

Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha

Identification and resistance to biological barriers of lactic bacteria isolated from ovine milk and cheese

Autores | Authors

✉ Stela Maris Meister MEIRA

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada
Av. Bento Gonçalves, 9500
CEP: 91501-970
Porto Alegre/RS - Brasil
e-mail: stelamm@yahoo.com.br

Virginia Etges HELFER Renata Voltolini VELHO

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
e-mail: vikzinha@hotmail.com
re.voltolini@hotmail.com

Luis Fernando da Costa Medina

Universidade do Vale do Rio dos Sinos (Unisinos)
Laboratório de Biologia Molecular
e-mail: lfmedina@unisinos.br

Adriano Brandelli

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
e-mail: abrand@ufrgs.br

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Resumo

Bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha foram identificadas e avaliadas *in vitro* quanto a características probióticas – tolerância a pH ácido, sais biliares e fenol. Três linhagens foram identificadas como *Lactobacillus plantarum* e, para a linhagem LCN 27, não foi possível definir a espécie. Os isolados mostraram boa viabilidade em pH 3 e 4, porém nenhum sobreviveu em pH 2 (valores abaixo do limite de detecção), após 4 h de incubação. Os lactobacilos foram capazes de resistir às concentrações de 0,1 e 0,3% de sais biliares e a concentração de 0,4% de fenol não afetou a viabilidade após 4 h. A linhagem LCN 56 foi estudada em sucos gástrico e intestinal simulados, nos quais a presença de pancreatina e sais biliares não afetaram significativamente a viabilidade bacteriana; porém, em pepsina e pH 2,0, a linhagem resistiu apenas por 30 min, sendo que a presença de leite desnatado incrementou a viabilidade durante o tempo de avaliação de 4 h. Esses resultados estimulam a continuidade do estudo desses isolados, visando aplicações em alimentos funcionais probióticos.

Palavras-chave: Bactérias lácticas; Probióticos; Barreiras biológicas; Leite de ovelha.

Summary

Lactic bacteria isolated from ovine milk and cheese were identified and evaluated *in vitro* for probiotic characteristics – acid, bile salts and phenol tolerance. Three strains were identified as *Lactobacillus plantarum* and LCN 27 was not definitively identified. The isolates showed good viability at pH 4 and pH 3, but none of them survived at pH 2 (values below detection limit) after 4 hours of incubation. The lactobacilli were able to resist 0.1 and 0.3% of bile salts and 0.4% of phenol did not affect the viability after 4 h. The strain LCN 56 was studied in simulated gastric and intestinal juices, in which the presence of pancreatin and bile salts did not affect bacterial viability, but the strain resists only for 30 min in pepsin and pH 2.0. The addition of skimmed milk enhanced viability during 4 h of evaluation. These results instigate the continuity of studies of these isolates for food probiotic application.

Key words: Lactic bacteria; Probiotics; Biological barriers; Ovine milk.

Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha

MEIRA, S. M. M. et al.

1 Introdução

Bactérias ácido-lácticas (BAL) estão presentes em todos os alimentos fermentados, possuem histórico de uso seguro e constituem parte da microbiota intestinal de humanos e animais. Recentemente, propriedades de promoção à saúde têm sido atribuídas a diversas linhagens de BAL e, assim, aplicações probióticas são majoritariamente desenvolvidas com este grupo de bactérias, especialmente com linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (DEL PIANO et al., 2006).

Probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do indivíduo”, de acordo com a FAO/WHO (2001), e passaram a ser um tópico importante na pesquisa de BAL ao longo da década de 2010 (BAO et al., 2010).

Entre os efeitos benéficos de produtos contendo organismos probióticos – bem documentados e estabelecidos cientificamente – estão o balanço da microbiota intestinal, o alívio da intolerância à lactose e a prevenção e a redução de sintomas de diarreia associados a antibióticos e rotavírus. Há outros efeitos benéficos com caráter potencial que requerem mais estudos para substanciar alegações, incluindo propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, estimulação do sistema imune, redução do risco de doenças atópicas e alergias, efeito hipocolesterolêmico e redução do risco associado à mutagenicidade e à carcinogenicidade (FAO/WHO, 2001; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; PARVEZ et al., 2006; VASILJEVIC e SHAH, 2008; RANADHEERA et al., 2010). Todavia, os efeitos benéficos conferidos pelas bactérias probióticas são muito específicos de cada linhagem (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

A funcionalidade dos probióticos depende da sua habilidade em sobreviver e colonizar o trato gastrointestinal; portanto, a resistência das células a barreiras biológicas – acidez estomacal, bile e enzimas proteolíticas – é um pré-requisito (DEL PIANO et al., 2006; PAN et al., 2009). Adicionalmente, tolerância ao fenol é desejável, já que este composto pode ser formado no intestino pela deaminação de aminoácidos aromáticos provenientes da dieta ou de proteínas endógenas (PINTO et al., 2006). Estas propriedades podem ser determinadas por avaliações *in vitro*, as quais são geralmente empregadas na seleção de potenciais bactérias probióticas (SCHILLINGER et al., 2005).

O isolamento e a caracterização de novas linhagens probióticas de nichos não investigados podem ser vantajosos por revelar características taxonômicas e para obtenção de linhagens com particularidades funcionais interessantes (ORTU et al., 2007).

O leite e o queijo de ovelha representam fontes de bactérias lácticas, mas ainda pouco exploradas no Brasil. A atividade de produção de leite de ovelha no país e sua industrialização para produção de queijos é recente e restrita à região Metropolitana e à Serra Gaúcha (NESPOLO, 2009). Por essa razão, o objetivo deste estudo foi identificar e avaliar *in vitro* possíveis propriedades probióticas de quatro BAL isoladas de leite e queijo de ovelha da região sul do Brasil.

2 Material e métodos

2.1 Linhagens bacterianas

As bactérias lácticas foram isoladas por Nespolo (2009) de leite ovino cru e queijo produzido sem adição de cultura iniciadora, obtidos de um laticínio localizado em Viamão-RS, Brasil. Os isolados foram mantidos como culturas estoque congeladas a $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo Man Rogosa Sharp (MRS) contendo 20% (v/v) de glicerol, sendo propagadas duas vezes antes do uso.

2.2 Identificação bioquímica e molecular

Os perfis de fermentação de carboidratos das bactérias lácticas foram avaliados utilizando kits API 50 CHL (BioMérieux), conforme instruções do fabricante, para identificação bioquímica.

A identificação molecular foi realizada por meio da obtenção e do sequenciamento do rDNA 16S. O DNA total foi extraído pelo método fenol/clorofórmio e as Reações em Cadeia da Polimerase foram realizadas empregando os primers universais 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), conforme Lisboa et al. (2006). Os amplicons foram purificados e enviados para ATCGene (Porto Alegre, Brasil), onde foram sequenciados. O algoritmo BLAST foi utilizado para busca por sequências homólogas no GenBank e, para alinhamento destas sequências, utilizou-se o software CLUSTAL W versão 1.8.

2.3 Tolerância a condições ácidas e a sais biliares

A resistência dos isolados sob diferentes condições ácidas foi avaliada em caldo MRS (pH 6,5) ajustado a pH 2, 3 e 4 com HCl concentrado.

A avaliação da tolerância bacteriana a sais biliares foi realizada em caldo MRS suplementado com uma mistura de colato de sódio e deoxicolato de sódio na proporção de 1:1, atingindo concentrações finais de 0,1, 0,3, 0,5 e 1% (m/v).

Culturas de 24 h com concentração final entre 10^6 e 10^7 UFC mL⁻¹ foram inoculadas nos tratamentos e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h, juntamente com controles em pH 6,5 e sem adição de sais biliares. A sobrevivência sob

Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha

MEIRA, S. M. M. et al.

diferentes condições foi avaliada por contagem em placas com limite de detecção de $1,7 \log \text{UFC mL}^{-1}$. Ambas as avaliações seguiram o protocolo de Perelmuter et al. (2008).

2.4 Tolerância ao fenol

A habilidade de crescimento na presença de fenol foi realizada utilizando caldo MRS adicionado de 0,4% de fenol, conforme Pinto et al. (2006). A enumeração das bactérias foi realizada no tempo inicial e após 4 h de incubação a 37°C .

2.5 Tolerância ao trânsito gastrointestinal superior

Uma das linhagens foi selecionada para a avaliação de tolerância ao trânsito gastrointestinal superior, conforme Huang e Adams (2004). As células bacterianas com 24 h de incubação foram separadas por centrifugação (12000 g por 5 min a 4°C), lavadas duas vezes com tampão fosfato e ressuspendidas em solução salina a 0,5%. Uma alíquota de 0,2 mL da suspensão celular foi misturada a 0,3 mL de solução salina e 1,0 mL de sucos gástrico ou intestinal simulados, e incubada a 37°C . A contagem de células viáveis foi realizada no tempo inicial e em 15, 30, 60, 120, 180 e 240 min para tolerância ao trânsito gástrico e, após 240 min, para a determinação da tolerância ao trânsito no intestino delgado.

O suco gástrico simulado consistiu em pepsina (3 mg mL^{-1}) e pH 2,5 ou 2,0, enquanto, o suco intestinal simulado foi composto por pancreatina (1 mg mL^{-1}) e pH 8,0, com ou sem adição de 0,5% de sais biliares.

O efeito da presença de um alimento na sobrevivência durante o trânsito gástrico em pH 2,0 foi avaliado da mesma forma, porém, substituindo a solução salina por 0,3 mL de leite desnatado reconstituído a 10% (m/v).

2.6 Análise estatística

Os dados experimentais foram expressos como média \pm desvio padrão e avaliados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 0,05 utilizando o programa SAS (versão 9.1).

3 Resultados e discussão

3.1 Identificação bioquímica e molecular

As bactérias lácticas foram identificadas como espécies do gênero *Lactobacillus*, conforme a Tabela 1. A identificação bioquímica não foi conclusiva para as linhagens LCN 27 e 56, porém apresentou correlação com a identificação molecular para as demais linhagens. Pode-se afirmar que as linhagens LCN 17, 28 e 56 pertencem à espécie *L. plantarum*, enquanto a linhagem LCN 27 ainda necessita de confirmação da espécie.

3.2 Tolerância a condições ácidas e a sais biliares

A sobrevivência e a colonização no trato digestivo são consideradas aspectos críticos para o aumento da funcionalidade e a expressão de funções fisiológicas de promoção à saúde por microrganismos probióticos.

Primeiramente, para sobreviver no intestino, os organismos devem ser tolerantes ao baixo pH do estômago, que geralmente varia de 2,5 a 3,5, mas pode ser tão baixo quanto 1,5 durante o jejum ou tão alto quanto 4,5, após uma refeição. A natureza do alimento afeta o tempo de trânsito através do estômago, mas normalmente o alimento permanece por 2 a 4 h (HUANG e ADAMS, 2004).

Os resultados da viabilidade das bactérias lácticas quando expostas a diferentes condições ácidas após 4 h de incubação estão demonstrados na Figura 1. Não houve diferença significativa entre os controles em pH 6,5 – tempo inicial (T0) e após 4 h (T4) – e os tratamentos com pH 4, em vista de que as linhagens de *Lactobacillus* acidificam normalmente o meio de cultura a este valor. Em pH 3, as linhagens foram resistentes após 4 h, porém observou-se que a contagem bacteriana esteve abaixo do limite de detecção em pH 2 após este período e mesmo após 30 min.

Em decorrência disso, novo tratamento foi realizado com caldo MRS acidificado para pH 2,5. Nesta condição, para as linhagens LCN 17 e 28, foi possível detectar viabilidade apenas após 30 min, enquanto que as demais linhagens resistiram após 1 h (contagem entre 2,3 e $2,9 \log_{10} \text{UFC mL}^{-1}$).

Tabela 1. Bactérias lácticas de leite e queijo ovino e respectiva identificação bioquímica e molecular.

Linhagens	Origem	Identificação por API 50 CHL	Identificação por 16S rDNA
LCN 17	Leite	<i>Lactobacillus plantarum</i> (99,9%)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (99%)
LCN 27	Leite	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> (por aproximação)	<i>Lactobacillus paracasei</i> (97-98%) <i>Lactobacillus casei</i> (97-98%)
LCN 28	Leite	<i>Lactobacillus plantarum</i> (99,9%)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (99%)
LCN 56	Queijo	<i>Lactobacillus brevis</i> (75,1%) <i>Lactobacillus plantarum</i> (20,1%)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (98-99%)

Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha

MEIRA, S. M. M. et al.

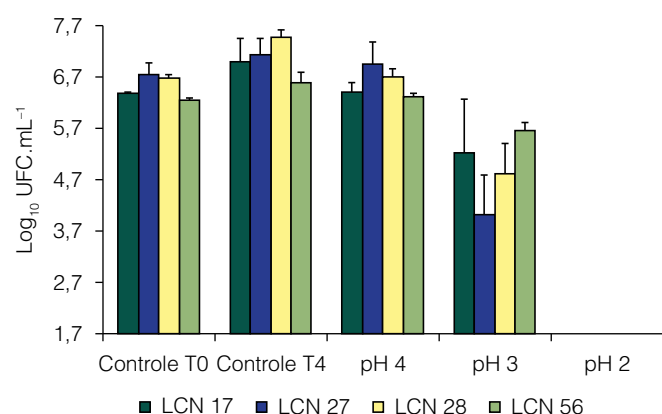


Figura 1. Tolerância das bactérias lácticas a diferentes condições ácidas. Os resultados constituem a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão, com limite de detecção de $1,7 \log_{10} \text{UFC mL}^{-1}$.

Estes resultados estão de acordo com outros estudos, nos quais linhagens de *Lactobacillus* foram capazes de reter sua viabilidade a valores de pH entre 2,5 e 4,0, mas apresentaram perda de viabilidade a valores de pH inferiores (JACOBSEN et al., 1999; MARAGKOUidakis et al., 2006; PERELMUTER et al., 2009; HWANHLEM et al., 2010).

Outra barreira que as bactérias probióticas devem transpor é a bile presente no intestino delgado, no qual o tempo de trânsito do alimento é geralmente entre 1 e 4 h. Os sais biliares são os principais componentes da bile, capazes de desorganizar a estrutura de membranas celulares e, dessa forma, mostram-se tóxicos às células vivas (BEGLEY et al., 2006)

A Figura 2 demonstra que as bactérias foram capazes de tolerar apenas baixas concentrações dos sais biliares (0,1 e 0,3%) e apenas a linhagem LCN 56 apresentou concentração celular acima do limite de detecção quando exposta a 0,5% de sais biliares. Para a concentração de 1% da mistura de sais, nenhuma das linhagens alcançou viabilidade acima do limite de detecção após 4 h (resultado não mostrado). Ao avaliar os tratamentos e os controles T_4 (sem adição de sais após 4 h) em comparação aos controles no tempo inicial (T_0 , sem adição de sais), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) apenas para LCN 17, 28 e 56, quando expostas a 0,1% de sais.

Considerando que a concentração de sais biliares de 0,15 a 0,3% tem sido recomendada para a avaliação *in vitro* da passagem pelo intestino delgado (HUANG e ADAMS, 2004), admite-se que as bactérias isoladas do leite e queijo de ovelha apresentam recuperação potencial nessas condições.

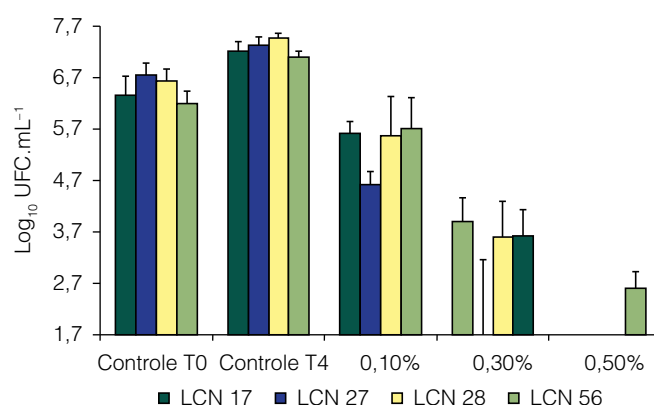


Figura 2. Tolerância a sais biliares das bactérias lácticas. Os resultados constituem a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Limite de detecção $1,7 \log_{10} \text{UFC mL}^{-1}$.

3.3 Tolerância ao fenol

A resistência ao fenol foi testada como um indicador adicional da sobrevivência às condições intestinais. Os lactobacilos mostraram grau de sensibilidade similar frente a este composto (Tabela 2), sendo que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos inicial (T_0) e após 4 h (T_4) para todas as linhagens.

O fenol é um produto catabólico de aminoácidos aromáticos e tem atividade bacteriostática (PINTO et al., 2006). A concentração de 0,4% é elevada e as bactérias lácticas deste estudo, por terem demonstrado tolerância a este composto, podem ter mais chances de sobreviver no intestino.

3.4 Tolerância ao trânsito gastrointestinal superior

A linhagem LCN 56, que apresentou a melhor resistência aos sais biliares, foi avaliada com maior concentração celular inicial e empregando-se barreiras enzimáticas e pH-dependentes pela exposição aos sucos gástrico e intestinal simulados.

A contagem de células viáveis não diferiu significativamente do tempo inicial após a incubação por 240 min em pancreatina pH 8,0 e houve redução de aproximadamente um ciclo logarítmico na presença de 0,5% de sais biliares (Tabela 3). Em contrapartida, a Figura 3 demonstra que, em suco gástrico simulado em pH 2,5, houve redução gradual até 180 min. Porém, a detecção de viabilidade foi possível após 30 min, quando da exposição em pH 2,0.

Embora o pH possa ser usado como medida adequada direta para seleção de linhagens probióticas, ressalta-se que muitos probióticos são consumidos em produtos alimentícios. Há relatos de que a presença de alimentos e ingredientes alimentares melhora a

Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha

MEIRA, S. M. M. et al.

Tabela 2. Tolerância das bactérias lácticas a 0,4% de fenol.

Linagem	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	
	T ₀	T ₄
LCN 17	6,40 ± 0,08	6,41 ± 0,01
LCN 27	6,62 ± 0,20	7,02 ± 0,07
LCN 28	6,88 ± 0,02	6,76 ± 0,14
LCN 56	6,43 ± 0,10	6,37 ± 0,11

Tabela 3. Efeito do suco intestinal sobre a viabilidade da linhagem LCN 56 durante 240 min.

	Tempo inicial	240 min
Pancreatina pH 8,0	8,44 ± 0,2	8,17 ± 0,4
Pancreatina pH 8,0 + 0,5% sais biliares	8,37 ± 0,4	7,61 ± 0,6

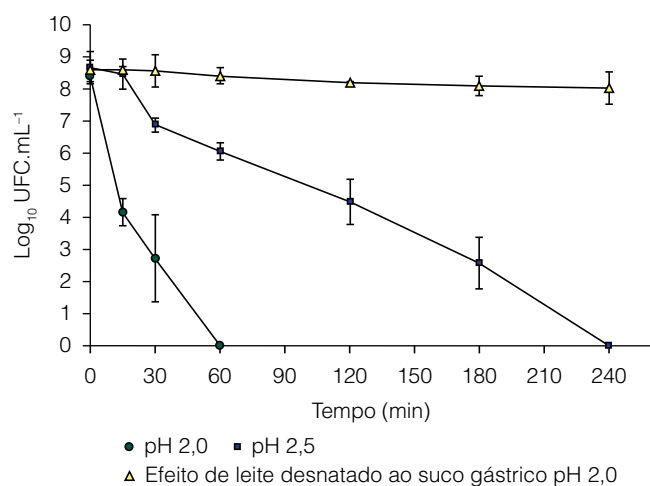


Figura 3. Contagem de células viáveis de LCN 56 em suco gástrico simulado.

viabilidade dos microrganismos durante o trânsito gástrico (FERNÁNDEZ et al., 2003; HUANG e ADAMS, 2004; SHILLINGER et al., 2005; PINTO et al., 2006; GUGLIELMOTTI et al., 2007). Neste sentido, a ação protetora dos componentes do leite foi evidenciada na Figura 3 e a viabilidade de LCN 56 permaneceu acima de 10⁸ UFC mL⁻¹ durante o tempo avaliado (240 min), possivelmente pelo aumento do pH (acima de 5) provocado pela adição do leite.

No estudo de Pinto et al. (2006), entre as variáveis que afetam a sobrevivência bacteriana durante um modelo de passagem pelo estômago, o veículo alimento foi considerado importante e adotado na avaliação *in vitro*. Shillinger et al. (2005) reforçam que o estudo da tolerância a condições gástricas faz mais sentido com as linhagens já incorporadas ao produto final. Além disso, a revisão de Ranadheera et al. (2010) estabelece que o alimento influencia o crescimento, a viabilidade e a sobrevivência, a tolerância ao ácido e à bile e a diferenciada funcionalidade dos probióticos, o que

determina sua eficácia no trato gastrointestinal. Sugere, ainda, que a investigação cuidadosa da interação entre probióticos e componentes alimentares deve ser considerada no desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos.

4 Conclusões

As quatro bactérias lácticas isoladas de leite e queijo ovino apresentaram tolerância a pH 3 e 4, a 0,3% de sais biliares e a 0,4% de fenol, sendo que o isolado LCN 56 apresentou considerável resistência a sais biliares. Apesar de as linhagens apresentarem pouca resistência quando expostas ao pH 2,0, componentes lácteos podem propiciar uma matriz protetora à sobrevivência nesta condição. Assim, as linhagens deste estudo não podem ser excluídas de aplicações probióticas e serão objeto de estudos posteriores.

Agradecimentos

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Referências

- BAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S.; DONG, X.; WANG, Y.; ZHANG, H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, Guildford, v. 21, p. 695-701, 2010.
- BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1729-1738, 2006.
- DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, Roma, v. 38, n. 2, p. S248-S255, 2006.
- FERNÁNDEZ, M. F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 449-455, 2003.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk With Live Lactic Acid Bacteria**. Córdoba, 2001.
- GUGLIELMOTTI, D. M.; MARCÓ, M. B.; GOLOWCZYC, M.; REINHEIMER, J. A.; QUIBERONI, L. Q. Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, p. 916-925, 2007.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy

Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelhaMEIRA, S. M. M. *et al.*

- propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, p. 253- 260, 2004.
- HWANHLEM, N.; WATTHANASAKPHUBAN, N.; RIEBROY, S.; BENJAKUL, S.; H-KITTIKUN, A.; MANEERAT, S. Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 45, p. 594-601, 2010.
- JACOBSEN, C.; ROSENFELDT, N.; HAYFORD, A.; MØLLER, P.; MICHAELSEN, K.; PÆRREGAARD, A.; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M. Screening of probiotic activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 4949-4956, 1999.
- LISBOA, M. P.; BONATTO, D.; BIZANI, D.; HENRIQUES, J. A. P.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin- like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **International Microbiology**, Barcelona, v. 9, p. 111-118, 2006.
- MARAGKOUidakis, P. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, p. 189-199, 2006.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.
- NESPOLO, C. R. **Características Microbiológicas e Físico-Químicas Durante o Processamento de Queijo de Leite de Ovelha**. 2009. 200 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente)–Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ORTU, S.; FELIS, G.E.; MARZOTTO, M.; DERIU, A.; MOLICOTTI, P.; SECHI, L.A.; DELLAGLIO, F.; ZANETTI, S. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, p.1312–1320, 2007.
- PAN, X.; CHEN, F.; WUA, T; TANG, H.; ZHAO, Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 598–602, 2009.
- PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KANG, S. Ah; KIM, H.-Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 1171–1185, 2006.
- PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 1718-1725, 2008.
- PINTO, M.G.V.; FRANZ, C.M.A.P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, p. 205-214, 2006.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, Barking, v. 43, p. 1-7, 2010.
- SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. H. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, p. 1289-1297, 2005.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics — From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, p. 714-728, 2008.