Dairy Sci 95:4775-4783.

CAPITULO 3

Comportamento de *Enterococcus faecium* potencialmente probióticos em leite

Comportamento de *Enterococcus faecium* potencialmente probióticos em leite

RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado a importância do consumo de alimentos funcionais para a saúde do homem. Dentre os diversos produtos funcionais da indústria alimentícia, os leites fermentados tem se destacado, o que leva a busca por novas linhagens bacterianas que apresentem características favoráveis à qualidade sensorial dos produtos e à saúde dos consumidores. Esse trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento de *Enterococcus faecium* potencialmente probióticos em leite: cinética de acidificação, pós-acidificação, resistência às condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI) e capacidade de sequestro de radicais livres. Foram utilizadas as cepas *E. faecium* SJRP20 e SJRP65, previamente selecionadas em função do potencial probiótico e da segurança. Para avaliar a cinética de acidificação, foram quantificados: velocidade máxima de acidificação ($V_{\text{máx}}$), tempo necessário para atingir a velocidade máxima ($T_{V_{\text{máx}}}$), pH registrado na velocidade máxima de acidificação ($\text{pH}_{V_{\text{máx}}}$), tempo necessário para atingir o pH 5,5 ($T_{\text{pH}5,5}$), tempo necessário para atingir o pH 5,0 ($T_{\text{pH}5,5}$) e tempo necessário para atingir o pH 4,6 ($T_{\text{pH}4,6}$ - final da fermentação), utilizando o sistema *Cynetique d'acidification* (CINAC). Os produtos foram estocados sob refrigeração e avaliados quanto à composição centesimal e pós acidificação durante 28 dias. Também foi avaliada a sobrevivência das cepas em leite nas condições simuladas do TGI, e a capacidade de seqüestro de radicais livres usando os métodos ABTS⁺ e DPPH[•] no mesmo período. *E. faecium* SJRP20 em leite apresentou maior $V_{\text{máx}}$ ($7,11 \times 10^{-3}$ upH/min), enquanto que *E. faecium* SJRP65 apresentou menor taxa de acidificação. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na composição centesimal das amostras de leite fermentado inoculado com as cepas de *E. faecium*. Durante a estocagem refrigerada houve redução do pH e aumento da acidez para todas as amostras fermentadas. Os produtos fermentados por ambas as cepas resistiram bem às condições simuladas do TGI, com elevada viabilidade ao longo do período de estocagem. O leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 apresentou elevada capacidade de

sequestro de radicais livres. Com o aumento da concentração de produto e do tempo de estocagem, foi maior a capacidade antioxidante. A fermentação do leite por *E. faecium* potencialmente probióticos apresentou bons resultados, e a cepa *E. faecium* SJRP20 reuniu as melhores características tecnológicas para aplicação em produtos lácteos fermentados funcionais: apresentou maior velocidade de acidificação, menor tempo para atingir a velocidade máxima, maior estabilidade às condições do TGI durante a estocagem refrigerada e alta capacidade de sequestro de radicais livres.

Palavras-chaves: Bactérias ácido-láticas, Leites fermentados, Viabilidade; Capacidade Antioxidante.

Behavior of potentially probiotic *Enterococcus faecium* in milk

ABSTRACT

Recent studies have demonstrated the importance of the functional food consumption for human health. Among various functional products from food industry, the fermented milk has stood out, which causes the search for new bacterial strains that presents favorable characteristics for the sensory quality of products and for consumers' health. This research aimed to evaluate the behavior of potentially probiotic *Enterococcus faecium* in milk: acidification kinetics, post acidification, resistance to the simulated gastrointestinal tract conditions (GIT) and free radical scavenging capacity. The strains *E. faecium* SJRP20 and SJRP65, selected according to the probiotic potential and previously selected according to probiotic potential and their safety. In order to evaluate the kinetics of acidification, it was measured: acidification rate ($V_{\max}$), time at which $V_{\max}$ was reached ($T_{V_{\max}}$), pH at which $V_{\max}$ was reached ($pH_{V_{\max}}$), the time required to reach the pH 5,5 ($T_{pH5,5}$), pH 5,0 ($T_{pH5,5}$) and pH 4,6 ($T_{pH4,6}$ —fermentation ending), using the *Cynétique d'acidification* (CINAC). The products were stored under refrigeration and the gross composition and post acidification were evaluated during 28 days. The survival of strains in milk under the simulated GIT conditions and the free radical scavenging capacity, using the ABTS⁺ and DPPH[•] methods were also evaluated in the same period. *E. faecium* SJRP20 in milk presented higher $V_{\max}$ (7.11×10^{-3} upH/min), while *E. faecium* SJRP65 presented lower acidification rate. The gross composition was not considerable difference ($p < 0,05$) between the fermented milk samples inoculated with the strains *E. faecium*. During the refrigerated storage, there was a reduction of pH value and an increase of acidity for all fermented samples. The fermented products by both strains resisted well the simulated GIT conditions, with high viability during the storage period. Milk samples fermented by *E. faecium* SJRP20 and SJRP65 presented high free radical scavenging capacity. Increasing the product concentration and the storage time, the higher was the antioxidant capacity. The milk fermentation by potentially probiotic *E. faecium* presented good results, and the *E. faecium* SJRP20

strain combined the best technological characteristics for application in functional fermented dairy products: presented higher speed of acidification, lower time to reach the maximum speed, higher stability to the GIT conditions during the refrigerated storage and high free radicals scavenging capacity.

Keywords: Lactic acid bacteria; Fermented milk; Viability; Antioxidant capacity.

1. INTRODUÇÃO

A crescente busca por alimentos funcionais tem levado as indústrias alimentícias a investir de forma substancial no desenvolvimento tecnológico desses produtos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimento com propriedade funcional é todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, com pouca ou nenhuma evidência do contrário, garantindo a manutenção geral da saúde e a redução do risco de doenças. Essas alegações podem descrever o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente, no crescimento, desenvolvimento e nas funções normais do organismo. (BRASIL, 1999; 2016).

Neste segmento de alimentos funcionais, nos últimos anos, têm se destacado os alimentos funcionais probióticos, por trazerem benefícios aos consumidores. Estes benefícios terapêuticos associados à ingestão de probióticos já foram descritos por vários pesquisadores. Eles afirmam que quando ingeridos em grandes quantidades, influenciam positivamente as funções intestinais (VAN BUER/EN et al., 2015; CASAROTTI et al., 2015; FERNANDEZ et al., 2013).

Os micro-organismos probióticos têm sido utilizados em várias matrizes alimentícias, especialmente em produtos lácteos fermentados: leites fermentados em geral, incluindo iogurtes e kefir, queijos, entre outros (SIMEONI et al., 2014). Os produtos lácteos probióticos detêm grande popularidade e representam a maior parcela do mercado mundial de alimentos funcionais (SIRÓ et al., 2008). O tipo de micro-organismo envolvido, a composição físico-química do substrato e o modo como o processo fermentativo é conduzido, influenciarão nas características do produto final (WESCHENFELDER, 2016).

A escolha de uma cepa bacteriana para utilização em alimentos requer uma série de estudos e cuidados, uma vez que as propriedades probióticas são características de cada cepa, e não do gênero ou até mesmo de uma determinada espécie (JANKOVIC et al., 2012). No geral, além de benefícios à saúde do consumidor, os probióticos devem ter estabilidade durante a vida-de-prateleira, conter um grande número de células viáveis no momento do consumo, não devem ser patogênicos ou tóxicos, e nem resistente a antibióticos, devem apresentar estabilidade frente ao ácido e à bile, capacidade de aderir à mucosa intestinal, capacidade de colonização do trato gastrointestinal (TGI) e capacidade de ser metabolicamente ativo ao nível intestinal (SAAD et al., 2013). Além disso, o consumo diário destas bactérias deve ser em torno de 10^7 - 10^{11} UFC/g do produto (FAO/WHO, 2002).

O gênero *Enterococcus* caracteriza-se por micro-organismos habitantes naturais e colonizadores transitórios do TGI humano. São micro-organismos anaeróbios facultativos, que podem se apresentar na forma de cadeias curtas, aos pares ou isolados, não apresentam citocromos, e são catalase-negativos, exceto algumas linhagens que podem produzir pseudocatalases (GILMORE et al., 2014).

A atividade dos *Enterococcus* nos produtos lácteos parece estar relacionada com a sua atividade lipolítica, utilização de citrato e produção de compostos aromáticos voláteis (AMARAL et al., 2017). Vários estudos demonstram os benefícios da utilização de *Enterococcus*, particularmente, *E. faecium* na produção de alimentos, devido à tolerância a ampla faixa de pH e altas concentrações de cloreto de sódio, além de capacidade bem sucedida de competição e sobrevivência no trato gastrointestinal, inibindo o crescimento de patógenos (BARBOSA; BORGES; TEIXEIRA, 2014).

Em estudo recente de seleção de cepas com potencial probiótico, duas cepas de *E. faecium* (SJRP20 e SJRP65) destacaram-se dentre diferentes linhagens de *Lactobacillus* e *Enterococcus*. Estas cepas apresentaram atividade de hidrólise de sais biliares, capacidade de auto-agregação acima de 50% a 4 °C, co-agregação com outras BAL e baixa co-agregação com *L. monocytogenes*, potencial hidrofóbico de

aproximadamente 90%, tolerância a valores de pH próximos ao neutro (5-9), tolerância ao NaCl em concentrações variando entre 0,5 e 3% em temperaturas de 30 °C e 37 °C.

Além disso, tais bactérias apresentaram características importantes para serem consideradas seguras: não degradaram a mucina; foram sensíveis à maioria dos antibióticos testados e não possuem genes de virulência. *E. faecium* SJRP20 e SJRP65, apresentaram adesão à linhagem de células Caco-2, produziram β -galactosidase e em teste *in vitro* foram consideradas tolerantes à passagem pelo TGI, com elevada viabilidade. Estas cepas foram consideradas potencialmente probióticas e com perfil adequado para aplicação em produtos lácteos fermentados.

Desta forma, neste trabalho, o objetivo foi avaliar o comportamento de cepas potencialmente probióticas de *Enterococcus faecium* (SJRP20 e SJRP65) em leite, assim como avaliar o perfil de acidificação, pós acidificação, resistência às condições simuladas do trato gastrointestinal e capacidade de sequestro de radicais livres.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Leite reconstituído

Leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Araçatuba-SP, Brasil, Lote 4364046031 0251), foi reconstituído a 12% de sólidos totais, homogeneizado e tratado termicamente a 85 °C por 15 min. em multiprocessador Thermomix (TM 21, Vorwerk, França). O leite tratado foi resfriado a 10 °C em banho de gelo, a seguir, transferido para frascos de 500 mL e 50 mL previamente autoclavados (121 °C/15 min.), e resfriadas em câmara fria a 4 °C por 24 h.

2.2. Culturas láticas

As cepas de *E. faecium* SJRP20 e SJRP65, previamente selecionadas em função da segurança e do potencial probiótico, foram utilizadas para inoculação individual e direta em leite.

2.3. Preparo do inóculo

As culturas láticas foram reativadas em caldo MRS em estufa a 37 °C/18-24 h, e a população de cada inóculo após o período de incubação foi de aproximadamente 10^7 UFC/ mL. Aliquotas de 1 mL foram centrifugadas (10.000 x g, 10 min., 4 °C), lavadas duas vezes em solução salina estéril (0,85% NaCl) e suspensas em 10 mL do leite em pó reconstituído (item 2.1).

2.4. Fermentação

Os frascos estéreis contendo o leite reconstituído a 12% e pasteurizado foram colocados em banho-maria (42 °C) e inoculados (1 mL/100 mL de leite) individualmente com as cepas de *E. faecium* SJRP20 e SJRP65. Após a inoculação, as amostras inoculadas foram misturadas e acopladas ao sistema *Cynetique d'acidification* (CINAC). A fermentação foi interrompida quando o pH 4,6 (pH final) foi atingido. Os frascos foram resfriados em banho de gelo, por 2 h. Em seguida foi feita a quebra do coágulo manualmente, de maneira padronizada por 2 min. As amostras do leite fermentado foram distribuídas em potes plásticos de 50 mL estéreis e estocados em câmara fria a 4 °C por 28 dias. O processo de fermentação foi realizado em duplicata.

2.5. Parâmetros cinéticos de acidificação

Para o estudo da cinética de acidificação usando o sistema CINAC, o pH foi medido continuamente, a partir da inoculação da cepa, para construção de curva de crescimento em função do tempo. Os parâmetros cinéticos considerados foram: V_m (velocidade máxima de acidificação, em unidades de pH/min); T_m (tempo necessário para atingir velocidade máxima de acidificação, em horas) e $T_{pH\ 5,5}$, $T_{pH\ 5,0}$ e $T_{pH\ 4,6}$ (tempo necessário para atingir pH 5,5, 5,0 e 4,6, respectivamente, em horas), conforme Casarotti et al. (2014). As culturas foram classificadas de acordo com a taxa de acidificação em rápidas, médias ou lentas quando a variação do valor de pH (ΔpH) em relação ao pH inicial atingir 0,4 U de pH em menos de 3 horas, entre 3 e 5 horas, ou mais de 5 horas, respectivamente (AYAD et al., 2004).

2.6. Composição centesimal do leite fermentado

A composição centesimal do leite fermentado com *E. faecium* foi determinada após 24 h do preparo e estocagem a 4 °C, conforme os protocolos da Instrução Normativa nº 68/2006 (BRASIL, 2006). Foram determinados: umidade, cinzas, proteínas e lipídeos; o teor de carboidratos totais foi determinado por diferença.

2.7. Acidez e pH durante a estocagem

As determinações de acidez titulável (AOAC, 2005) e pH (BRASIL, 2006) foram realizadas durante a estocagem refrigerada (1, 14 e 28 dias de fermentação), em triplicata.

2.8. Sobrevivência de *E. faecium* sob condições simuladas do TGI

A sobrevivência das cepas de *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 em leite foi testada sob condições simuladas do TGI durante a estocagem refrigerada (1, 14 e 28 dias de fermentação). Amostras de 1 mL de cada leite fermentado foram transferidas para 9 tubos estéreis do tipo Eppendorf, centrifugadas (10.000 x g, 7 min, 4 ° C) e os pellets foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2, 0,1 M), em seguida, adicionou-se 1 mL de solução salina em 3 tubos Eppendorf, para a contagem inicial de *E. faecium*.

As soluções para simular a fase gástrica e entérica foram preparadas de acordo com Bautista-Gallego et al. (2013), com modificações. A solução que simula o suco gástrico foi preparada a partir de uma solução tampão contendo NaCl (2,05 g/L), KH₂PO₄ (0,6 g/L), CaCl₂ (0,11 g/L) e KCl (0,37 g/L). O pH foi ajustado para 2,0 com NaCl 1 M. A solução que simula o suco entérico foi preparada utilizando Na₂HPO₄ hepta-hidratado (50,81 g/L) e NaCl (8,5 g/L). O pH foi ajustado a 8,0 com KH₂PO₄ anidro. As soluções foram autoclavadas a 121 ° C durante 15 min e armazenadas até a utilização.

A solução gástrica foi adicionada de pepsina (3 g/L) e transferida para seis tubos com as suspensões de *E. faecium*. Os tubos foram incubados em banho-maria a 42 °C por 120 min. Após esse tempo, três tubos foram usados para a contagem de *E. faecium*. A solução entérica foi adicionada de pancreatina (1 g/L) e sais biliares (3 g/L), transferida para os outros três tubos usados na fase gástrica; estes foram incubados em banho-maria a 37 °C por 360 min. e usados para a contagem de *E. faecium*.

A contagem de *E. faecium* foi realizada em alíquotas (1 mL) coletadas em triplicatas, após o tempo de incubação, lavadas e suspensas em solução PBS e inoculadas na superfície do meio MRS ágar (37 °C/48 h), nos tempos 0, 120 e 360 min da análise.

2.9. Capacidade de sequestro de radicais livres de leite fermentado com *E. faecium*

A capacidade de sequestro de radicais livres DPPH[•] e ABTS⁺ das amostras de leite fermentado com *E. faecium* foi determinada conforme Mensor et al. (2001). Nos períodos de 1, 14 e 28 dias de estocagem (4 °C), as amostras foram centrifugadas (8.000 x g por 20 min. a 4 °C), e o sobrenadante foi utilizado no preparo de soluções metanólicas e etanólicas nas concentrações de 10, 50, 100, 150 e 200 mg/mL (BALAKRISHNAN; AGRAWAL, 2014). Aliquotas de 0,3 mL das soluções metanólicas foram adicionadas de 2,7 mL de solução metanólica de DPPH[•] (40 mg/mL). Após 40 min. de reação na ausência de luz, foi feita a leitura da absorbância em comprimento de onda 517 nm em espectrofotômetro (Schimadzu UV mini, 1240, Kyoto, Japan). A capacidade de seqüestro de radicais livres (%) foi calculada pela Equação (2).

$$AA (\%) = 100 - ((Abs_{amostra} - Abs_{branco}) * 100 / Abs_{controle}) \quad \text{Equação (2)}$$

Em que Abs_{amostra} é a absorbância da amostra (0,3 mL amostra + 2,7 mL de DPPH[•]), Abs_{branco} é a absorbância da amostra sem adição do DPPH[•] (0,3 mL amostra + 2,7 mL metanol) e Abs_{controle} é a absorbância da solução de DPPH[•] (0,3 mL metanol + 2,7 mL DPPH[•]).

Aliquotas de 30 µL das soluções etanólicas foram adicionadas de 3,0 mL de solução etanólica de ABTS⁺. Após 6 min. de reação em ausência de luz, a absorbância foi lida em comprimento de onda 734 nm em espectrofotômetro (Schimadzu UV mini, 1240, Kyoto, Japan). A capacidade de seqüestro de radicais livres (%) foi calculada pela Equação (3):

$$AA (\%) = 100 - ((Abs_{amostra} - Abs_{branco}) * 100 / Abs_{controle}) \quad \text{Equação (3)}$$

Em que $Abs_{amostra}$ é a absorbância da amostra (30 μ L amostra + 3 mL de $ABTS^+$), Abs_{branco} é a absorbância da amostra sem adição do $ABTS^+$ (30 μ L amostra + 3,0 mL etanol) e $Abs_{controle}$ é a absorbância da solução de $ABTS^+$ (30 μ L mL etanol + 3,0 mL $ABTS^+$).

2.10. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em duas ocasiões diferentes, utilizando amostras em triplicatas ($n=6$), sendo os resultados avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3.0. RESULTADOS

3.1. Parâmetros cinéticos de acidificação

O leite em pó reconstituído apresentou pH inicial de $6,44 \pm 0,23$ e $6,39 \pm 0,11$, para o leite fermentado com *E. faecium* SJRP20 e SJRP65, respectivamente, e houve diferença no perfil de acidificação entre as cepas (Figura 1).

A fermentação do leite com *E. faecium* SJRP20 proporcionou maior taxa de acidificação ($V_{m\acute{a}x} = 7,11 \times 10^{-3}$ unidades de pH/min), assim como apresentou menor tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação ($T_{vm\acute{a}x} = 3,57$ h) (Tabela 1). Houve uma redução significativa do pH, no momento da velocidade máxima, para ambas amostras de leite fermentado (Figura 1).

As cepas *E. faecium* SJRP20 e SJRP65, ao realizarem a fermentação do leite na forma de cultura pura, foram consideradas lentas (AYAD et al., 2004), com tempos de fermentação de $9,41 \pm 0,03$ e $13,25 \pm 0,73$ h, respectivamente. Para acelerar o processo fermentativo podem ser utilizadas culturas de bactérias lácticas iniciadoras, tais como *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, pois quando atuam em cooperação, apresentam um papel importante no processo fermentativo e auxiliam na qualidade final dos produtos fermentados. O resultado desta interação é a aceleração do processo

fermentativo e o aumento de compostos voláteis e não voláteis derivados dos processos metabólicos das cepas, que proporcionam características específicas ao produto fermentado (SETTACHAIMONGKON et al., 2014).

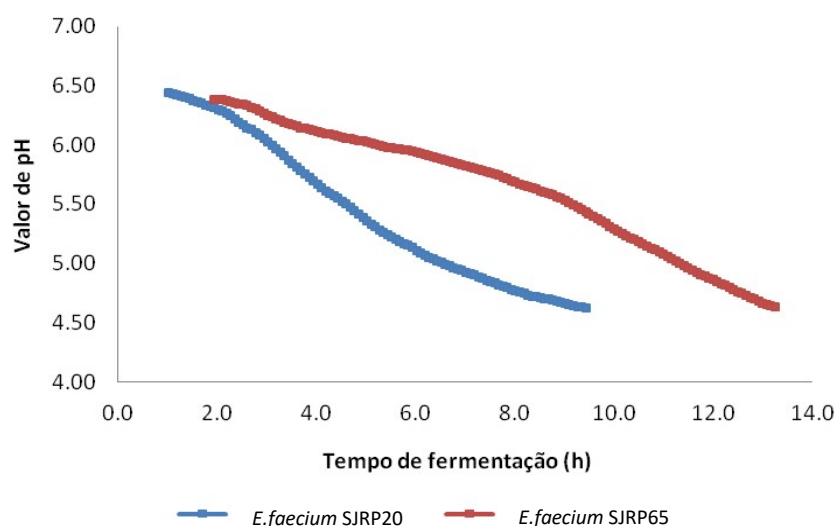


Figura 1: Curvas de acidificação de leite reconstituído a 12%, pasteurizado e fermentado com as culturas *E. faecium* SJRP20 e *E. faecium* SJRP65, até atingir o pH 4,6.

Farinha (2016) avaliou o efeito da composição de *Lactococcus lactis* CECT 4434 (LL) e *Streptococcus thermophilus* TA 040 (ST), isolados e em co-cultura, sobre o perfil tecnológico de soro de leite suplementado com inulina. Os parâmetros cinéticos mostraram que a suplementação de 2% de inulina acelera a fermentação dos produtos, isolados e em co-cultura e que o aumento da concentração de inulina para 4% retarda o processo fermentativo. O tempo de fermentação até atingir o pH final no leite suplementado com 2% de inulina foi de 6,33 h, 6,16 h e 4,43 h para *S. thermophilus*, *L. lactis* e a co-cultura (LL + ST), respectivamente. A taxa de acidificação e a velocidade de crescimento foram maiores com a utilização da co-cultura, em comparação aos mesmos micro-organismos cultivados na forma de cultura pura.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos de acidificação de *Enterococcus faecium* SJRP20 e SJRP65 em leite.

Parâmetros cinéticos	<i>E. faecium</i> SJRP20	<i>E. faecium</i> SJRP65
$V_{\text{máx}}$ (10^{-3} upH/min)	$7,11 \pm 0,94^a$	$4,79 \pm 0,29^b$
$T_{V_{\text{máx}}}$ (h)	$3,57 \pm 0,01^b$	$9,16 \pm 1,75^a$
pH $V_{\text{máx}}$	$5,75 \pm 0,08^a$	$5,48 \pm 0,29^a$
$T_{\text{pH } 5,5}$ (h)	$4,36 \pm 0,28^b$	$9,08 \pm 1,32^a$
$T_{\text{pH } 5,0}$ (h)	$6,14 \pm 0,48^b$	$11,33 \pm 0,78^a$
$T_{\text{pH } 4,6}$ (h)	$9,41 \pm 0,03^b$	$13,25 \pm 0,74^a$
Classificação	Lento	Lento

Resultados expressos por média $\pm$ desvio padrão; ^{a, b} Letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste T Student ($p < 0,05$). $V_{\text{máx}}$ (pH/min) - velocidade máxima atingida; $T_{V_{\text{máx}}}$ - tempo necessário para atingir a velocidade máxima; $T_{\text{pH } 5,5}$ - tempo necessário para atingir pH 5,5; $T_{\text{pH } 5,0}$ - tempo necessário para atingir pH 5,0; $T_{\text{pH } 4,6}$ - tempo necessário para atingir pH 4,6. Classificação da taxa de acidificação conforme Ayad et al. (2004).

3.2. Composição centesimal de leite fermentado com *E. faecium* SJRP20 e SJRP65

Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) na composição centesimal do leite fermentado pelas cepas de *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 (Tabela 2). Este resultado é considerado normal, uma vez que estão sendo avaliados apenas os macronutrientes. O efeito do metabolismo das cepas pode ser melhor observado na produção de ácidos orgânicos, compostos voláteis e substâncias antimicrobianas. Uma vez que foi utilizado o leite desnatado em pó, a fração lipídica foi praticamente zero em ambas as amostras.

Considerando o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), as amostras de leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 atenderam aos padrões estabelecidos para fração protéica (mínimo 2,9%), e em relação ao percentual de lipídeos, foram classificadas como leites fermentados desnatados.

Tabela 2: Composição centesimal¹ de leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e SJRP65.

Componentes (%)	<i>E. faecium</i> SJRP20	<i>E. faecium</i> SJRP65
Umidade	89,85 ± 0,09 ^a	89,82 ± 0,21 ^a
Cinzas	0,92 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,01 ^a
Carboidratos ²	5,73 ± 0,01 ^a	5,37 ± 0,01 ^a
Proteínas	3,50 ± 0,01 ^a	3,91 ± 0,16 ^a
Lipídios	0,00 ± 0,04 ^a	0,00 ± 0,07 ^a
Valor calórico (kcal/g)	36,92 ^a	37,12 ^a

¹ Resultados expressos por média ± desvio padrão; ²Carboidratos totais obtidos por diferença. O valor calórico foi calculado considerando 9 kcal/g para lipídeos totais, 4 kcal / g para proteínas e carboidratos totais. ^a Letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste T de Student ($p < 0,05$).

Houve redução do pH durante a estocagem refrigerada para o leite fermentado por ambas as cepas de *E. faecium* (Tabela 3). Em consonância com esta redução de pH, houve aumento da acidez ao longo da estocagem. De maneira geral a cepa usada não influenciou a pós-acidificação. Ainda, o teor de acidez está de acordo com a legislação vigente, que estabelece valores entre 0,2 e 2% de ácido láctico (BRASIL, 2007).

O decréscimo do pH e o aumento da acidez se devem à persistente atividade metabólica das bactérias lácticas, que degradam os açúcares presentes no leite pela ação da enzima β -galactosidase e produzem ácidos, tais como láctico, acético, cítrico, butírico e fórmico, e acetaldeído como subprodutos metabólicos durante o processo fermentativo, reduzindo o pH (KAILASAPATHY, 2006; RESA et al., 2007).

A capacidade acidificante das bactérias lácticas é de grande importância em produtos lácteos. A rápida redução do pH, pelo acúmulo de ácidos orgânicos, atua, principalmente, no controle da microbiota contaminante. Assim, constituem um fator auxiliar no processo de conservação e segurança dos produtos lácteos. Bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* são homofermentativas, tendo o ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose (FIGUEIREDO, 2014).

Tabela 3: Valor de pH e acidez¹ de leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e SJRP65, durante o armazenamento refrigerado (1, 14 e 28 dias).

Análises	Período (dias)	<i>E. faecium</i> SJRP20	<i>E. faecium</i> SJRP65
Ph	1	4,63 ± 0,01 ^{Aa}	4,81 ± 0,06 ^{Aa}
	14	4,42 ± 0,01 ^{Ba}	4,37 ± 0,03 ^{Bb}
	28	4,33 ± 0,01 ^{Ba}	4,30 ± 0,04 ^{Ca}
Acidez total (% ácido láctico)	1	0,72 ± 0,01 ^{Aa}	0,74 ± 0,30 ^{Aa}
	14	0,92 ± 0,01 ^{Ba}	0,91 ± 0,01 ^{Bb}
	28	1,00 ± 0,01 ^{Ca}	1,00 ± 0,01 ^{Cb}

¹ Resultados expressos por média ± desvio padrão; ^{a, b, c} Letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente pelo teste T de Student ($p < 0,05$) e ^{A, B, C} letras maiúsculas iguais na mesma coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3. Sobrevivência de *E. faecium* sob condições simuladas do TGI

E. faecium SJRP20 e SJRP65 apresentaram alta resistência à simulação das condições do TGI e se mantiveram viáveis até o final do ensaio, em todos os períodos de estocagem refrigerada (Tabela 4).

Em relação ao comportamento bacteriano, *E. faecium* SJRP20 apresentou elevada viabilidade, sem diferença estatística ($p < 0,05$) entre as fases inicial, gástrica e entérica durante 1 e 14 dias de estocagem e houve um ligeiro aumento da viabilidade na fase entérica aos 28 dias de estocagem (Tabela 4). *E. faecium* SJRP65 apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) de viabilidade entre as fases do TGI e durante a estocagem (Tabela 4).

Tabela 4: Viabilidade de *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 (log UFC/mL) sob condições simuladas do TGI durante o armazenamento.

Cepas	Dias	Fases do TGI		
		Inicial	Gástrica	Entérica
<i>E. faecium</i> SJRP20	1	10,08 ± 0,58 ^{Ba}	10,17 ± 0,01 ^{Ba}	10,32 ± 0,71 ^{Ba}
	14	9,62 ± 0,49 ^{Ba}	9,74 ± 0,52 ^{Ba}	10,05 ± 0,46 ^{Ba}
	28	10,30 ± 0,19 ^{Bb}	10,18 ± 0,37 ^{Bb}	10,74 ± 0,28 ^{Ba}
<i>E. faecium</i> SJRP65	1	10,44 ± 0,38 ^{Ac}	10,76 ± 0,14 ^{Ab}	11,58 ± 0,43 ^{Aa}
	14	9,35 ± 0,46 ^{Cc}	10,81 ± 0,54 ^{Aa}	10,12 ± 0,40 ^{Bb}
	28	9,84 ± 0,56 ^{Ab}	10,19 ± 0,60 ^{Bb}	10,51 ± 0,24 ^{Ba}

Inicial, Gástrica e Entérica: indicam a viabilidade de *E. faecium* em leite fermentado na fase inicial do teste (0 min.), na fase gástrica (após 120 min.) e na fase entérica (após 360 min.), respectivamente. ^{a, b, c} letras minúsculas iguais na mesma linha e ^{A, B, C} letras maiúsculas iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

As cepas *E. faecium* SJRP20 e *E. faecium* SJRP65 se mantiveram estável durante a estocagem refrigerada e apresentaram elevada tolerância às condições simuladas do TGI. Este resultado é muito importante, pois quando um micro-organismo probiótico se mostra metabolicamente estável no produto, e ainda, sobrevive à passagem pelo TGI com alta viabilidade, irá apresentar efeitos benéficos quando chegar ao intestino do hospedeiro (ANAL; SINGH, 2007).

Portanto, ambas as cepas apresentaram alto potencial para colonização do intestino, pois se mantiveram viáveis no leite durante a estocagem refrigerada, e resistiram bem às adversidades do sistema digestório, simulado *in vitro*. Tais resultados não são surpreendentes, uma vez que *Enterococcus* spp. sobrevivem bem em condições ácidas e biliosas (TODOROV et al., 2011). Além disso, a contagem de bactérias deve ser minimamente 10⁷ UFC/mL, dependendo da cepa utilizada, para trazer efeitos funcionais positivos (REN et al., 2014).

Barbosa, Borges e Teixeira (2014) avaliaram o comportamento de cepas de *E. faecium* 120, isolados de produtos cárneos, em alheira e leites desnatados, usando digestão rápida e lenta no TGI. Não houve diferença estatística de crescimento celular entre as matrizes no tempo 0, porém, quando submetidos ao pH 2,5 (fase gástrica), houve grande redução da viabilidade dos isolados em leite desnatado (reduziu 4,67 log na digestão rápida e 6,78 log na digestão lenta). Quando foram adicionados os sais biliares (fase entérica), houve redução de apenas 1 log na viabilidade dos isolados em alheira, para os dois tipos de digestão. Os autores afirmam que a resistência do *E. faecium* está associada à matriz do produto, sendo que a viabilidade foi maior na matriz alheira, porque a cepa foi isolada de produtos cárneos e já estava adaptada a esse ambiente.

Sendo assim, a escolha do produto para aplicação de uma cepa probiótica é fundamental para garantir sua estabilidade ao longo do período de estocagem e trazer os efeitos benéficos esperados ao consumidor. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, uma vez que as cepas utilizadas foram isoladas de queijo, e apresentaram elevada viabilidade no leite fermentado.

Grande parte das bactérias, quando ingeridas, não resistem à passagem do TGI, devido à alta acidez estomacal e a concentração dos sais biliares. Em vista disso, a matriz alimentícia ideal para cepas probióticas deve ter três requisitos: ser apropriada para o consumo humano, garantir a viabilidade das cepas durante a vida útil do produto e proteger os probióticos durante a passagem pelo TGI para que eles possam alcançar e transitoriamente colonizar o cólon (CASAROTTI et al., 2015).

Sathyabama et al. (2014) estudaram a viabilidade das cepas probióticas *Staphylococcus succinus* (MAbB4) e *E. faecium* (FIdM3), microencapsuladas e células livres, separadamente, com beterraba, sacarina e chicória, em 2 g/100 mL de alginato. A matriz utilizada influenciou a viabilidade das bactérias; a viabilidade foi constante até 35 dias a 4° C, quando encapsuladas com beterraba sacarina e chicória, no entanto, a viabilidade bacteriana diminuiu nas amostras controle.

3.4. Capacidade de sequestro de radicais livres

De maneira geral, ambas as amostras de leite fermentado com *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 apresentaram maior atividade de sequestro de radicais livres no final da estocagem. A capacidade de sequestro de radicais livres das cepas pelos métodos ABTS⁺ e DPPH[•] está diretamente relacionada com a concentração da amostra e com o período de estocagem do leite fermentado utilizado; com o aumento da concentração e do período de estocagem, a capacidade de sequestro de radicais livres foi mais elevada (Figuras 2 e 3). A capacidade antioxidante pelo método ABTS⁺ variou de $3,17 \pm 0,43\%$ a $58,86 \pm 0,61\%$ e de $3,83 \pm 1,84\%$ a $58,88 \pm 3,92\%$ no leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e *E. faecium* SJRP65, respectivamente. Usando o método DPPH[•], a capacidade de sequestro de radicais livres variou de $0,92 \pm 0,34\%$ a $18,23 \pm 0,89\%$ e de $1,19 \pm 0,10\%$ a $18,97 \pm 1,58\%$ no leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e SJRP65, respectivamente.

De maneira geral, houve diferença estatística na atividade antioxidante durante a estocagem para as duas cepas, usando os dois métodos ABTS⁺ e DPPH[•]. *E. faecium* SJRP20 apresentou maior capacidade de sequestro do radical ABTS⁺ quando comparado à cepa SJRP65, nas concentrações 150 e 200 mg/mL. O leite fermentado por *E. faecium* SJRP65 apresentou maior atividade antioxidante, apenas na concentração de 200 mg/mL do início da estocagem.

Para a capacidade de sequestro do radical DPPH[•], houve diferença estatística entre as cepas apenas nos dias 1 e 14. *E. faecium* SJRP65 apresentou maior capacidade de sequestro do radical DPPH[•] no 14 dia de estocagem, para quase todas as concentrações de produto.

Esta maior capacidade de sequestro dos radicais livres durante a estocagem é semelhante ao obtido por Lima et al. (2014), ao analisarem a atividade antioxidante de Kefir, pelo método ABTS⁺. A atividade antioxidante variou de 16 a 45%, e foi maior final da estocagem; entretanto, a capacidade de sequestro dos radicais livres foi maior em baixas concentrações (6,25 mg/mL).

Estudos com *Enterococcus* spp., incluindo *E. faecium*, têm revelado um grande potencial de aplicação desses micro-organismos, em função da atividade proteolítica, lipolítica, autolítica, bem como, a produção de exopolissacarídeos (EPS). Estas características são interessantes, pois a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas, extra ou intracelular, pode gerar peptídeos e radicais peróxidos com atividade antioxidante (ASPRI et al., 2017).

De acordo com Abdul et al. (2014), *E. faecium* é uma bactéria que apresenta a capacidade de produção de EPS, polímeros que são produzidos como mecanismo de sobrevivência em condições de altas temperaturas e variações de pH. O EPS produzido pela cepa *E. faecium* BDU7, isolada de peixe fermentado (Ngari), demonstrou elevado potencial antioxidante usando o radical DPPH[•], com inibição de 63,8% desse radical na concentração de 8 mg/mL.

O aumento da atividade antioxidante ao longo da estocagem se deve à liberação de enzimas pelos micro-organismos na matriz do alimento durante o armazenamento (LIMA et al., 2014). Além disso, os compostos bioativos produzidos durante a fermentação melhoram a qualidade sensorial e ajudam na conservação do produto (ALMEIDA, 2014).

Várias reações químicas e processos metabólicos ocorrem no organismo humano, levam à liberação de radicais livres, que oxidam lipídeos e proteínas, causam danos no DNA e degeneração de células; esses fatores estão relacionados com doenças inflamatórias, envelhecimento, câncer e outros distúrbios (SHOBHARANI et al., 2012).

Dentre os compostos com propriedades funcionais em alimentos, substâncias com atividade antioxidante têm recebido grande atenção, pois ajudam a proteger o organismo humano contra o estresse oxidativo, evitando e prevenindo uma série de distúrbios crônico-degenerativos (YAHIA, 2010). Desta forma, produtos fermentados com as cepas de *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 apresentam potencial anti-oxidante, considerado benéfico para a saúde.

Os compostos antioxidantes atuam como doadores de hidrogênio ou elétrons e previnem uma série de alterações degenerativas nas células. A toxicidade de compostos antioxidantes sintéticos é considerada motivo de grande preocupação, e assim é crescente a demanda por antioxidantes naturais, seguros e de baixo custo (SHOBHARANI et al., 2012).

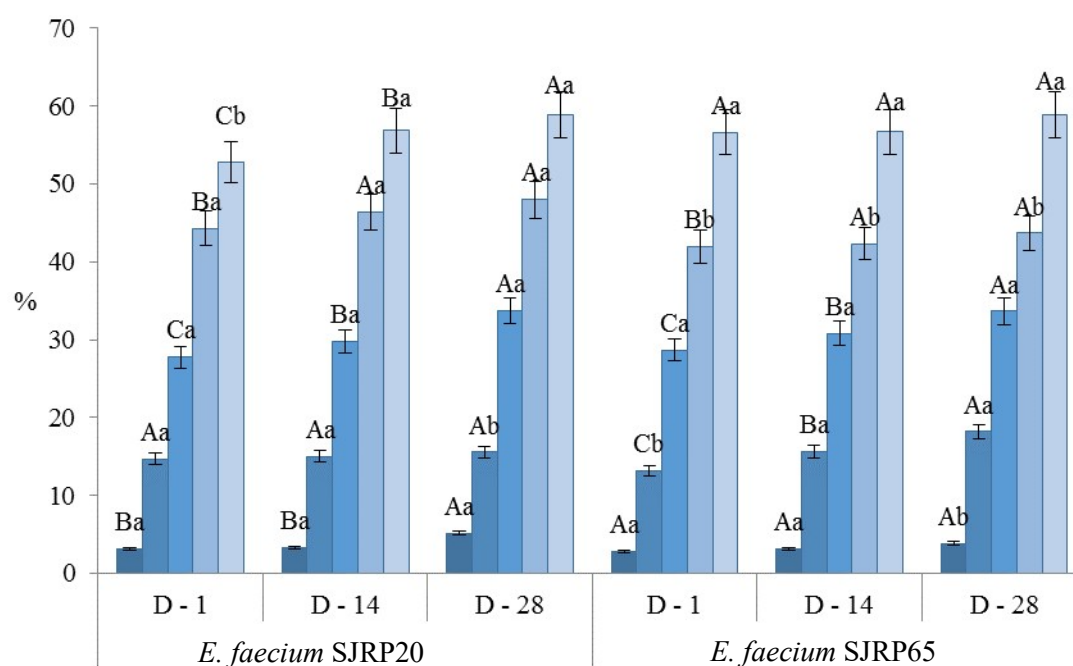


Figura 2: Capacidade de sequestro de radicais livres pelo método ABTS⁺. Concentração de leite fermentado: ■ - 10 mg/mL, ■ - 50 mg/mL, ■ - 100 mg/mL; ■ - 150 mg/mL, ■ - 200 mg/mL. ^{A, B, C} Letras maiúsculas iguais, para a mesma cepa, em diferentes tempos; e ^{a, b, c} letras minúsculas iguais, entre cepas, no mesmo tempo e para a mesma concentração, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

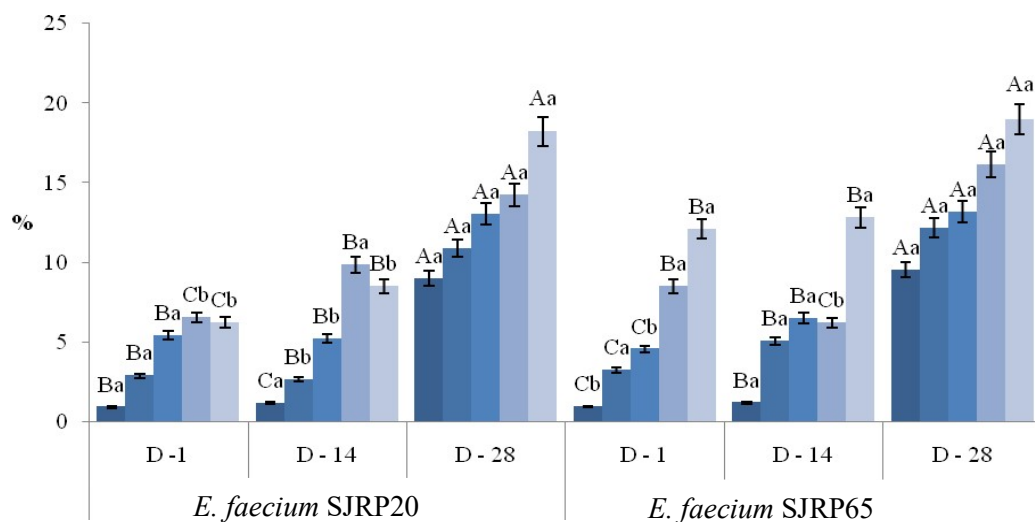


Figura 3: Capacidade de sequestro de radicais livres pelo método DPPH*. Concentração de leite fermentado: ■ - 10 mg/mL, ■ - 50 mg/mL, ■ - 100 mg/mL; ■ - 150 mg/mL, ■ - 200 mg/mL. ^{A, B, C} Letras maiúsculas iguais, para a mesma cepa, em diferentes tempos; e ^{a, b, c} letras minúsculas iguais, entre cepas, no mesmo tempo e para a mesma concentração, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A capacidade de seqüestro de radicais livres obtida pelo método DPPH* apresentou valores consideravelmente menores do que a obtida pelo método ABTS⁺, porém, segue a mesma tendência de resultados; os maiores valores de capacidade de sequestro de radicais livres foram obtidos nas maiores concentrações de leite fermentado, no final do período de estocagem. O DPPH* é um radical lipofílico com uma molécula de nitrogênio estável, que é reduzido pela adição de hidrogênio ou outro elétron (SOLTANI et al., 2011).

Nas amostras de leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e SJRP65, a capacidade de sequestro do radical DPPH* foi semelhante apenas no último dia da estocagem. Porém, a concentração do produto fermentado e a cepa utilizada resultaram em diferença estatística na capacidade antioxidante. Além disso, a capacidade de sequestro dos radicais livres foi maior no final do período de estocagem.

Resultados semelhantes estão descrito na literatura. Vijayalakshmi et al. (2014) produziram leites fermentados contendo as cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*, adicionadas de especiarias, com o intuito de aumentarem a capacidade antioxidante das formulações. O leite fermentado com cardamomo apresentou 79,5% de atividade antioxidante, 1 dia após a fermentação e o iogurte com noz moscada e canela apresentou 69,0% de atividade antioxidante, enquanto o iogurte controle apresentou 57% de atividade antioxidante. A elevada atividade antioxidante estava relacionada à especiaria utilizada.

Shobharani et al. (2012) avaliaram a capacidade de potencialização da atividade antioxidante da alga marinha *Sargassum sp.* por quatro culturas bacterianas (*Pediococcus acidilacti* – LC, *Weissella paramesenteroides* – NW-1a, *P. pentosaceus* – 2NW-1a e *E. faecium* P1-2CB-W1). O fermentado de *E. faecium* P1-2CB-W1 apresentou maior atividade antioxidante pelos métodos DPPH[•] e ABTS⁺. A atividade antioxidante está associada à produção de polifenóis durante a fermentação, que são compostos antioxidantes eficazes por possuírem um grupo hidroxila que auxilia na eliminação de radicais livres.

Pieniz et al. (2015) constataram que cepas de *E. faecium*, isoladas de produtos cárneos e derivados de leite, apresentaram atividade antioxidante e que esse micro-organismo apresenta um potencial de produção de compostos fenólicos durante o processo de fermentação. Os isolados *E. faecium* 3, 8, 12, 32 e C5 apresentaram atividade antioxidante do radical ABTS⁺ variando entre 59 e 92,5%, nos sobrenadantes livre de células; entretanto, os extrato de células apresentaram baixa atividade. Ainda, a capacidade de sequestro do radical DPPH[•] foi consideravelmente menor nos extratos celulares, quando comparado ao ABTS⁺. A ausência de atividade antioxidante em alguns extratos celulares sugerem que a ação é extra celular.

Neste estudo, o aumento da atividade antioxidante no leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 foi proporcional à concentração da amostra e ao tempo de estocagem dos produtos. Este aumento pode estar associado à produção de metabólitos, tais como polifenóis, durante a estocagem. Desta forma, *E. faecium* SJRP20 e SJRP65

podem ser muito úteis para a fermentação de alimentos, com potencial para evitar os processos de deterioração oxidativa dos produtos e danos celulares.

4.0 CONCLUSÃO

O comportamento das cepas potencialmente probióticas de *E. faecium* em leite, nos permite concluir:

- As cepas *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 apresentaram parâmetros cinéticos de acidificação diferentes; *E. faecium* SJRP20 apresentou maior $V_{\text{máx}}$, menor $t_{V_{\text{máx}}}$ e $T_{\text{pH } 4,6}$, embora as cepas tenham sido classificadas como lentas.
- Durante a estocagem refrigerada houve redução do pH e aumento da acidez para o leite fermentado por ambas as cepas, caracterizando a ação metabólica dos micro-organismos durante a estocagem.
- As cepas apresentaram elevada tolerância às condições simuladas do TGI, com elevada viabilidade ao longo do período de estocagem.
- O leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 apresentou elevada capacidade de sequestro de radicais livres. Com o aumento da concentração de produto e do tempo de estocagem, foi maior a capacidade antioxidante.
- *E. faecium* SJRP20 potencialmente probiótico reuniu as melhores características tecnológicas para utilização em produtos lácteos funcionais.

REFERENCIAS

ABDHUL, K.; GANESH, M.; SHANMUGHAPRIYA, S.; KANAGAVEL, M.; ANBARASU, K.; NATARAJASEENIVASAN, K. Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 450–454, 2014.

ALMEIDA, A. R. Compostos bioativos do bagaço de malte: fenólicos, capacidade antioxidante *in vitro* e atividade antibacteriana. 76 p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

AMARAL, D. M. F.; SILVA, L. F.; CASAROTTI, S. N.; NASCIMENTO, L. C. S.; PENNA, A. L. B. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 933-949, 2017.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends Food Science and Technology**, v. 18, p. 240-251, 2007.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** (18th ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2005.

ASPRI, M.; BOZOUDI, D.; TSALTAS, D.; HILL, C.; PAPADEMAS, P. Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. **Food Control**, v. 73, p. 81-90, 2017.

AYAD, E. H. E.; NASHAT, S.; EL-SADEK, N.; METWALY, H.; EL-SODA, M. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**, v. 21, p. 715-725, 2004.

BALAKRISHNAN, G.; AGRAWAL, R. Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 4138-4142, 2014.

BARBOSA, J.; BORGES, S.; TEIXEIRA, P. Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 144-148, 2014.

BAUTISTA-GALLEGO, J.; JIMÉNEZ-DÍAS, R.; ARROYO-LÓPES, F.; FERNANDES, A. G. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International**, v. 50, p. 135-142, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegações>> Acesso em: 02 de mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 46, de 23 de outubro de 2007: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados; Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, anexo à presente Instrução Normativa. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1, p.4, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12 de Dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, DF, 12 Dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, DF, 1999.

CASAROTTI, S. N.; CARNEIRO, B. M.; PENNA, A. L. B. Evaluation of the effect of supplementing fermented milk with quinoa flour on probiotic activity. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 6027-6035, 2014.

CASAROTTI, S. N.; TODOROV, S. D.; PENNA, A. L. B. Effect of different matrices on probiotic resistance to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, p. 595-601, 2015.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London ON, Canada, 2002.

FARINHA, L. R. L. **Efeito da composição de bactérias lácticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina**. 115 f. Tese. (Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo, 2016.

FERNANDEZ, B.; LE LAY, C.; JEAN, J.; FLISS, I. Growth, acid production and bacteriocin production by probiotic candidates under simulated colonic conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 144, p. 877-885, 2013.

FIGUEIREDO, E. L. ***Enterococcus* isolado de queijo Marajó, tipo creme: Caracterização tecnológica, cinética de multiplicação, capacidade de adesão e resistência a sanitizantes**. 82 f. Tese. (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

GILMORE, Y. I.; CLEWELL, D. B.; IKE, Y.; SHANKAR, N. **Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

JANKOVIC, T.; FRECE, J.; ABRAM, M.; GOBIN, I. Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **International Journal of Sanitary Engineering**, v. 6, p. 19-24, 2012.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 1221-1227, 2006.

LIMA, M. S. F.; SILVA, R. A.; SILVA, M. F.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Características microbiológicas e antioxidantes de um novo alimento funcional probiótico: Leite de ovelha fermentado por kefir. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, 2014.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

PIENIZ, S.; ANDREAZZA, A.; OKEKE, B. C.; CAMARGO, F. A. O.; BRANDELLI, A. Antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus* species isolated from meat and dairy products. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 923-931, 2015.

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, p. 1-10, 2014.

RESA, P.; BOLUMAR, T.; ELVIRA, L.; PÉREZ, G.; ESPINOSA, F. N. Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1083-1091, 2007.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHIMITTER, J. M.; BRESSOLIER, P. Na overview of the last advances in probiotic and prebiotic. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 1-16, 2013.

SATHYABAMA, S.; RANJITH, K. M.; BRUNTHA, D. P.; VIJAYABHARATHI, R.; BRINDHA, P.V. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and

its effect on viability in simulated gastric environment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p. 419-425, 2014.

SETTACHAIMONGKON, S.; NOUT, M. J. R.; FERNANDES, E. C.A.; HETTINGA, K. A.; VERVOORT, J. M.; VAN HOOIJDONK, T. C. M.; ZWIETERING, M. H.; SMID, E. J.; VAN VALENBERG, H. J. F. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 29-36, 2014.

SHOBHARANI, P.; HALAMI, P. M.; SACHINDRA, N. M. Potential of marine lactic acid bacteria to ferment *Sargassum sp.* for enhanced anticoagulant and antioxidant properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 96-107, 2012.

SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; MENEZES, C. R.; FRIES, L. M.; MENEZES, M. F. C.; STEFANELLO, F. S. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 66-75, 2014.

SIRÓ, I; KAPOLNA, E.; KAPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food: Product development, marketing and consumer acceptance: A review. **Appetite**, v. 51, p. 456-467, 2008.

SOLTANI, S.; SAADATMAND, S.; KHAVARINEJAD, R.; NEJADSATTARI, T. Antioxidant and antibacterial activities of *Cladophora glomerata* (L.) Kutz in Caspian Sea Coast, Iran. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 7684–7689, 2011.

TODOROV, S. D.; FURTADO, D. N.; SAAD, S. M.; TOME, E.; FRANCO, B. D. G. M. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 971-986, 2011.

VAN BUEREN, A. L.; SARAF, A.; MARTENS, E. C.; DIJKHUIZEN, L. Differential metabolism of exopolysaccharides from probiotic *Lactobacilli* by the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 3973-3983, 2015.

VIJAYALAKSHMI V. I.; STUART C. S.; SHIRANI, G. Consumer acceptability and antioxidant potential of probiotic-yogurt with spices. **Food Science and Technology**, v. 55, p. 255-262, 2014.

WESCHENFELDER, S. Elaboração e avaliação físico-química e microbiológica de produtos lácteos obtidos a base de kefir. 113 f. **Tese**. (Pós-Graduação em Ciência e

Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

YAHIA, E. M. The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. In: de la Rosa, L. A.; Alvarez-Parrilla, E.; González-Aguilar, G. A. **Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability**. Oxford: Wiley-Blackwell, p. 3-51, 2010.

CONCLUSÃO GERAL

Dentre as cepas dos *Lactobacillus* e *Enterococcus* isolados de queijo Muçarela de Búfala, utilizadas neste estudo, *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 foram considerados potencialmente probióticos e seguros pelos testes realizados.

O leite fermentado por *E. faecium* SJRP20 e SJRP65 apresentou elevada tolerância às condições simuladas do TGI, com elevada viabilidade ao longo do período de estocagem e elevada capacidade de sequestro de radicais livres.

E. faecium SJRP20 reuniu as melhores características tecnológicas para aplicação em produtos lácteos fermentados; entretanto, *E. faecium* SJRP65 foi considerado mais seguro e apresentou características tecnológicas satisfatórias.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura do autor