

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE LEITE E QUEIJOS DE OVELHA**

Stela Maris Meister Meira

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE LEITE E QUEIJOS DE OVELHA**

Stela Maris Meister Meira
(Química Industrial de Alimentos – UNIJUÍ/UERGS)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Adriano Brandelli

Porto Alegre

2011

M824e Meira, Stela Maris Meister
Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijos de ovelha. / Stela Maris Meister Meira. -- Porto Alegre, 2011.

107f. : il.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR-RS, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Bibliografia

1. Química dos alimentos 2. Alimentos funcionais - probióticos
3. Bactérias ácido lácteas 4. Peptídeos I. Título. II. Brandelli, Adriano (Orient.).

CDU 664:577

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Adriano Brandelli, pela oportunidade de realização deste trabalho e confiança depositada.

À Profa. Silvana Carro, pela carinhosa receptividade e imensa ajuda durante a *pasantía* no Uruguai.

Ao Márcio Aguinsky, Tércio Michelon e Alessandro Garnegier pela disponibilização de amostras e auxílio com informações para a pesquisa.

A todo o pessoal do laboratório 218, pelo carinho, ajuda, prestatividade, troca de experiências, companheirismo e alegria, determinantes durante esses dois anos e que sempre vou lembrar com muita saudade. Em especial, agradeço a minha bolsista de iniciação científica, Virgínia Helfer, por ser tão solícita, querida e dedicada. À Fernanda Leães, pelo incentivo. À Cássia Nespolo, pelas bactérias lácticas LCN e por ser sempre tão atenciosa às minhas solicitações. À Simone Pieniz, pela contribuição inicial com os protocolos de atividade antioxidante. À Renata Voltolini, pela ajuda na identificação dos lactobacilos. À Ana Paula Corrêa, pelas risadas, ajuda com géis e parceria de trabalho. À Fernanda Lopes, pela amizade, apoio, dinamismo e correções de escritas. Ao Daniel Daroit, pelas discussões de resultados, tomada de decisões a respeito dos “novos” protocolos e por transmitir tranquilidade.

Aos integrantes dos laboratórios de responsabilidade dos professores Plinho e Eduardo e ao Rober, pelo auxílio com materiais e equipamentos.

Ao Luis Fernando, pela contribuição no início do trabalho.

Ao Jéferson Segalin, pela disponibilidade e grande ajuda na tentativa de identificação dos peptídeos.

À CAPES, pelo indispensável apoio financeiro.

Aos amigos, pelo carinho, em especial à Carla Matte, Patrícia Malheiros e Manuela Klein.

Aos meus tios, Toninho e Thaís, pela acolhida fraternal durante os primeiros meses do mestrado.

Aos meus pais, Mario e Maria Inês, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, pela presença nos momentos mais importantes, pelo amor, amparo e incentivo.

A toda minha família, pela força e importância em minha vida.

Ao meu amor, noivo, namorado e melhor amigo, Marcos, por estar sempre ao meu lado, pela compreensão, por me ouvir, acalmar, ajudar, apoiar e por me fazer feliz.

À Deus, por me abençoar e por fazer com que eu siga o meu caminho sempre com fé, crença e esperança.

POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE LEITE E QUEIJOS DE OVELHA¹

Autor: Stela Maris Meister Meira

Orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

Bactérias lácticas probióticas e peptídeos bioativos são importantes componentes de alimentos funcionais. Neste trabalho, bactérias lácticas isoladas de leite ovino cru e de queijo de ovelha foram identificadas por 16S rDNA como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e avaliadas quanto ao potencial probiótico. Todas as linhagens demonstraram adequada tolerância ao pH 3,0 e a sais biliares em concentrações de até 0,5%. A linhagem LCN 56, quando exposta ao tratamento de pH 2,0 e pepsina, adicionado de leite desnatado, não teve sua viabilidade reduzida durante 4 horas em função do efeito protetor do alimento. Adicionalmente, propriedades de autoagregação e hidrofobicidade, atividades antioxidante e antibacteriana, e ainda, produção da enzima β -galactosidase foram avaliadas em 12 *Lactobacillus* e em 2 linhagens de referência. Estas características foram bastante variáveis entre as linhagens, mesmo entre aquelas pertencentes à mesma espécie. Nenhuma das bactérias exibiu todas as propriedades desejáveis, porém dois isolados apresentaram conjuntamente o maior número de atributos funcionais, *L. brevis* SM-B e *L. plantarum* SM-I. Com relação aos peptídeos com atividade biológica, extratos aquosos de queijos de ovelha maturados foram avaliados e apresentaram propriedades antioxidantes de sequestro do cátion radical 2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico) (ABTS) e atividade quelante de ferro bastante variáveis, enquanto as análises de poder redutor e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) apresentaram similaridade para a maioria dos queijos. A atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina foi elevada, em contraste à atividade antibacteriana que não foi encontrada em nenhuma das amostras. Os resultados encontrados podem ser atribuídos a possíveis peptídeos bioativos presentes. O perfil proteico do extrato aquoso correspondente ao queijo Roquefort foi visualizado por SDS-PAGE, por ter sido a amostra com a melhor intensidade das bioatividades. Portanto, os resultados refletem a potencial funcionalidade dos produtos lácteos ovinos.

Palavras-chave: bactérias lácticas, probióticos, peptídeos, queijo de ovelha.

¹Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Área de concentração Química e Bioquímica de Alimentos), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, fevereiro de 2011.

PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC BACTERIA AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EWE'S MILK AND CHEESES¹

Author: Stela Maris Meister Meira

Adviser: Adriano Brandelli

ABSTRACT

Probiotic lactic bacteria and bioactive peptides are important components of functional foods. In this work, lactic bacteria isolated from raw ovine milk and cheese were identified by 16S rDNA as belonging to *Lactobacillus* genus and evaluated for probiotic potential. All strains demonstrated appropriate tolerance to pH 3.0 and bile salts until 0.5% of concentration. The strain LCN 56, when exposed to the treatment of pH 2.0 and pepsin added with skim milk, did not reduce viability during 4 hours due to protective effect of the food. Additionally, autoaggregation and hydrophobicity properties, antioxidant and antibacterial activities and also β -galactosidase production were evaluated for 12 lactobacilli and for 2 reference strains. These characteristics were quite variable among strains, even among strains belonging to the same species. None of them exhibited all the desired properties, but two strains showed the greatest number of functional attributes together, *L. brevis* SM-B and *L. plantarum* SM-I. In relation to peptides with biological activity, water soluble extracts of ewe's ripened cheeses were evaluated and presented antioxidant properties of scavenging of the cation radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and iron chelating activity quite variable, whereas power reduction and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) analysis presented similarity for the major of the cheeses. Inhibition of the angiotensin-converting enzyme (ACE) was elevated, in contrast to antibacterial activity that was not found for any sample. The results found can be attributed for the possible presence of bioactive peptides. The protein pattern of water soluble extract corresponding to Roquefort was visualized by SDS-PAGE for being the sample that displayed the best bioactivities. Therefore, the results reflect potential functionality of dairy sheep.

Key words: lactic bacteria, probiotics, peptides, ewe's cheese.

¹Master of Science dissertation in Food Science and Technology, (Area of Food Chemistry and Biochemistry), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, February, 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Bactérias Ácido Lácticas	13
2.2 Probióticos	14
2.2.1 Tolerância ao pH ácido	19
2.2.2 Tolerância a sais biliares	20
2.2.3 Capacidade de adesão	21
2.2.4 Atividade Antimicrobiana	23
2.2.5 Atividade Antioxidante	25
2.2.6 Atividade de β -galactosidase	28
2.3 Leite de Ovelha	30
2.4 Compostos Lácteos Bioativos	31
2.4.1 Peptídeos Antimicrobianos	34
2.4.2 Peptídeos Antioxidantes	36
2.4.3 Peptídeos Anti-hipertensivos	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1 Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha	43
3.2 Probiotic potential of <i>Lactobacillus</i> spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese	55
3.3 Bioactivities in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay.....	77
4 CONCLUSÕES	96
5 PERSPECTIVAS	97
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas linhagens probióticas com aplicações comerciais (Adaptada de VASILJEVIC & SHAH, 2008).	15
---	----

Artigo referente ao item 3.1

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

Tabela 1 – Bactérias lácticas de leite e queijo ovino e identificação bioquímica e molecular.	48
Tabela 2 – Tolerância das bactérias lácticas a 0,4% de fenol.	50
Tabela 3 – Efeito do suco intestinal sobre a viabilidade da linhagem LCN 56 durante 240 min	51

Artigo referente ao item 3.2

Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese

Table 1. Resistance to biological barriers for isolates and reference strains (mean \pm standard deviation).	71
Table 2. <i>In vitro</i> adhesion properties of <i>Lactobacillus</i> strains.	73
Table 3. Antagonistic activity by colonies of lactocilli.	74

Artigo referente ao item 3.3

Bioactivities in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay

Table 1. Main characteristics of the ovine cheese varieties.	92
Table 2. Antioxidant properties of WSE obtained from different cheeses.	93

LISTA DE FIGURAS

Artigo referente ao item 3.1

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

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 $1,7 \log_{10}\text{UFC mL}^{-1}$ 49

Figura 2 – Tolerância a sais biliares das bactérias lácticas. Os resultados constituem a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Limite de detecção $1,7 \log_{10}\text{UFC mL}^{-1}$ 50

Figura 3 – Contagem de células viáveis de LCN 56 em suco gástrico simulado ● pH 2,0; ■ pH 2,5. ▲ Efeito de leite desnatado ao suco gástrico pH 2,0. 52

Artigo referente ao item 3.2

Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese

Fig. 1. β -gal activity of lactobacilli isolated from ovine milk cheese and reference strains. Values are the means of three independent determinations \pm s.e.m. 75

Fig. 2. Inhibition of linolenic acid peroxidation by lactobacilli strains. Values are the means of three independent determinations \pm s.e.m. 76

Artigo referente ao item 3.3

Bioactivities in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay

Fig. 1. ACE inhibitory activity expressed in percentage for all samples of cheese. Values are the means of three independent determinations \pm s.e.m..... 94

Fig. 2. SDS-PAGE profile of WSE of Roquefort. Lanes: M, molecular weight standards; R, sample of Roquefort cheese WSE..... 95

1 INTRODUÇÃO

A ciência dos alimentos apresenta um conceito de nutrição renovado que excede a função primária dos alimentos como fonte de energia e nutrientes e está voltado àqueles alimentos com potencialidade de melhoramento da saúde e do bem-estar e redução dos riscos de doenças, especialmente doenças crônicas não transmissíveis. Conseqüentemente, muitas indústrias de alimentos visando a saudabilidade, ou seja, buscando oferecer alimentos cada vez mais saudáveis, têm incluído certos nutrientes e componentes bioativos em seus produtos, caracterizando-os como alimentos funcionais.

A venda de alimentos funcionais no Brasil corresponde a quase 1% do total de alimentos, sendo cerca de 65% comercializados como produtos probióticos (Granato *et al.*, 2010). Alimentos funcionais probióticos contêm micro-organismos específicos, majoritariamente bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, uma vez que estão presentes no trato gastrintestinal humano, possuem histórico de uso seguro em alimentos e muitas linhagens apresentam *status GRAS* (*Generally recognized as safe*).

Benefícios à saúde devido a produtos contendo probióticos são bem documentados cientificamente e compreendem o balanço da microbiota intestinal, alívio da intolerância à lactose, além de prevenção e 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, efeito hipocolesterolêmico e redução do risco associado à mutagenicidade e à carcinogenicidade. No entanto, probióticos devem apresentar eficácia clínica comprovada no produto final destinado ao consumo humano. Assim, a seleção de linhagens apropriadas envolve aspectos de segurança, funcionais e tecnológicos. Para a triagem inicial de potenciais bactérias probióticas, testes *in vitro* são recomendados pela FAO/WHO (2002). Porém, em geral, dados obtidos *in vitro* não são suficientes para descrever linhagens como probióticas, mas são valiosos e podem prover uma compreensão científica sobre as características dos organismos candidatos.

Embora haja um número razoável de linhagens probióticas bem caracterizadas e disponíveis para uso comercial, o isolamento e a caracterização de novas linhagens é desejável, considerando que os benefícios à saúde são muito específicos de cada linhagem, bem como tais estudos propiciam contribuição em pesquisa nesta área, podendo resultar, conseqüentemente, na formulação de novos alimentos probióticos.

Em paralelo, proteínas são componentes fundamentais dos alimentos, tanto do ponto de vista nutricional, devido aos aminoácidos fornecidos, como funcionalmente, em vista das propriedades físico-químicas, tecnológicas e sensoriais dos alimentos, além de exercer efeitos fisiológicos benéficos ao organismo. A partir das estruturas proteicas advém o potencial de bioatividades de peptídeos liberados durante o trajeto pelo trato gastrointestinal humano ou durante o processamento dos alimentos.

Peptídeos bioativos são, atualmente, foco de muitas pesquisas relacionadas principalmente às atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva. Proteínas lácteas constituem uma fonte potencial destes compostos e estão entre as mais estudadas.

Queijos maturados contêm numerosos peptídeos originados principalmente da caseína em decorrência da proteólise ocorrida durante o período de maturação, contribuindo para o *flavor*, sabor e textura do queijo. Adicionalmente, muitos peptídeos com interessantes atividades biológicas *in vitro* têm sido identificados em diferentes variedades de queijos.

Contudo, há poucos estudos sobre leite e queijo de ovelha produzidos no Brasil, em vista de que sua produção industrial é recente e restrita aos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Minas Gerais. Deste modo, este estudo objetivou a triagem inicial de bactérias lácticas potencialmente probióticas, isoladas de leite cru e queijo ovinos, por ensaios *in vitro*, bem como a avaliação de bioatividades em extratos aquosos, ricos em peptídeos, de queijos de ovelha maturados produzidos no sul do Brasil e no Uruguai.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias Ácido Lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo composto por 13 gêneros de bactérias Gram-positivas: *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Paralactobacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactoshaepa*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus* e *Weissela* (JAY *et al.*, 2005). Apresentam a forma de cocos, coco-bacilos ou bastonetes com as seguintes características: baixo conteúdo de G + C (< 55 mol%); ácido tolerantes; não esporuladas; nutricionalmente fastidiosas; aerotolerantes mas não aeróbias; incapazes de sintetizar porfirinas; catalase negativas, motilidade negativas, que estão funcionalmente relacionadas devido a sua capacidade comum de produzir primariamente ácido láctico a partir de hexoses (LIN *et al.*, 2006; MAKAROVA & KOONIN, 2007; BROADBENT, 2001).

Particularmente, em função do metabolismo da glicose, são classificadas como homofermentativas, pela produção de ácido láctico como o principal ou único produto; e heterofermentativas, produtoras de igual quantidade de lactato, dióxido de carbono e etanol, além da produção de compostos de *flavor* e aroma, como acetaldeído e diacetil. Representantes das primeiras incluem *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns lactobacilos, enquanto as últimas apresentam como membros importantes *Leuconostoc*, *Weissela* e também alguns lactobacilos (JAY *et al.*, 2005).

Entre os lactobacilos, há uma divisão clássica baseada nas características fermentativas: (1) lactobacilos homofermentativos obrigatórios, (2) lactobacilos heterofermentativos facultativos e (3) lactobacilos heterofermentativos obrigatórios (KANDLER & WEISS, 1986 *apud* ANNUK *et al.*, 2003).

A vasta diversidade das BAL permite sua presença em uma variedade de nichos ecológicos, desde matrizes alimentares, como produtos lácteos, carnes, vegetais, pão de massa azeda e vinho, até superfícies de mucosas humanas, como cavidade oral, vagina e trato gastrintestinal. Essa capacidade de sobreviver em vários ambientes é devido à sua habilidade em transportar e utilizar diferentes substratos. Por exemplo, no genoma de alguns organismos relacionados ao trato gastrintestinal, foram identificados transportadores específicos para fruto-oligossacarídeos – carboidratos não digeríveis encontrados prioritariamente nesse ambiente (SCHROETER & KLAENHAMMER, 2009).

Neste sentido, as bactérias lácticas são as principais responsáveis por muitas das transformações microbianas que ocorrem em alimentos fermentados. Tradicionalmente, esses alimentos eram preservados por meio de fermentações de ocorrência natural ou de “backslopping”; e, dessa forma, BAL apresentam histórico de uso seguro em alimentos. Entretanto, a moderna produção em larga escala explora o uso destas como culturas iniciadoras definidas (*starters*) para controle do processo fermentativo, segurança, padronização e qualidade do produto final (ROSS *et al.*, 2002; DE VUYST & LEROY, 2007). Estes propósitos são alcançados não somente pela acidificação dos alimentos e produção de compostos de *flavor* por parte deste grupo de micro-organismos, mas também dada à contribuição para textura, aumento da digestibilidade e valor nutricional dos alimentos, respectivamente por meio da modificação de proteínas ou produção de exopolissacarídeos, produção de enzimas e liberação de aminoácidos livres ou síntese de vitaminas, particularmente as do complexo B (HUGENHOLTZ, 2008).

Em sistemas alimentares, a aplicação de bactérias lácticas como culturas protetoras ou de seus metabólitos antimicrobianos visando à extensão da vida-de-prateleira e aumento da segurança atende à biopreservação de alimentos (ROSS *et al.*, 2002).

Recentemente, surgiram algumas evidências sobre o papel destas bactérias na manutenção da saúde. Organismos com estas propriedades são referidos como probióticos.

2.2 Probióticos

De acordo com a FAO/WHO (2001), probióticos são definidos como ‘micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do indivíduo’. Consequentemente, várias espécies e gêneros poderiam ser considerados potenciais probióticos; porém, comercialmente, as linhagens mais importantes são as de bactérias ácido lácticas (VASILJEVIC & SHAH, 2008), já que são encontradas em grande número no intestino de animais e humanos saudáveis e muitas delas são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), de acordo com o FDA (PARVEZ *et al.*, 2006). Especialmente, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp., mencionadas na Tabela 1, merecem destaque. O gênero *Bifidobacterium* divide certas propriedades fisiológicas e bioquímicas com BAL típicas, bem como alguns nichos ecológicos, especialmente o trato gastrintestinal. Assim, as bifidobactérias muitas vezes são consideradas parte do grupo das BAL (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Tabela 1 – Algumas linhagens probióticas com aplicações comerciais (Adaptada de VASILJEVIC & SHAH, 2008).

<i>L. acidophilus</i> LA1/LA5	Chr. Hansen
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Lb12	
<i>L. paracasei</i> CRL431	
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb12	
<i>L. acidophilus</i> NCFM [®]	Danisco
<i>L. acidophilus</i> La	
<i>L. paracasei</i> Lpc	
<i>L. plantarum</i> Lp115	
<i>B. lactis</i> HOWARU [™] /B1	
<i>L. acidophilus</i> LAFTI [®] L10	DSM Food Specialties
<i>B. lactis</i> LAFTI [®] B94	
<i>L. paracasei</i> LAFTI [®] L26	
<i>L. johnsonii</i> La1	Nestlé
<i>L. acidophilus</i> SBT 20621	Snow Brand Milk Products Co. Ltd.
<i>B. longum</i> SBT 29281	
<i>L. rhamnosus</i> R0011	Institute Rosell
<i>L. acidophilus</i> R0052	
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult
<i>B. breve</i> strain Yakult	
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)	Foneterra
<i>L. rhamnosus</i> HN001 (DR20)	
<i>L. plantarum</i> 299v (DSM9843)	Probi AB
<i>L. rhamnosus</i> 271	
<i>L. casei</i> Immunitas	Danone
<i>B. animalis</i> DN173010	
<i>L. rhamnosus</i> LB21	Essum AB
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	
<i>L. reuteri</i> SD2112	Biogaia
<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	Valio
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> JS (DSM 7067)	
<i>B. breve</i> 99 (DSM 13692)	
<i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3	University of Tartu, Estonia
<i>L. salivarius</i> UCC 118	University College Cork

Vários são os efeitos benéficos atribuídos aos probióticos com alguns bem documentados e estabelecidos, enquanto que outros apresentam potencial promissor em modelos animais, com necessidade de estudos em humanos para substanciar tais alegações. Segundo FAO/WHO (2001), Mattila-Sandholm *et al.* (2002), Parvez *et al.* (2006) e Vasiljevic & Shah (2008), estão listados:

- manutenção e balanço da microbiota do cólon;
- redução do risco de distúrbios intestinais (constipação e infecções causadas por *Helicobacter pylori*, por exemplo);
- redução do risco e duração de diarreias associadas à rotavírus, a antibióticos (geralmente causada por *Clostridium difficile*) e diarreia do viajante (particularmente causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica);
- suprimento e aumento da biodisponibilidade e digestibilidade de nutrientes da dieta;
- alívio dos sintomas de má absorção intestinal (como exemplo, aumento da atividade de lactase, importante em intolerantes à lactose);
- redução do risco de doenças atópicas e alergias (dermatite, rinite e alergias alimentares – associadas à proteína do leite, por exemplo);
- efeitos sobre encefalopatia hepática, doenças do trato urogenital, síndrome do intestino irritado e doenças inflamatórias do intestino (colite ulcerativa e doença de Crohn);
- diminuição dos níveis de colesterol sérico e de triglicerídeos;
- controle da pressão sanguínea (liberação de peptídeos com atividade inibitória sobre a enzima angiotensina-I);
- atividade anti-carcinogênica, especialmente sobre câncer de cólon;
- modulação do sistema imune, importante fator de contribuição aos efeitos anti-inflamatórios, anti-infecciosos e anti-tumorais.

Vasiljevic & Shah (2008) afirmam que os benefícios à saúde são muito específicos à linhagem. Portanto, não há nenhuma linhagem universal que proporcionaria todos os benefícios propostos, nem mesmo linhagens da mesma espécie o fariam.

Os mecanismos pelos quais os probióticos exercem esses efeitos são ainda desconhecidos, mas podem envolver modificação do pH (produção de ácidos orgânicos), atividade antagonista sobre patógenos por meio da produção de compostos antimicrobianos, competição com patógenos por sítios de ligação, efeito de barreira no intestino, produção de enzimas (β -galactosidase, sal biliar hidrolase), síntese e aumento da disponibilização de nutrientes (hidrólise de proteínas e lipídios), estimulação de células imunomodulatórias, redução da atividade de enzimas que ativam a carcinogênese e inibição do crescimento ou

apoptose de células tumorais (produção de ácidos graxos de cadeia curta, como exemplo, butirato) (PARVEZ *et al.*, 2006; VASILJEVIC & SHAH, 2008; VENTURA *et al.*, 2009).

Em anos recentes, o sequenciamento do genoma de simbioses e comensais do intestino veio à tona, atualmente representado pelo desenvolvimento de uma nova disciplina chamada probiogenômica, que objetiva propiciar conhecimento sobre a diversidade e evolução de bactérias probióticas e comensais e revelar base molecular para as suas atividades de promoção de saúde. A integração entre a probiogenômica e a genômica funcional com dados de expressão de genes do hospedeiro no intestino humano visa expandir a compreensão dos papéis da microbiota (probiótica), interações entre micro-organismos e entre hospedeiro e micro-organismo (VENTURA *et al.*, 2009).

As culturas probióticas são extensivamente exploradas pela indústria de laticínios. Como crescem lentamente no leite devido à baixa atividade proteolítica, as culturas *starters* tradicionais do iogurte são juntamente incorporadas aos leites fermentados contendo probióticos (DAVE & SHAH, 1998). Recentemente, aplicações em queijos e produtos não fermentados como soro de leite e sorvete, além de outros produtos não lácteos receberam a adição de probióticos como maionese, sucos de frutas, produtos cárneos e produtos à base de aveia, conforme relatado por Vasiljevic & Shah (2008). Além disso, probióticos também são vendidos como suplementos na forma de tabletes, cápsulas ou preparações liofilizadas.

Contudo, é essencial que os produtos probióticos contenham um número satisfatório de células ativas no momento do consumo. Os valores mínimos das concentrações de probióticos para efeitos terapêuticos citados na literatura variam entre 10^5 e 10^7 UFC/mL (DAVE & SHAH, 1998; BARRRETO *et al.*, 2003; SANZ, 2007; VASILJEVIC & SHAH, 2008; VÉLEZ *et al.*, 2007). No Japão, o padrão estabelecido pela Associação dos Produtores de Leites e Bebidas Lácteas Fermentadas é de 10^5 células viáveis/mL nesse tipo de produto (ROBINSON, 1987 *apud* BARRRETO *et al.*, 2003). Gomes e Malcata (1999) afirmaram que isso foi exigido em função da dose terapêutica mínima diária ser geralmente considerada 10^8 a 10^9 células viáveis, alcançada com o consumo de 100 g de produto fermentado contendo 10^6 a 10^7 de células viáveis/mL ou g. Além disso, é necessário que haja o consumo regularmente para que se mantenha o efeito desses micro-organismos sobre a composição da microbiota intestinal, já que a colonização não é permanente e sim transitória.

De acordo com as atualizações de julho de 2008 da lista de alegações de propriedade funcional aprovadas da ANVISA, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante, e deve ser

declarada no rótulo, próximo à alegação da propriedade funcional (ANVISA, 2008). Os micro-organismos *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subespécie *thermophilus* foram retirados da lista tendo em vista que além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado.

Em algumas situações como para a melhoria da digestão da lactose, algumas atividades de modulação do sistema imune e efeitos anti-hipertensivos, a viabilidade dos probióticos não é requerida. Nestes casos, os benefícios à saúde são ligados a células não-viáveis ou componentes celulares, atividade de enzimas ou produtos da fermentação (VINDEROLA & REINHEIMER, 2003). Quanto à inclusão de micro-organismos mortos ou mesmo fragmentos bacterianos no conceito de probiótico, Naidu, Bidlack e Clemens (1999) *apud* Vinderola & Reinheimer (2003) introduziram o termo “Substância Ativa Probiótica”, como um complexo celular de BAL que possuem a capacidade de interagir com a mucosa do hospedeiro e modular benéficamente o sistema imune independentemente da viabilidade da bactéria ácido láctica. Alguns prós e contras da aplicação de micro-organismos não viáveis na prática clínica são mencionados por Isolauri *et al.* (2002).

Potenciais linhagens probióticas devem atender a certos critérios para que possam ser efetivas e utilizadas: de segurança, tecnológicos e funcionais.

Para considerações de segurança, a cultura não deve ser patogênica (não deve ter associação com doenças como distúrbios gastrointestinais) e deve ser originada do trato gastrointestinal de humanos saudáveis (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). Porém, em 2001, o grupo técnico da FAO/WHO alegou que a especificidade da ação probiótica é mais importante que a origem do micro-organismo, já que é difícil confirmar tal requisito. Outro aspecto importante de segurança é a resistência a antibióticos. Idealmente, é interessante que os probióticos exibam tolerância a substâncias antimicrobianas usadas na prática clínica, porém não devem ser capazes de transferir essa resistência a outras bactérias, comensais ou oportunistas (DEL PIANO *et al.*, 2006).

Quanto aos aspectos tecnológicos, as linhagens devem ser estáveis geneticamente, apresentar viabilidade e manutenção das características desejáveis durante o processamento e estocagem do produto, possuir propriedades sensoriais agradáveis, resistência a fagos e passíveis de serem produzidas em larga escala. A viabilidade do probiótico na matriz alimentar depende de fatores como pH, temperatura de estocagem, nível de oxigênio, atividade de água e presença de inibidores e micro-organismos competidores. A aplicação destes micro-organismos em produtos não lácteos representa um grande desafio, pois a

estocagem à temperatura ambiente é comum para produtos de cereais, confeitaria e bebidas, por exemplo, considerando que as culturas probióticas são incluídas como ingredientes nestes produtos, elas usualmente não se multiplicam, necessitando grandes demandas para a estabilidade do probiótico (DAVE & SHAH, 1998; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; ROSS *et al.*, 2005; VASILJEVIC & SHAH, 2008; GRANATO *et al.*, 2010).

As bactérias probióticas fornecidas por meio de sistemas alimentares devem primeiramente sobreviver durante a passagem pelo trato gastrointestinal para, então, persistirem no intestino e prover efeitos benéficos ao hospedeiro. Para isso, devem apresentar como critérios funcionais: tolerância à acidez e a sais biliares e capacidade de adesão à mucosa intestinal. Adicionalmente, atividade antagonística é outro requisito fundamental para a sobrevivência no intestino (HUANG & ADAMS, 2004; VINDEROLA & REINHEIMER, 2003; SCHILLINGER *et al.*, 2005).

Algumas estratégias têm sido exploradas para aumentar a viabilidade das linhagens probióticas em ambientes adversos com aplicação de condições de estresse subletal ou uso de células imobilizadas e técnicas de microencapsulação (DEL PIANO *et al.*, 2006; SANZ, 2007; VASILJEVIC & SHAH, 2008; ISOLAURI *et al.*, 2002).

2.2.1 Tolerância ao pH ácido

Cerca de 2,5 L de suco gástrico a um pH de aproximadamente 2,0 é secretado diariamente no estômago, o que causa a destruição de muitos micro-organismos ingeridos, já que a maioria é sensível em valores de pH abaixo de 3,0. Normalmente, os alimentos permanecem no estômago entre 2 a 4 horas, entretanto, líquidos deixam o estômago mais rápido que os sólidos, levando apenas 20 minutos. Neste sentido, a resistência ao trânsito gástrico humano é um importante critério de seleção para micro-organismos probióticos (HUANG & ADAMS, 2004; VINDEROLA & REINHEIMER, 2003).

Em organismos Gram-positivos, o mecanismo de proteção contra condições ácidas é baseado na enzima F_0F_1 -ATPase. O papel desta enzima em organismos destituídos de cadeia respiratória (como é o caso das BAL) é gerar uma força próton motora, via expulsão de prótons (íons H^+). Como consequência, acredita-se que a F_0F_1 -ATPase provoca um aumento do pH intracelular, já que é induzida quando há um baixo pH extracelular. A regulação da enzima parece ocorrer em nível transcricional, porém só é capaz de cumprir esta função se reserva suficiente de ATP for gerada (CORCORAN *et al.*, 2005).

Estudos relacionados ao trânsito gástrico de probióticos têm sido conduzidos tanto com a simulação de suco gástrico quanto com sucos gástricos de humanos ou de animais. Ambas as abordagens possuem limitações; a primeira não contempla a influência dos constituintes não ácidos e da dieta sobre a sobrevivência dos micro-organismos, e a última está condicionada à disponibilidade do material fresco. Em adição, o uso de meios ricos, como meios MRS acidificado, pode provocar proteção das bactérias em função de energia e precursores metabólicos fornecidos (VINDEROLA & REINHEIMER, 2003). Por isso, Schillinger *et al.* (2005), propõem o estudo da tolerância a condições gástricas com as linhagens já incorporadas ao produto final.

Ainda, Sanz (2007) acrescenta que bifidobactérias foram mais sensíveis ao pH 2,0 quando o meio de cultura foi acidificado com HCl exclusivamente do que quando acidificado em combinação de HCl e pepsina. Assim, a pepsina pode ser capaz de proteger as células durante a exposição ao baixo pH por diminuir a hiperpolarização das células, o que é associado à atividade da ATPase.

2.2.2 Tolerância a sais biliares

Outra barreira que bactérias probióticas devem transpor é o intestino delgado. As condições adversas desse ambiente incluem a presença de sais biliares e pancreatina (HUANG & ADAMS, 2004). Os sais biliares são os principais componentes da bile, são sintetizados a partir do colesterol pelo fígado, secretados como conjugados de glicina ou taurina no duodeno (onde facilitam a absorção de gordura) e conservados em condições normais por recirculação entero-hepática (NORIEGA *et al.*, 2006; BEGLEY *et al.*, 2006).

Algumas bactérias Gram-positivas, especialmente linhagens presentes no trato gastrintestinal, são capazes de hidrolisar a ligação amida dos sais biliares conjugados por meio da enzima sal biliar hidrolase, liberando sais biliares livres com baixa propriedade detergente. Essa desconjugação pode justificar a resistência dos micro-organismos produtores da enzima aos sais biliares e pode ser um importante fator de colonização (LIONG & SHAH, 2005; NORIEGA *et al.*, 2006). Porém, alguns lactobacilos foram capazes de crescer na presença de 0,5% de bile, sem hidrolisar estes compostos (BERTAZZONI *et al.*, 2004). Neste sentido, o guia para avaliação de probióticos em alimentos da FAO/WHO (2002) estabelece não somente a avaliação *in vitro* da resistência a sais biliares, mas também a determinação *in vitro* da atividade da enzima sal biliar hidrolase.

Ressalta-se que o pH no intestino delgado encontra-se em torno de 8,0. Para a seleção de bactérias probióticas para uso humano, a concentração de sais de 0,15 a 0,3% tem sido recomendada. O tempo de trânsito do alimento através do intestino delgado é geralmente entre 1 a 4 horas e deve ser considerado nesta avaliação (HUANG & ADAMS, 2004; MARAGKOUidakis *et al.*, 2006).

Os sais biliares desconjugados são menos solúveis que os conjugados, resultando em menor absorção no lúmen intestinal e sua excreção pelas fezes. Além disso, são menos eficientes na solubilização e absorção de lipídios no intestino. Isto sugere um possível mecanismo de ação dos probióticos produtores da enzima sal biliar hidrolase na redução do colesterol sérico, seja pelo aumento da demanda de colesterol para a síntese de sais biliares de forma a repor aqueles perdidos pelas fezes, seja pela redução da solubilidade do colesterol e assim redução da absorção do colesterol através do lúmen intestinal (LIONG & SHAH, 2005; BEGLEY *et al.*, 2006). Outro potencial mecanismo sugerido para a redução do colesterol é a produção de ácidos graxos de cadeia curta, capazes de alterar o metabolismo lipídico. Porém, esse efeito benéfico necessita ser substanciado com maiores investigações e o mecanismo envolvido melhor elucidado (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

2.2.3 Capacidade de adesão

A aderência da bactéria probiótica à mucosa intestinal, como primeiro passo para assegurar ao menos uma colonização temporária, é considerada de grande importância para possibilitar os efeitos benéficos à saúde a ela atribuídos. Há indícios de que este critério funcional esteja relacionado ao aumento da habilidade de estimulação do sistema imune (SCHILLINGER *et al.*, 2005).

A adesão pode ocorrer às diferentes partes da superfície da mucosa intestinal: células epiteliais, camada de muco e/ou matriz extracelular. Como compostos mediadores da adesão destacam-se as adesinas, classificadas de acordo com o alvo da mucosa intestinal, de acordo com sua localização na superfície bacteriana (proteínas da camada superficial, por exemplo), e/ou de acordo com a forma em que se encontram ancoradas na superfície bacteriana (como exemplo, proteínas sortase dependentes). Pode ocorrer ainda, adesão mediada por outros fatores associados à superfície bacteriana que não proteínas, tratando-se, neste caso, de ácidos lipoteicóicos e exopolissacarídeos presentes nas células dos micro-organismos (VÉLEZ *et al.*, 2007).

Alguns fatores podem causar influência significativa na adesão das linhagens probióticas: fase de crescimento, meio de crescimento (como exemplo, componentes do leite podem encobrir os micro-organismos ou cercá-los na matriz do coágulo de caseína), nutrientes do meio (podem afetar a expressão de adesinas), enzimas digestivas (proteases) e bile (OUWEHAND *et al.*, 1999).

Dificuldades envolvidas no estudo de adesão bacteriana *in vivo* levaram ao desenvolvimento de modelos celulares *in vitro* envolvendo três linhagens celulares epiteliais do intestino humano, chamadas, HT-29, HT29-MTX e Caco-2 para a seleção de um grande número de potenciais candidatos a probióticos. Outra possibilidade é avaliar a camada de muco, que apresenta dois papéis: servir de barreira à adesão de certos micro-organismos ao epitélio (situado na parte inferior); mas, ao mesmo tempo, pode servir de habitat para adesão de outras bactérias. No caso de tecidos que apresentam danos, a matriz extracelular pode ficar exposta e permitir a colonização e infecção por patógenos. A capacidade de ligação a essa matriz também é explorada para a seleção de bactérias probióticas, as quais podem competir com os micro-organismos patogênicos pelos mesmos receptores (proteínas, como colágeno e fibrinogênio). Além disso, a adesão de lactobacilos à mucosa já demonstrou estimular a cicatrização do tecido danificado. Ferramentas moleculares também tem sido utilizadas para pesquisa de genes envolvidos na adesão (OUWEHAND *et al.*, 1999; SCHILLINGER *et al.*, 2005; MUÑOZ-PROVENCIO *et al.*, 2009).

Em geral, as adesinas apresentam natureza hidrofóbica e assim, o grau de hidrofobicidade da superfície celular é muitas vezes medido, porque pode favorecer a colonização às superfícies da mucosa intestinal (associado, algumas vezes, com a capacidade de autoagregação) e exercer papel na adesão a células epiteliais e proteínas na matriz extracelular. Porém, Schillinger *et al.* (2005) afirmam ao avaliar 19 linhagens de *Lactobacillus* que a hidrofobicidade pode ser útil na adesão, mas não constituiu um pré-requisito para a forte capacidade de aderência.

Autoagregação parece ser necessária para a adesão de linhagens probióticas às células epiteliais e a habilidade de co-agregação podem formar uma barreira para prevenir a colonização por patógenos (COLLADO *et al.*, 2008). Collado *et al.* (2007) fazem algumas considerações importantes sobre a inibição da adesão de patógenos pelos probióticos ao afirmar que esta habilidade parece depender tanto do probiótico como do patógeno, indicando alta especificidade. Adicionalmente, algumas linhagens testadas foram capazes de favorecer a adesão de *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* and *E. coli* ao muco intestinal, mas esse fato

indesejável foi significativamente reduzido quando linhagens probióticas foram usadas em combinação.

2.2.4 Atividade Antimicrobiana

Bactérias ácido lácticas são capazes de exercer atividade antimicrobiana frente a outros micro-organismos por meio de diversos mecanismos.

Um fator comum e invariável entre estas bactérias são as vias fermentativas usadas para a geração de energia celular e assim, onde quer que elas cresçam, há produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, com o conseqüente decréscimo do pH no meio circundante (ADAMS & NICOLAIDES, 1997). Servin (2004) destaca a importância dos ácidos orgânicos quanto ao forte efeito inibidor contra bactérias Gram-negativas. O ácido láctico produzido age como um permeabilizador da membrana externa destas bactérias, permitindo que outras substâncias antimicrobianas penetrem e, com isso, aumentando a susceptibilidade de patógenos às moléculas antimicrobianas. Entretanto, Wilson *et al.* (2005) descreveu a atividade anti-listerial de *Lactobacillus plantarum* SK1 devido, unicamente, à produção de ácido láctico.

Peróxido de hidrogênio é produzido por muitas BAL na presença de oxigênio molecular juntamente com lactato, piruvato e NADH pelas enzimas flavinas. Porém, em certas ocasiões, a produção de H₂O₂ pode comprometer a sensorialidade do alimento (HOLZAPFEL *et al.*, 1995). O probiótico *Lactobacillus johnsonii* NCC533 foi relatado como produtor de H₂O₂ e o sobrenadante da cultura foi efetivo contra uma linhagem de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium SL1344 *in vitro* (PRIDMORE *et al.*, 2008).

BAL heterofermentativas produzem acetaldeído ativo pela descarboxilação do piruvato. Este produto então se condensa com piruvato, formando α -acetolactato, que é convertido pela α -acetolactato sintetase a diacetil. O produto da descarboxilação do α -acetolactato e da redução do diacetil é a acetoina. O diacetil é responsável pelo aroma de manteiga de produtos lácteos fermentados, mas esta propriedade bem como a alta concentração necessária para a preservação do alimento limita o uso do diacetil como preservativo de alimentos. Da mesma forma, o acetaldeído, usualmente presente em produtos lácteos fermentados em concentrações mais baixas do que o necessário para inibição de micro-organismos indesejáveis, também tem papel no controle do crescimento de

contaminantes, junto com outros metabólitos antimicrobianos das BAL (SUSKOVIC *et al.*, 2010).

Linhagens de *Lactobacillus reuteri* produzem dois compostos, reuterina e reuteriциlina, ambos ativos contra bactérias Gram-positivas. Reuterina é uma mistura de formas monoméricas, monoméricas hidratadas e diméricas cíclicas de β -hidroxipropionaldeído com largo espectro de atividade inibitória, incluindo bactérias gram-negativas, fungos e protozoários (SUSKOVIC *et al.*, 2010).

Outros compostos de baixo peso molecular com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mofos e leveduras têm sido descritos, incluindo dipeptídeos cíclicos, ácido fenilático, ácido 4-hidroxifenilático e ácidos graxos 3-hidróxi. Novos tipos de compostos antimicrobianos foram descobertos em *L. plantarum* (ácido benzóico, metilhidantoína e mevalonolactona) ativos contra fungos e algumas bactérias Gram-positivas (SUSKOVIC *et al.*, 2010).

Bactérias heterofermentativas são capazes ainda de produzir CO₂ e etanol como compostos antimicrobianos. O sistema lactoperoxidase com H₂O₂ e a enzima lisozima das BAL apresentam caráter preservativo. A produção de biosurfactantes, toxinas, amônia e sideróforos (compostos que reduzem a quantidade de ferro disponível para o micro-organismo) também podem influenciar o antagonismo das BAL (HOLZAPFEL *et al.*, 1995; ADAMS & NICOLAIDES, 1997; DE VUYST & LEROY, 2007; CHEIKHYOUSSEF *et al.*, 2008).

Lactobacilos e bifidobactérias podem exercer inibição competitiva por nutrientes e sítios de adesão (inibindo a invasão do epitélio intestinal por patógenos) e além da produção de substâncias antimicrobianas, podem demonstrar atividade antimicrobiana estimulando ou modulando respostas imune (SERVIN, 2004).

De forma particular, bacteriocinas e substâncias tipo-bacteriocinas têm recebido atenção especial e muitos estudos são realizados com este enfoque. Bacteriocinas são sintetizadas ribossomicamente e compreendem peptídeos bioativos liberados extracelularmente ou complexos de peptídeos que possuem efeito bactericida ou bacteriostático sobre outras espécies (NES *et al.*, 1996).

As bacteriocinas produzidas por BAL e as culturas *starters* de BAL produtoras de bacteriocinas são de grande interesse para a indústria de alimentos como preservativos naturais devido à sua habilidade de inibir o crescimento de bactérias deterioradoras e patogênicas, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* (HERNANDÉZ *et al.*, 2005). Atividade contra bactérias Gram-

negativas como *E. coli* e *Salmonella* foram demonstradas, mas geralmente apenas quando a integridade da membrana externa foi comprometida, por exemplo, após choque osmótico ou tratamento com baixo pH, na presença de um detergente ou agente quelante, ou após tratamento a alta pressão ou campo elétrico pulsado (DE VUYST & LEROY, 2007). Este fato reforça que os alimentos não devem ser conservados exclusivamente por bacteriocinas, mas como uma parte de um sistema com múltiplos obstáculos (DEEGAN *et al.*, 2006).

Muitos tipos de bacteriocinas de BAL foram identificadas e caracterizadas, porém a nisina é a bacteriocina mais extensivamente estudada e a única permitida para uso em alimentos até o momento. É produzida pela linhagem da bactéria láctica *Lactococcus lactis subsp. lactis* e usada predominantemente em alimentos enlatados e produtos lácteos. É especialmente efetiva quando utilizada na produção de queijo processado e superfícies de queijos, onde protege contra organismos formadores de esporos termorresistentes como aqueles pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (DEEGAN *et al.*, 2006).

Dois principais estratégias possíveis para a aplicação de bacteriocinas em alimentos devem ser consideradas: (i) inoculação do alimento com BAL produtoras de bacteriocinas *in situ* ou (ii) adição direta da bacteriocina purificada ou parcialmente purificada. Com relação à primeira, probióticos podem levar à produção *in situ* de bacteriocinas no trato gastrointestinal, o que também contribui para a colonização destas bactérias no intestino e proteção contra possíveis patógenos presentes (DE VUYST & LEROY, 2007).

A ação antimicrobiana das bacteriocinas envolve aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática das células alvo, o que leva ao extravasamento de pequenas partículas citoplasmáticas, despolarização do potencial de membrana e eventualmente morte celular (SIMOVA *et al.*, 2009).

2.2.5 Atividade Antioxidante

O interesse por espécies reativas de oxigênio (ROS) em biologia e medicina é evidente por causa da forte relação com idade e doenças (SAIDET & GILLILAND, 2005). Radicais livres e outras espécies de oxigênio reativas são geradas por químicos exógenos e processos metabólicos endógenos em sistemas alimentares ou organismo humano (WANG *et al.*, 2006).

A nutrição humana é claramente associada com o metabolismo oxidativo, que além da produção de energia está envolvida nas funções vitais do organismo. Por exemplo, sob

condições fisiológicas as espécies reativas (incluindo radicais peroxil, radical de óxido nítrico, ânion superóxido) figuram um papel crucial na defesa imune primária do organismo humano por células fagocitárias contra micro-organismos patogênicos. Por outro lado, excesso prolongado de espécies reativas é altamente nocivo para as biomoléculas e células do indivíduo, resultando em desbalanço da rede funcional antioxidante do organismo e levando a uma possível inflamação (SONGISEPP *et al.*, 2005). A inflamação, por sua vez, está envolvida no início e patogenicidade de doenças crônicas. As ROS podem causar dano oxidativo em biomoléculas (DNA, lipídeos e proteínas) resultando em morte da célula e dano tecidual. Arteriosclerose, câncer, enfisema, cirrose, e artrite têm sido correlacionados com dano oxidativo (WANG *et al.*, 2006).

Tanto organismos eucariotos quanto procariotos aeróbios exibem um sistema geral de defesa antioxidante para atenuar os efeitos danos das ROS. Os componentes importantes do sistema de defesa celular são glutathione reduzida (GSH) e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx) e catalase (CAT) (KULLISAAR *et al.*, 2002).

A maioria das bactérias lácticas possuem como sistemas mais comuns a enzima superóxido dismutase e altas concentrações internas de Mn^{2+} . A habilidade das bactérias ácido lácticas para criar baixo potencial de oxidação-redução necessário para o seu ótimo crescimento provavelmente está relacionado a algum desses sistemas. Ainda, algumas linhagens de lactobacilos produtores de catalase foram reportadas, as quais degradaram H_2O_2 a baixos níveis, bloqueando a formação de radicais peroxil (SAIDET & GILLILAND, 2005).

A ingestão de suplementos antioxidantes ou alimentos contendo antioxidantes pode reduzir os danos ao organismo humano (WANG *et al.*, 2006). Neste aspecto, as propriedades das bactérias lácticas de sequestrar radicais livres seriam de interesse para a indústria processadora de alimentos. Elas podem benéficamente afetar o consumidor por fornecer outra fonte de antioxidantes ou por fornecer bactérias probióticas com potencial de produção de antioxidantes durante o crescimento no trato intestinal. Algumas espécies de lactobacilos e bifidobactérias têm sido relatadas pela produção de atividade antioxidante. A intensidade desta atividade varia entre as culturas em cada estudo. A maioria destes estudos baseiam os resultados na avaliação de extratos livres de células de bactérias (SAIDET & GILLILAND, 2005).

Estudos sobre bactérias ácido lácticas com capacidade antioxidante são recentes, como o descrito por Lin & Chang (2000), em que bactérias lácticas intestinais (*Bifidobacterium longum* ATCC 15708 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356)

apresentaram efeito antioxidante tanto nas células inteiras quanto nos extratos livres de células, inibindo a peroxidação do ácido linoléico (medido pelo método do ácido tiobarbitúrico - TBA). Também demonstraram habilidade em remover o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), inibir a citotoxicidade e reduzir a peroxidação lipídica do plasma sanguíneo.

Choi *et al.* (2006) demonstraram a capacidade antioxidante *in vitro* de células mortas pelo calor (HK) e de frações destas células (polissacarídeos solúveis) de *Lactobacillus acidophilus* 606 e *Lactobacillus casei* ATCC 393 pela medida da redução do radical DPPH usando uma linhagem de *L. acidophilus* ATCC 4356 como controle positivo.

A prevenção da oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) pelas bactérias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 e *Streptococcus thermophilus* 1131 foram relatadas por Terahara *et al.* (2000) e Terahara *et al.* (2001). A avaliação foi feita *in vitro* pela medida da atividade dos extratos etéreos das bactérias sobre a prevenção da oxidação de membrana de eritrócito (método TBA); e, *in vivo*, pela oxidação de LDL de ratos (apenas para o primeiro micro-organismo) e pela avaliação com LDL humano (para ambos os micro-organismos). Além disso, a detecção da habilidade de remoção do radical DPPH também foi realizada.

Lactobacillus fermentum ME-3 tem sido bastante estudada devido ao seu potencial antioxidante. Essa linhagem foi isolada da microbiota intestinal de uma criança saudável, apresentou atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*, expressou a enzima manganase superóxido dismutase, foi capaz de eliminar radicais hidroxil e mostrou conter glutatona reduzida, conforme Kullisaar *et al.* (2002). Em um experimento com participantes voluntários saudáveis (KULLISSAR *et al.*, 2003), o consumo de leite fermentado de cabra com esta linhagem por 21 dias demonstrou efeitos anti-aterogênicos: prolongou a resistência da fração lipoprotéica à oxidação, diminuiu os níveis de lipoproteínas peroxidadas, LDL oxidado, 8-isoprostanos e razão glutatona, aumentando a atividade antioxidante total. Destaca-se que a linhagem exibiu substancial persistência no trato gastrointestinal. Em 2005, Songisepp *et al.* avaliaram não somente leites fermentados, mas também formulações de cápsulas contendo esse micro-organismo em voluntários saudáveis.

Songisepp *et al.* (2004) aplicaram *L. fermentum* ME-3 em queijo e suas atividades antioxidante e antimicrobiana foram moderadamente mantidas. De forma complementar, Järvenpää *et al.* (2007) expuseram que a composição de ácidos graxos foi estável e o perfil de compostos voláteis foi alterado em queijos com diferentes conteúdos de gordura contendo

esta linhagem combinada a óleos vegetais, reafirmando o potencial redutor do micro-organismo e sugerindo reduzida necessidade de antioxidantes químicos no produto.

Interessante destacar que o efeito antimicrobiano das bactérias lácticas pode também ser expresso via ROS. Apesar de serem deficientes em citocromos e catalase, na presença de oxigênio a ação de flavoproteínas, SOD e NADH oxidases, fazem o consumo de oxigênio possível e causam o aumento do conteúdo de ânions superóxido, radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio, que são altamente tóxicos a vários micro-organismos (KULLISAAR *et al.*, 2002). Neste aspecto, WANG *et al.* (2006), verificaram acúmulo de peróxido de hidrogênio em extratos hidrossolúveis de soja fermentados com bactérias lácticas, enquanto que nos produtos não fermentados ocorreu efeito removedor deste composto. Em compensação, a atividade antioxidante foi maior nos extratos fermentados quando comparados aos não fermentados.

2.2.6 Atividade de β -galactosidase

Considerando que muitas bactérias lácticas são encontradas no intestino humano e empregadas em vários produtos lácteos fermentados, o metabolismo da lactose, principal açúcar do leite, é de interesse para a produção de alimentos e redução do risco de doenças. É geralmente aceito que muitos leites fermentados melhoram a digestão da lactose, um dos efeitos probióticos bem estabelecidos de bactérias lácticas (VINDEROLA & REINHEMER, 2003; HONDA *et al.*, 2007).

Na maioria das espécies de lactobacilos, a lactose é transportada pela lactose permease e hidrolisada por β -galactosidase. Outro mecanismo de transporte em muitas linhagens de BAL é o sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferase, no qual a lactose é fosforilada (lactose 6-fosfato) e hidrolisada pela fosfo- β -galactosidase. Ainda, a enzima fosfo- β -glicosidase pode fazer parte da fermentação da lactose (HONDA *et al.*, 2007).

A enzima β -galactosidase (β -gal, EC 3.2.1.23) é uma glicosidase largamente usada especialmente na indústria de laticínios e expressa tanto em animais e plantas como em micro-organismos, incluindo bactérias e fungos. Dentre esses, LAB constituem foco de estudo, considerando seu status GRAS e assim, enzimas derivadas desses organismos podem ser usadas sem extensiva purificação em aplicações relacionadas a alimentos (ARASOVÁP *et al.* 2002; IQBAL *et al.*, 2010). As bactérias do iogurte, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, são as maiores produtoras de β -gal (USTOK *et al.*, 2010).

β -gal catalisa a hidrólise da lactose em seus monômeros galactose e glicose, resultando em aplicações para melhoria de características tecnológicas e sensoriais de alimentos, como aumento da solubilidade e redução de risco de cristalização em leite condensado, sorvetes e doce de leite; aumento de doçura; diminuição da higroscopicidade de produtos lácteos desidratados; melhores características reológicas de textura e cremosidade (como exemplo, redução do ponto de congelamento de sorvetes); auxílio do metabolismo de fermentos lácteos pelo fornecimento de açúcares prontamente assimiláveis; redução da probabilidade de ocorrência da reação de Maillard; conversão de soro de queijo em produtos com valor agregado (MARTINS & BURKET, 2009; USTOK *et al.*, 2010).

Com relação a um importante aspecto nutricional, β -gal permite a ingestão de alimentos contendo lactose por pessoas intolerantes a esse carboidrato. A intolerância à lactose consiste na ausência de produção de β -gal pelo intestino delgado provocando sintomas caracterizados por diarreia, flatulência e dor abdominal devido à lactose não digerida, geralmente utilizada pelas bactérias do intestino produzindo ácidos orgânicos e gases (HONDA *et al.*, 2007). No Brasil, apesar de poucos estudos, a incidência de intolerantes à lactose entre a população está entre 46 e 67% (GRANATO *et al.*, 2010). Dessa forma, alimentos adicionados da enzima pura ou fermentados com culturas produtoras de β -gal são capazes de melhorar a digestão da lactose com pouco ou nenhum efeito adverso.

A efetividade de culturas de BAL de forma a atender à propriedade funcional de alívio aos sintomas da intolerância à lactose é dependente da concentração celular no produto, da quantidade de β -gal produzida com conseqüente liberação no trato gastrintestinal e o nível de enzima que permanece ativa após passagem pelo estômago (GRANATO *et al.*, 2010).

Ao lado da hidrólise do açúcar do leite e de galactosídeos estruturalmente relacionados, reações de transglicosilação também são catalisadas pela β -gal, resultando em galacto-oligossacarídeos (GOS) a partir de substratos ricos em lactose. GOS são interessantes ingredientes funcionais em razão dos benefícios à saúde e potencial melhoria da qualidade de alimentos, atuando na redução da intolerância à lactose, como prebióticos e adoçantes pouco calóricos e não formadores de cáries aplicáveis em produtos lácteos fermentados, bebidas, pães e produtos de confeitaria (MARTINS & BURKET, 2009; USTOK *et al.*, 2010).

O efeito prebiótico de GOS é alcançado pelo cumprimento aos critérios de (i) resistência à acidez gástrica, à hidrólise pelas enzimas digestivas e à absorção gastrintestinal; (ii) fermentação pela microbiota intestinal e (iii) estimulação seletiva da multiplicação e/ou atividade de bactérias intestinais associadas à saúde e ao bem-estar. Pelo fato de o último critério ainda não estar suficientemente comprovado, a ANVISA reconhece como prebióticos

apenas inulina e fruto-oligossacarídeos, permitindo a alegação de contribuição para o equilíbrio da flora intestinal em produtos que os contêm (ANVISA, 2008).

Conforme Martins & Burket (2009), os efeitos benéficos dos GOS englobam modulação do trânsito do trato gastrointestinal com incremento na excreção fecal de massa seca, aumento na umidade do bolo fecal através de pressão osmótica, absorção de diferentes minerais, como o cálcio, efeito benéfico no metabolismo de carboidratos e de lipídios; ao lado dos efeitos sinérgicos conseguidos pela estimulação de micro-organismos probióticos como modulação do sistema imune, decréscimo do pH do cólon e maior produção dos ácidos graxos de cadeia curta, efeito protetor contra infecções nos tratos gastrointestinal, respiratório e urogenital; redução do risco de câncer de cólon.

GOS juntamente com fruto-oligossacarídeos estão entre os mais importantes e melhor estudados grupos de oligossacarídeos prebióticos e ainda há necessidade de encontrar boas fontes microbianas de β -gal com alta atividade de transglicosilação, segundo Ibqal *et al.* (2010).

2.3 Leite de Ovelha

O leite de ovinos compreende um pequeno percentual do mercado total de leite. Em escala mundial, o leite de ovelhas corresponde a cerca de 1,4% da produção de leite das principais espécies produtoras (EMBRAPA, 2008).

Em diversas regiões do mundo, sobretudo na região Mediterrânea da Europa, em países como França, Itália, Espanha e Grécia, a atividade leiteira na ovinocultura encontra-se bem estabelecida e resulta em 66% da produção mundial de leite de ovelha (RIBEIRO *et al.*, 2007).

A produção de ovelhas é a quarta maior atividade pecuária no Brasil. O rebanho nacional de ovinos está concentrado na região Nordeste, seguido da região Sul, na qual o estado do Rio Grande do Sul detém a maior parte do efetivo ovino (MAPA, 2005).

A produção e o processamento industrial de leite de ovelhas ainda são muito pequenos no país. A cadeia ovina brasileira está focada na produção de carne e lã, já que os produtos lácteos de animais ruminantes são considerados caros (NESPOLO *et al.*, 2010). Entretanto, a produção de leite em ovinos tem sido vista como uma alternativa sustentável, de baixo investimento inicial e de fácil adoção pela mão de obra familiar, podendo melhorar a qualidade de vida dos pequenos e médios produtores rurais (SOUZA *et al.*, 2005).

A produção de leite ovino correspondente a apenas 0,0019% do total de leite produzido no Brasil. Atualmente, a produção de leite ovino e sua industrialização, além do Rio Grande do Sul, alcançam os estados de Santa Catarina e de Minas Gerais (ROHENKOHL *et al.*, 2010).

A composição média do leite de ovelha é de 7,6% de gordura, 5,6% de proteína, 19,0% de sólidos totais, 10,3% de sólidos desengordurados, 4,7% de lactose e 4,6% de caseína. Essa característica lhe confere a capacidade de ser transformado em produtos láteos de alta qualidade com altos rendimentos por litro de leite (RIBEIRO *et al.*, 2007). A viscosidade do leite de ovelha é maior devido à sua riqueza em sólidos e as suas qualidades queijeiras promovem um rendimento em queijo duas vezes superior ao leite de vaca. Assim, a maior parte do leite de ovelha obtido é transformada em produtos de elevado valor comercial como queijo e, em menor escala, em iogurte (SOUZA *et al.*, 2005).

2.4 Compostos Lácteos Bioativos

Substâncias bioativas compreendem componentes alimentares, nutrientes ou não nutrientes, que possuem ação metabólica ou fisiológica específica (ANVISA, 2002). Para ser considerado bioativo, o componente da dieta deve exercer um efeito biológico a um nível fisiologicamente realista e a bioatividade medida deverá ter potencial de afetar a saúde de maneira benéfica (MÖLLER *et al.*, 2008).

O leite naturalmente contém uma gama de bioatividades devido à lisozima, lactoferrina, imunoglobulinas, fatores de crescimento e hormônios, os quais são secretados na forma ativa pela glândula mamária. Além disso, muitas bioatividades estão criptografadas dentro da estrutura primária das proteínas lácteas, requerendo proteólise para liberação dos precursores (MINERVINI *et al.*, 2003).

Em alimentos lácteos, atenção especial tem sido dada a peptídeos fisiologicamente ativos derivados de hidrolisados protéicos e produtos fermentados (KORHONEN & PIHLANTO, 2006).

Peptídeos biofuncionais ou bioativos são definidos como fragmentos protéicos específicos que possuem impacto positivo sobre as funções ou condições do organismo e podem, assim, contribuir à saúde (KITTS & WEILER, 2003). Eventualmente modulam a função fisiológica ao se ligarem a receptores específicos da célula alvo, levando a indução de respostas fisiológicas.

Os efeitos benéficos das sequências peptídicas incluem atividades antimicrobiana, antioxidante e quelante de metais, antitrombótica (casoplatelinas), hipocolesterolêmica, anti-hipertensiva, de formação óssea, inibitória de peptidases, imunomodulatória e atividades similares às de substâncias opióides – agonistas, casomorfinas e lactorfina; enquanto casoxinas são antagonistas (MINERVINI *et al.*, 2003; KORHONEN & PIHLANTO, 2006; FITZGERALD & MURRAY, 2006).

Tais peptídeos são inativos quando parte da sequência da proteína de origem e podem ser liberados de três formas: (a) hidrólise por enzimas digestivas, (b) hidrólise por micro-organismos proteolíticos e (c) ação de enzimas proteolíticas de micro-organismos ou plantas (KORHONEN & PIHLANTO, 2006; PHELAN *et al.*, 2009). Porém, para que exerçam a bioatividade devem ser resistentes *in vivo* ao trânsito gastrointestinal, devem ter habilidade de ultrapassar a mucosa intestinal (absorção) e atingir o órgão alvo com necessidade de transporte pelo soro sanguíneo (FITZGERALD & MURRAY, 2006).

Muitos peptídeos derivados de leite revelam propriedades multifuncionais, ou seja, sequências peptídicas específicas com duas ou mais atividades fisiológicas diferentes. Algumas regiões da estrutura primária das caseínas contêm sequências peptídicas sobrepostas que exercem diferentes atividades. Estas regiões são consideradas “zonas estratégicas” que estão parcialmente protegidas da degradação proteolítica posterior (CLARE & SWAISGOOD, 2000).

As caseínas são os principais componentes proteínicos da maioria dos mamíferos (aproximadamente 80% do total de proteínas). As sequências primárias das caseínas α_{s1} , α_{s2} e β demonstram considerável variação entre espécies, consistente com a rápida evolução de genes que parecem ter um precursor comum e com modificações pós-translacionais. Em contrapartida, κ -caseínas exibem características que demonstram também uma origem distinta entre as espécies. Importante salientar que muitos estudos sobre peptídeos bioativos consideram proteínas lácteas bovinas como precursoras e somente poucos usam leites de espécies diferentes (MINERVINI *et al.* 2003). Considerando a grande homologia entre as sequências protéicas em leites bovino, ovino e caprino, é previsível que os peptídeos relatados como agentes bioativos e liberados de proteínas bovinas também estejam entre as proteínas caprinas e ovinas (PARK, 2007).

A ativação das sequências peptídicas por bactérias ácido lácticas (BAL) possui grande vantagem por se tratar de micro-organismos grau alimento capazes de enriquecer alimentos com substâncias bioativas. O sistema proteolítico das BAL é muito complexo e composto por: uma serina proteinase localizada extracelularmente, um sistema de transporte específico para

di, tri e oligopeptídeos, e múltiplas peptidases intracelulares. As proteinases de BAL podem hidrolisar mais de 40% das ligações peptídicas de α_{s1} e β -caseínas, produzindo oligopeptídeos de 4 a 40 resíduos de aminoácidos. Assim, essas bactérias podem potencialmente gerar peptídeos bioativos, sendo que o tipo de produto lácteo, a tecnologia adotada e especialmente a seleção da linhagem (baseada na especificidade da proteólise) são provavelmente todos os fatores que influenciam a ativação proteolítica dos peptídeos bioativos criptografados (MINERVINI et al., 2003). Linhagens de BAL clivam ligações peptídicas não normalmente clivadas por proteases digestivas (como aquelas envolvidas no imino grupo da prolina) e hidrolisam as chamadas regiões estratégicas das caseínas, que são protegidas pela clivagem pelas proteases digestivas (BENKERROUM, 2010).

A recente pesquisa em peptídeos bioativos de alimentos seguem três principais direções destinadas a desenvolver e validar métodos específicos e sensíveis para (i) traçar a rota de formação de peptídeos bioativos das proteínas de origem; (ii) identificação de propriedades biológicas; (iii) melhorar as propriedades “positivas” descobertas em peptídeos naturais com o desenho de análogos estruturais sintéticos ou peptídeos miméticos. Estes estudos visam esclarecer a relação estrutura-atividade dos peptídeos, informação essencial para o desenho de novos ingredientes terapêuticos ou alimentares (MAMONE *et al.*, 2009).

A primeira referência de peptídeos bioativos na literatura científica foi em 1950 por Mellander, o qual sugeriu que peptídeos fosforilados derivados da caseína, caseínofosfopeptídeos (CPP), reforçavam a calcificação óssea não dependente de vitamina D em crianças raquíticas. Considerando a capacidade de CPP para ligar-se e solubilizar minerais, possuem importância na prevenção de osteoporose, cáries dentárias e anemia. CPP possui efeito anticariogênico pela promoção da recalcificação do esmalte dos dentes, enquanto o glicomacropéptido (GMP) derivado da κ -caseína parece contribuir ao efeito anticáries por inibição da adesão e crescimento de bactérias formadoras de placa na mucosa oral. Vários produtos dentários contendo CPP e/ou GMP foram lançados no mercado em alguns países. Além disso, GMP pode ter efeito benéfico na modulação da microbiota intestinal, já que o macropéptido é conhecido pela promoção do crescimento de bifidobactérias devido ao conteúdo de carboidratos (principalmente ácido siálico) (KORHONEN E PIHLANTO, 2006).

2.4.1 Peptídeos Antimicrobianos

Uma gama de peptídeos bioativos pode ser liberada de caseínas e proteínas do soro, mas somente uma pequena parte destes peptídeos tem sido identificada e caracterizada com respeito à atividade antimicrobiana (BENKERROUM, 2010).

É geralmente aceito que o efeito antibacteriano total no leite é maior que a soma das contribuições individuais de imunoglobulina e proteínas de defesa diferentes à imunoglobulina (lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima) ou peptídeos. Isso pode ser atribuído a atividade sinérgica de proteínas e peptídeos que ocorrem naturalmente, em adição a peptídeos gerados a partir de precursores de proteínas inativas (MINERVINI *et al.*, 2003; GOBBETI *et al.*, 2004).

Peptídeos antimicrobianos são reconhecidos como importantes componentes da imunidade inata, já que são encontrados tanto nas superfícies epiteliais e dentro de células fagocíticas granulares de mamíferos, capazes não somente de inibir micro-organismos, mas também capazes de modular respostas inflamatórias (GOBBETI *et al.* 2004; HAQUE & CHAND, 2008).

A primeira descoberta sobre propriedades antimicrobianas do leite foi feita por Jones e Simms em 1930, que identificaram uma substância capaz de inibir estreptococos, chamada lactenina, a partir de leite tratado com coalho (GOBBETI *et al.* 2004; HAQUE & CHAND, 2008).

Caseidinas, obtidas da digestão com quimosina de caseína α_{s1} em pH neutro, foram os primeiros peptídeos lácteos de defesa a serem relatados, com relativamente alto peso molecular (4 - 6 kDa) e atividade contra bactérias Gram-positivas incluindo staphylococci, *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (BENKERROUM, 2010; SILVA & MALCATA, 2005).

Isradicina é outro peptídeo antimicrobiano, liberado da clivagem da quimosina de α_{s1} -caseína bovina, que consiste em um fragmento com 23 resíduos de aminoácidos. É um peptídeo catiônico com atividade *in vitro* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas quando empregada em altas concentrações (0,1 a 1 mg/mL). *In vivo*, mostrou-se bastante competitiva com antibióticos de uso terapêutico com forte efeito protetor em camundongos contra *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes*, *Candida albicans* e *Listeria monocytogenes* (GOBBETI *et al.*, 2004; BENKERROUM, 2010). Porém, o uso apresenta limitações tecnológicas de custo, variação isomérica durante fermentação (inconstância da pureza) e

natureza catiônica. Há poucos estudos destinados à aplicação em alimentos, o que poderia ser promissor para esta área (BENKERROUM, 2010).

Caseínas bovinas α_{s2} também são fonte de peptídeos antimicrobianos, entre os quais, caseína-I foi o primeiro a ser bem caracterizado, obtido da hidrólise de proteínas lácteas por tratamento térmico sob condições ácidas e por isso ácido e termoresistente, capaz de inibir o crescimento de *E. coli* e *Staphylococcus carnosus* (BENKERROUM, 2010; SILVA & MALCATA, 2005; HAQUE & CHAND, 2008). Outros quatro peptídeos antibacterianos foram identificados de um hidrolisado de pepsina de α_{s2} -caseína ovina e correspondem a resíduos de aminoácidos de α_{s2} -caseína bovina (HAQUE & CHAND, 2008).

Um peptídeo antimicrobiano de β -caseína humana, obtido por hidrólise de leite humano com uma proteinase purificada de *Lactobacillus helveticus* PR4, inibiu um grande espectro de bactérias (*Enterococcus faecium*, *Bacillus megaterium*, *E.coli* K-12, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*) mesmo na baixa concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando características similares à isradicina (MINERVINI *et al.*, 2003).

O derivado da κ -caseína, caseínomacropéptídeo (CMP), exerce atividade antibacteriana *in vitro* contra importantes patógenos orais e *E. coli*. Porém, a única forma ativa da molécula se encontra não glicosilada e fosforilada, designada kapacina. A molécula é capaz de ligar íons zinco e cálcio, resultando em incremento significativo da atividade antimicrobiana mesmo em pH neutro (BENKERROUM, 2010; HAQUE & CHAND, 2008). O peptídeo κ -caseína, isolado de κ -caseína bovina digerida com tripsina, inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E.coli* and *S. typhimurium* e também exibiu atividade citotóxica contra células mamárias, incluindo linhagens celulares leucêmicas, provavelmente devido à apoptose (HAQUE & CHAND, 2008).

Proteínas do soro (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, albumina séria, imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, entre outras) são conhecidas fontes de peptídeos bioativos com propriedades de promoção à saúde ou antimicrobianas. Entre elas, lactoferrina e lisozima possuem atividades antimicrobianas inerentes e também liberam fragmentos proteicos pela digestão proteolítica (BENKERROUM, 2010).

Lactoferrinas, derivados da lactoferrina bovina e humana pela clivagem enzimática de pepsina são os peptídeos mais estudados, mostraram inibição contra uma grande variedade de espécies microbianas, incluindo *L. monocytogenes* e, ainda, demonstraram propriedades bacteriostáticas e bactericidas mais potentes que a fração intacta de lactoferrina (GOBBETI *et al.* 2004; SILVA & MALCATA, 2005). Até mesmo atividade antifúngica da lactoferrina ou

de seus peptídeos (exemplo, lactoferricina B), em combinação a agentes azólicos foi demonstrado contra *Candida albicans* (CLARE & SWAISGOOD, 2000).

De forma contrária, peptídeos antimicrobianos derivados de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina têm recebido menor atenção devido a três principais limitações: restrito espectro de ação limitado a bactérias Gram-positivas, moderado potencial antimicrobiano e potencial alergenicidade dos peptídeos, principalmente aqueles derivados da β -lactoglobulina, conhecida como o principal alérgeno do leite bovino com numerosos epítomos (regiões da molécula capazes de ligar imunoglobulina E) dispersos ao longo da molécula (BENKERROUM, 2010).

Os mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos agem sobre as bactérias sensíveis são importantes, mas pouco estudados e permitiriam desenvolver novas moléculas com espectro de ação maior ou elevar a atividade antimicrobiana de peptídeos conhecidos. De uma forma geral, os peptídeos primeiramente atuam na membrana plasmática através do estabelecimento de uma ligação eletrostática entre o peptídeo (setores catiônicos) e os componentes da membrana (grupos fosfato carregados negativamente). Em paralelo, o caráter hidrofóbico de alguns peptídeos permite a interação com os lipídios da membrana. Tal interação resulta em formação de um canal transmembrana transiente que altera a permeabilidade e/ou geração de energia enquanto preserva a integridade da célula ou resulta na ruptura da membrana plasmática com consequente desintegração da célula intacta. No entanto, o alvo final não é sempre a membrana em si, já que o peptídeo pode transpor o citoplasma e agir sobre os componentes intracelulares interferindo nas funções celulares ou causando a floculação do citoplasma (GOBBETTI *et al.* 2004; BENKERROUM, 2010).

2.4.2 Peptídeos Antioxidantes

A importância da oxidação no organismo e em alimentos está largamente reconhecida. Sob condições normais, espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres são efetivamente eliminadas do organismo pelos sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos (como superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e não-enzimáticos (vitaminas, elementos traços, coenzimas e cofatores). Alterações no balanço entre a geração e destruição de ROS levam à superprodução ou diminuem a detoxificação, levando a efeitos celulares letais e destrutivos pela oxidação de lipídios, proteínas, DNA e enzimas, associado a muitas doenças crônicas como doenças cardiovasculares, desordens neurodegenerativas, aterosclerose,

artrite, diabetes e alguns tipos de câncer (PHANTURAT *et al.*, 2010; SARMADI & ISMAIL, 2010). Em adição à produção fisiológica de oxidantes e a reações secundárias, a oxidação de óleos e gorduras durante o processamento e estocagem de produtos alimentícios causa deteriorações no sabor, textura, valor nutricional e vida útil e leva à produção de toxinas (PIHLANTO, 2006; DONG *et al.*, 2010; SARMADI & ISMAIL, 2010).

Com o intuito de atuar contra as reações oxidativas em alimentos e sistemas biológicos, muitos antioxidantes sintéticos têm sido usados. Entretanto, os potenciais efeitos adversos destes compostos estimularam o uso de antioxidantes naturais, tais como catequinas, tocoferóis, ascorbato, ácido rosmarínico e vários extratos fenólicos de plantas. Além destas fontes tradicionais, a procura por antioxidantes naturais se estendeu para proteínas e peptídeos de origem animal e vegetal, como proteínas de soja, zeína, gémem de trigo, gelatina, albumina de ovo e proteínas lácteas (XUE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010).

O leite contém vários fatores antioxidantes, entre eles, vitaminas C e E, beta-caroteno e sistemas enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase). Ainda, albumina sérica como quelante de metais de transição; lactoferrina, uma glicoproteína capaz de ligar-se a ferro; e aminoácidos (como tirosina e cisteína) com atividade sequestradora de radicais livres. Caseínas são capazes de inibir oxidação em diferentes sistemas modelo, o que é atribuído à oxidação dos resíduos de aminoácidos. Porém, afirma-se que aminoácidos livres não poderiam substituir a caseína como antioxidante, sugerindo que a estrutura primária das moléculas de caseína desempenha o papel (PIHLANTO, 2006). Os resíduos fosforilados de serina da fração polar das caseínas são efetivos quelantes de cátions que formam complexos com cálcio, ferro e zinco (RIVAL *et al.*, 2001). Além disso, hidrolisados de caseína parecem ser inibidores mais efetivos da oxidação lipídica que CPP com o mesmo conteúdo de fósforo, assim, as propriedades antioxidantes não devem ser atribuídas somente à capacidade de quelar metais pelos resíduos de fosfoserina, mas também ao sequestro de radicais livres (PIHLANTO, 2006).

Proteínas do soro também possuem propriedades antioxidantes, que podem ser melhoradas pelo fracionamento ou hidrólise com determinadas enzimas. Hernández-Ledesma *et al.* (2005b) investigaram a atividade antioxidante de hidrolisados de proteínas bovinas do soro, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, por diferentes proteases comerciais. O mesmo grupo de pesquisa demonstrou em outro trabalho que peptídeos sintéticos derivados de β -lactoglobulina podem tanto aumentar como limitar a atividade antioxidante ao interagir com ácido ascórbico (dependendo da estrutura do peptídeo), devendo este fato ser considerado

quando do desenvolvimento de novos ingredientes alimentares contendo peptídeos de β -lactoglobulina (HERNÁNDEZ-LEDESMA *et al.*, 2007).

A fermentação do leite tem sido descrita como uma estratégia para liberação de peptídeos antioxidantes das caseínas, como em leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953 (KUDOH *et al.*, 2001), por combinações de BAL (VIRTANEN *et al.*, 2007) e leite fermentado comercial da Europa (HERNÁNDEZ-LEDESMA *et al.*, 2005a), além de queijo Cheddar (GUPTA *et al.*, 2009).

O mecanismo exato responsável pela atividade antioxidante de peptídeos não está completamente esclarecido, embora vários estudos tenham mostrado a inibição da peroxidação lipídica, sequestro de radicais livres e quelação de íons metálicos de transição. As propriedades antioxidantes estão mais relacionadas à composição, estrutura e hidrofobicidade dos aminoácidos (SARMADI & ISMAIL, 2010).

Aminoácidos aromáticos como tirosina e triptofano podem doar prótons aos radicais deficientes em elétrons. O grupo indol do triptofano serve como doador de hidrogênio, tal como o grupo imidazol da histidina, que também está relacionado ao aprisionamento do radical peroxil e/ou habilidade de quelar íons metálicos, já o grupo SH da cisteína interage diretamente com radicais (SARMADI & ISMAIL, 2010). De acordo com Gupta *et al.* (2009), histidina e prolina estão entre os resíduos mais importantes na inibição da peroxidação lipoprotéica. Ao passo que Gómez-Ruiz *et al.* (2008), relatam histidina e os aminoácidos hidrofóbicos leucina, prolina e fenilalanina como importantes inibidores da oxidação de ácido linoleico. Ainda, Sarmadi & Ismail (2010) destacam a metionina e lisina como aminoácidos que causam atividade antioxidante. Phelan *et al.* (2009) enfatizam a sequência glicina-leucina como importantes para o sequestro de radicais, bem como Zhu *et al.* (2008) sugerem que glicina e asparagina, enquanto aminoácidos ácidos, estabilizam íons metálicos por interações de carga. Ressalta-se, porém, que a correta posição dos aminoácidos na sequência peptídica é relevante.

Adicionalmente, o peso molecular dos peptídeos pode influenciar na atividade antioxidante. Peptídeos com 500-1500 Da são mais interessantes que peptídeos com peso acima de 1500 Da ou abaixo de 500 Da. Entretanto, a atividade antioxidante total é muitas vezes descrita como resultante do conjunto de ações e não exclusivamente da ação individual dos peptídeos de uma amostra (SARMADI & ISMAIL, 2010).

2.4.3 Peptídeos Anti-hipertensivos

A hipertensão arterial é um importante problema de saúde pública devido à alta prevalência e ao seu papel em doenças cardiovasculares como doença coronária, insuficiência cardíaca congestiva e acidente vascular cerebral (LIGNITTO *et al.*, 2010). O tratamento é realizado com diversos medicamentos sintéticos: β -bloqueadores, diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e bloqueadores de receptores da angiotensina II (TORRUCO-UCO *et al.*, 2008).

O sistema renina-angiotensina é uma das formas de regulação da pressão arterial e desordens nesse sistema estão estreitamente relacionadas com a patogenicidade da hipertensão (TORRUCO-UCO *et al.*, 2008). A ECA é uma enzima chave na rota bioquímica desse sistema, aumenta a pressão arterial pela conversão do inativo decapeptídeo angiotensina I em um potente octapeptídeo vasoconstritor, angiotensina II, bem como inativa o vasodilatador nonapeptídeo bradicinina. Esta enzima está presente no plasma e em células endoteliais em muitos órgãos, como em pulmões, rins e coração e caracterizada como uma enzima ligada na borda em escova nas células epiteliais do jejuno humano. Para exercer um efeito sobre o sistema regulatório, inibidores exógenos de ECA devem ser absorvidos e então alcançar a ECA em um apropriado tecido alvo (PIHLANTO-LEPPÄLÄ *et al.*, 1998).

Além de medicamentos, componentes alimentares como cálcio, ácido γ -aminobutírico, exopolissacarídeos de *Lactobacillus casei*, polifénolis de cacau e chá, nitrato de vegetais ou uma dieta rica em frutas, vegetais e produtos lácteos têm sido relatados como efetivos redutores da pressão arterial (SIEBER *et al.*, 2010).

Peptídeos inibidores da ECA estão entre os compostos bioativos mais estudados e, embora diferentes proteínas alimentares possam agir como precursoras destes peptídeos, as proteínas lácteas são as mais importantes fontes de inibidores de ECA. Peptídeos inibidores de ECA derivados da caseína são chamados de casoquininas e os derivados das proteínas do soro de lactoquininas. A inibição da ECA resulta em um efeito anti-hipertensivo e também pode influenciar diferentes sistemas regulatórios envolvidos na modulação da pressão arterial, defesa imune e atividade do sistema nervoso (PIHLANTO-LEPPÄLÄ *et al.*, 1998; PRIPP *et al.*, 2006; LIGNITTO *et al.*, 2010).

Além da inibição da ECA, proteínas lácteas também podem exercer efeitos anti-hipertensivos por outros mecanismos, como inibição da liberação da endotelina-1 por células endoteliais, estimulação da atividade da bradicinina, aumento da produção de óxido nítrico

derivado do endotélio e aumento da ação vasodilatadora de ligantes a receptores opiáceos (KORHONEN & PIHLANTO, 2006).

Produtos lácteos enriquecidos com peptídeos bioativos capazes de diminuir a pressão arterial estão disponíveis no mercado internacional. EvolusTM foi o primeiro a ser comercializado em 2000 na Finlândia pela Valio, o LHTM na Islândia, o Vita de Kaiku na Espanha e o Emmi-EvolusTM em Portugal são todos leites fermentados por *Lactobacillus helveticus* e ainda Ameal STM da Calpis do Japão, elaborado pela fermentação láctea de *L. helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Em todos esses produtos, a ação anti-hipertensiva se deve à presença dos tripeptídeos VPP (valina-prolina-prolina) e IPP (isoleucina-prolina-prolina), os quais purificados ou como componentes dos produtos hidrolisados, já demonstraram sua efetividade para baixar a pressão arterial em humanos depois de 2 a 7 semanas de consumo (TORRUCO-UCO *et al.*, 2008).

Outras espécies de bactérias lácticas (lactobacilos, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*) também têm sido estudadas para elaboração de leite fermentado hipotensivo ou com atividade inibidora de ECA, porém *L. helveticus* é o micro-organismo preferido, devido à sua alta atividade proteolítica em comparação a outras BAL e também devido à especificidade das enzimas proteolíticas, resultando em peptídeos mais ativos (NIELSEN *et al.*, 2009).

Diferentes variedades de queijos mostraram conter peptídeos com atividade inibitória de ECA, sendo um dos primeiros estudos realizado por Okamoto *et al.* (2005). Muitos trabalhos relacionam o tempo de maturação com o conteúdo de peptídeos bioativos, porém o tipo da cultura, o tratamento prévio do leite e as condições de processamento também influenciam na atividade inibitória de ECA (MEYER *et al.*, 2009; PRIPP *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação dos peptídeos anti-hipertensivos ocorre de forma similar aos fármacos, já que os três últimos resíduos de aminoácidos adjacentes à região C-terminal que apresentam atividade se enlaçam fortemente ao sítio ativo da ECA. Bem como, interações de um enlace aniônico em sítios distintos à região catalítica do sítio ativo já foram relatados, produzindo um tipo de inibição alostérica. Interessante acrescentar que a ECA possui dois sítios catalíticos e pode haver diferença na afinidade pelo substrato (TORRUCO-UCO *et al.*, 2008). Os aminoácidos localizados no tripeptídeo C-terminal são importantes para a ligação com a enzima, como os hidrofóbicos (aromáticos, com cadeias ramificadas e imino) e também os aminoácidos básicos arginina e lisina. A prolina na porção final C-terminal tem mostrado contribuir para a correta localização do peptídeo no sítio ativo da ECA, provavelmente por sua estrutura rígida permitir ao grupo carboxil uma adequada conformação para interagir com

o resíduo positivamente carregado do sítio ativo da enzima. Além disso, peptídeos contendo prolina são geralmente mais resistentes às enzimas digestivas. Aminoácidos dicarboxílicos são menos favoráveis (PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al., 1998; GÓMEZ-RUIZ et al., 2006).

Os peptídeos anti-hipertensivos derivados dos produtos lácteos não são tão potentes quanto às drogas comerciais (captopril, por exemplo) comumente usadas no tratamento da hipertensão; entretanto, os produtos com moderada bioatividade se comportam intrinsecamente (e naturalmente) como alimentos funcionais, e assim podem facilmente ser incluídos na alimentação diária (SILVA & MALCATA, 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho estão apresentados na forma de artigos, sendo cada subtítulo deste capítulo correspondente a um destes artigos.

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

- Publicado na *Brazilian Journal of Food Technology*, Edição Especial, III SSA, p. 75-80, novembro de 2010.

3.2 Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese

- A ser submetido à *International Journal of Food Microbiology*.

3.3 Bioactivities in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay

- A ser submetido à *Food Research International*.

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

Stela Maris Meister Meira¹, Virginia Etges Helfer², Renata Voltolini Velho³, Luis Fernando da Costa Medina⁴ e Adriano Brandelli⁵

1- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – Av. Bento Gonçalves 9500, CEP: 91501-970, Porto Alegre - RS, Brasil, Telefone: (51) 3308 7048; e-mail: stelamm@yahoo.com.br

2- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – e-mail: vikzinha@hotmail.com

3- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – e-mail: re.voltolini@hotmail.com

4- Universidade do Vale do Rio dos Sinos – Laboratório de Biologia Molecular – e-mail: lfmedina@unisinos.br

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

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 horas 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 horas. 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 horas. Estes resultados estimulam a continuidade do estudo destes 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 hours. 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 hours of evaluation. These results instigate the continuity of studies of these isolates for food probiotic application.

KEYWORDS: lactic bacteria; probiotics; biological barriers; ovine milk.

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 “micro-organismos 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 dos últimos 10 anos (BAO et al., 2010).

Entre os efeitos benéficos de produtos contendo organismos probióticos bem documentados e estabelecidos cientificamente estão o balanço da microbiota intestinal, alívio da intolerância a lactose e prevenção e 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 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 a 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.

MATERIAIS E MÉTODOS

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, Brasil. Os isolados foram mantidos como culturas estoque congeladas a -21°C em caldo Man Rogosa Sharp (MRS) contendo 20% (v/v) de glicerol e propagadas duas vezes antes do uso.

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 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.

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 foram inoculadas nos tratamentos e incubadas a 37°C por 4 horas, juntamente com controles em pH 6,5 e sem adição de sais biliares. A sobrevivência sob 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).

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 horas de incubação a 37°C.

Tolerância ao trânsito gastrintestinal superior

Uma das linhagens foi selecionada para a avaliação de tolerância ao trânsito gastrintestinal 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 ressuspensas 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) e pH 2,5 ou 2,0, enquanto, o suco intestinal simulado foi composto por pancreatina (1 mg/mL), 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).

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).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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.

Tolerância a condições ácidas e a sais biliares

A sobrevivência e colonização no trato digestivo são considerados aspectos críticos para o aumento da funcionalidade e expressão de funções fisiológicas de promoção à saúde por micro-organismos 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 horas (HUANG e ADAMS, 2004).

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

Linhasgens	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%)

Os resultados da viabilidade das bactérias lácticas quando expostas a diferentes condições ácidas após 4 horas de incubação estão demonstrados na Figura 1. Não houve diferença significativa entre os controles (pH 6,5 – tempo inicial, T0 e após 4 horas, 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 horas, porém observou-se que a contagem bacteriana esteve abaixo do limite de detecção em pH 2 após este período e mesmo após 30 minutos.

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 hora (contagem entre 2,3 e 2,9 log₁₀ UFC/mL).

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 – 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).

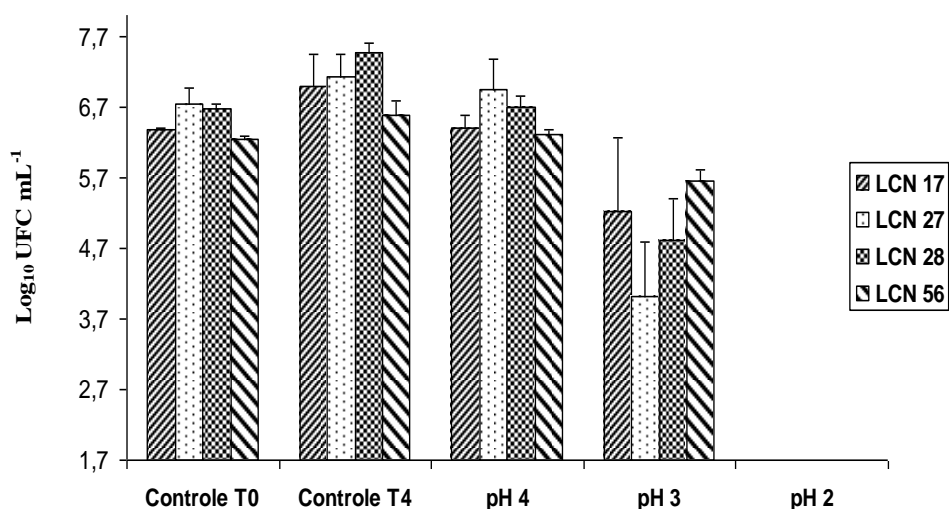


Figura 1 – Tolerância das bactérias lácticas a diferentes condições ácidas. Os resultados constituem a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão, com limite de detecção de $1,7 \log_{10} \text{UFC mL}^{-1}$.

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 a 4 horas. Os sais biliares são os principais componentes da bile, capazes de desorganizar a estrutura de membranas celulares e, dessa forma, 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 horas (resultado não mostrado). Ao avaliar os tratamentos e os controles T4 (sem adição de sais após 4 h) em comparação aos controles no tempo inicial (T0, 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.

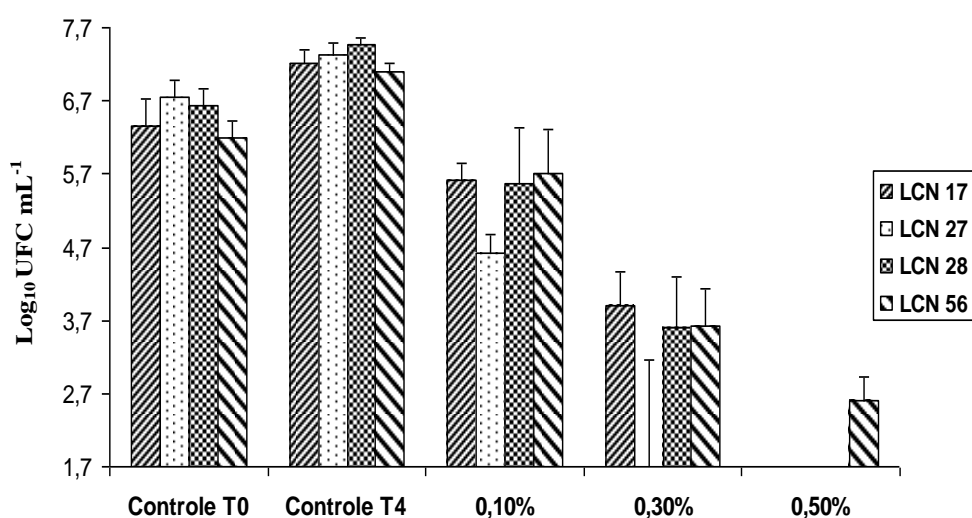


Figura 2 – Tolerância a sais biliares das bactérias lácticas. Os resultados constituem a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Limite de detecção $1,7 \log_{10}\text{UFC mL}^{-1}$.

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 horas (T_4) para todas as linhagens.

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

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

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.

Tolerância ao trânsito gastrintestinal 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 1 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 apenas após 30 min quando da exposição em pH 2,0.

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

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 viabilidade dos micro-organismos 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 10^8 UFC/mL 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) reforça 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 sobrevivência, a tolerância ao ácido e à bile e diferenciada funcionalidade dos probióticos, o que determina sua eficácia no trato gastrintestinal. Sugere, ainda, que a investigação cuidadosa da interação entre probióticos e componentes alimentares deve ser considerada no desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos.

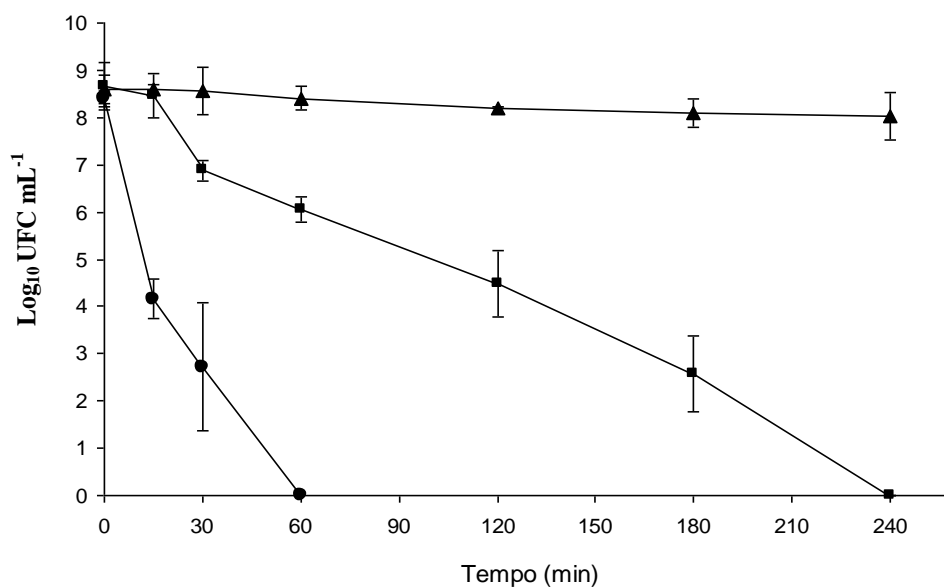


Figura 3 – Contagem de células viáveis de LCN 56 em suco gástrico simulado ● pH 2,0; ■ pH 2,5. ▲ Efeito de leite desnatado ao suco gástrico pH 2,0.

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 BIBLIOGRÁFICAS

- 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, GP.; 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, 2, p. S248–S255, 2006.
- FAO/WHO. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria** – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, 2001.
- 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.
- 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 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 MP, BONATTO D, BIZANI D, HENRIQUES JAP, 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, 2008.

3.2 Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese

Stela Maris Meister Meira^a, Virginia Etges Helfer^a, Renata Voltolini Velho^a, Fernanda Cortez Lopes^a and Adriano Brandelli^{a,*}

^a Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brasil

* Corresponding author: ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brasil; fax +5551 3308 7048; e-mail: abrand@ufrgs.br

Abstract

Twelve *Lactobacillus* isolates from Brazilian starter-free ovine cheeses were examined *in vitro* for their probiotic potential. Two reference strains (ATCC cultures) were also included for comparison. The strains were identified by 16S rDNA sequencing as *Lactobacillus plantarum* (7), *Lactobacillus brevis* (2), *Lactobacillus casei* (2) and *L. parabuchneri* (1). All strains showed variable resistance to gastric juices and relative tolerance to pancreatin and bile salts. *L. brevis* SM-B was the most acid tolerant strain. Autoaggregation ability after 24 h was above 50% and hydrophobicity was higher than 60% for most strains. All lactobacilli could inhibit linolenic acid oxidation, excepting *L. parabuchneri* strain, whereas none of them could scavenge DPPH radical. β -galactosidase activity ranged from 47.7 to 2503 Miller units. Inhibition of food pathogens like *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Salmonella* Typhimurium was demonstrated and it was associated to production of organic acids. The *Lactobacillus* strains analyzed contain interesting functional characteristics and revealed the strains *L. brevis* SM-B and *L. plantarum* SM-I as two possible probiotic microorganisms.

Keywords: probiotic, ovine cheese, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*.

1. Introduction

The relationship between diet and health/disease, besides economic interests of industry and health care costs, stimulate the development of new products whose function exceeds sensory and nutritional role of foods. Soon, the concept of functional foods has to be taken into account and implies to their ability to beneficially influence body functions in order to improve the state of well-being and health and reduce the risk of diseases (Granato et al., 2010). Probiotic microbial strains are among the functional components with properties to alter intestinal microbiota or intestinal immune barriers and probiotic-containing foods are generally perceived as “safe” and “natural” (Begley et al., 2006). Probiotics means “for life” and are defined as “live microorganisms that when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” (FAO/WHO 2002).

Reduction and prevention of diarrhea from different origin, improvement of the intestinal microbial balance by antimicrobial activity, and alleviation of lactose intolerance symptoms are among the scientifically established and/or clinically proved health effects of probiotics (Parvez et al., 2006; Vasiljevic and Shah, 2008). Furthermore, some studies have shown that certain lactic acid bacteria possess antioxidant activity (Lin and Chang, 2000; Kulisaar et al., 2002).

Probiotics added to food formulations should range between 10^8 and 10^9 colony forming units in the daily recommendation of the ready for consumption product (Gomes e Malcata, 1999). In addition, their regular consumption is required for the maintenance of positive effects, since probiotic bacteria are only transient in the intestinal tract and do not become part of the host’s gut microbiota (Valerio et al., 2006).

Lactobacillus species are desirable members of intestinal tract and increasingly being explored as viable probiotics into various food products. Since not all lactobacilli could confer health benefits to the host, the isolation and characterization of strains with specific and well-characterized activities appears appropriate not only to improve the quality and functional properties of probiotic products but also to advance both applied and fundamental science in the area of probiotics (Pan et al., 2006). First, resistance to the manufacturing process of the carrier food and then the gastrointestinal ecosystem is required (Valerio et al., 2006). The ability to reach, survive and persist in the environment in which it is intended to act have to be assessed to ensure optimal functionality and expression of health promoting physiological functions by probiotics (Zanoni et al., 2008). The selected bacteria should be tolerant to low pH, proteolytic enzymes and bile salts, and be prevalent in the upper digestive tract (Huang

and Adams, 2004). For adhesion purposes and colonization, good surface hydrophobicity and aggregation properties may be relevant (Del Re et al., 2000).

In this sense, the aim of the present work was to apply established *in vitro* tests to investigate the probiotic potential of novel *Lactobacillus* strains isolated from ovine cheese manufactured in the South Region of Brazil, determining safety and function characteristics to allow future studies for probiotic candidates.

2. Material and methods

2.1 Isolation of *Lactobacillus* strains

Starter-free raw ovine milk cheeses (60 days of ripening) were collected from a commercial cheese plant in Southern Brazil. Samples (25 g) were diluted in 225 mL of 1 g/L peptone water and homogenized in a blender. Serial 10-fold dilutions were done and inoculated on Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Himedia). After anaerobic incubation at 30°C for 72 h, typical colonies were randomly selected from countable plates, and then transferred to the isolation media. The LAB selection included those strains showing Gram-positive staining, rod-shaped, catalase-negative and reaching pH below 5.0 in MRS broth. Strains denominated as LCN 35 and LCN 39 were isolated previously (Nespolo and Brandelli, 2010), as well as standard strains, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, were used for comparison purposes. All bacteria were stored at -20°C in 20% (v/v) glycerol and propagated twice on MRS broth before use.

2.2. 16S rDNA sequence analysis

Total DNA was extracted by phenol/chloroform method and polimerase chain reaction was performed with universal primers 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), as described by Lisboa et al. (2006). The amplicons were purified and sequenced in the ATCGene laboratory (Porto Alegre, Brazil). The BLAST algorithm was used to search homologous sequences in GenBank and the software CLUSTAL W version 1.8 was used for sequences alignment (Thompson et al., 1994).

2.3. Hemolysis

The lactobacilli strains were streaked on blood base agar plates, containing 5% (v/v) defibrinated sheep blood and incubated for 48 h at 30°C (Maragkoudakis et al., 2006). The hemolytic reaction was examined by observation of a partial hydrolysis of green-hued zones

around colonies (α -hemolysis), clear zone around bacterial growth (β -hemolysis), and no reaction (γ -hemolysis).

2.4. Acid and bile salts tolerance

To evaluate the tolerance to upper gastrointestinal tract, simulated juices were prepared as described by Huang and Adams (2004). Bacterial cells with 24 h incubation in MRS broth were harvested by centrifugation (12,000 x g for 5 min at 4°C), washed twice in 10 mmol/L phosphate buffer pH 7.0 and resuspended in 5 g/L NaCl solution. An aliquot of 0.2 mL of cellular suspension was incubated at 37°C in the presence of 1.0 mL of simulated gastric and intestinal juices. Viable cell counts were conducted at initial time and at 180 min for gastric transit tolerance and after 240 min to determination of intestinal transit tolerance.

Simulated gastric juice was prepared fresh daily containing 3 mg/mL pepsin (Sigma), 5 g/L NaCl and acidified with HCl to pH 3.0, 2.5 and 2.0. Otherwise, simulated intestinal juice was consisted of 1 mg/mL pancreatin (Merck), 5 g/L NaCl and adjusted to pH 8.0, with or without 5 g/L of a 1:1 mixture of sodium cholate and sodium deoxycholate (Sigma). Both solutions were sterilized by filtering through 0.22 μ m membranes (Millipore, Bedford, USA).

2.5. Autoaggregation and hydrophobicity

The *in vitro* properties of autoaggregation and hydrophobicity were performed as a preliminary screening of adhesive probiotic strains, as described by Collado et al. (2008). First, BAL were incubated at 30°C for 24 h in MRS broth and cells were harvested by centrifugation, washed twice and resuspended in 10 mmol/L phosphate buffer pH 7.0 to 0.25 \pm 0.02 absorbance at 600 nm.

The autoaggregation assay was performed as follows: the cellular suspensions were incubated at 37°C and absorbance values at 600 nm of the upper layer were measured in different interval times (2, 16, 20 and 24 h). The results were expressed as percentage: $1 - (A_{600\text{nm}}$ of upper suspension/ $A_{600\text{nm}}$ of total bacterium suspension) x 100.

The hydrophobicity evaluation employed xylene to determine bacterial adhesion to the hydrocarbon. Then, a cellular suspension volume (3 ml) was thoroughly mixed by vortexing for 60 s with 400 μ L of xylene. After 2 h at 37°C, the aqueous phase was carefully removed and absorbance at 600 nm was measured. The hydrophobicity was reported as adhesion percentage according to the formula: $[(A_0 - A)/A] \times 100$, where A_0 and A are the absorbance before and after extraction with xylene, respectively.

2.6. β -galactosidase activity

The β -galactosidase (β -gal) activity was determined according to Vinderola and Reinheimer (2003). Briefly, isolates were cultivated in lactose-MRS broth and the cells washed and permeabilized with 1:9 (v/v) toluene:acetone by vortexing. After, the bacterial suspensions were incubated with *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG, Sigma) at 37°C for 15 min and reaction stopped with 1 mol/L Na₂CO₃. Absorbance values were measured at 420 and 560 nm and results expressed as Miller units as follows:

$$\beta\text{-gal activity} = 1000 \times [(A_{420} - 1.75 \times A_{560}) / (15 \text{ min} \times 1 \text{ mL} \times A_{1560})]$$

where A1 was the absorbance just before assay and A2 was the cell density of the reaction mixture.

2.7. Antioxidant assays

To determine antioxidant activity of whole cells at high concentration suspension (optical density of 2.5 at 600 nm) two assays were used. Linolenic acid peroxidation assay was carried out according to Kullisaar et al. (2002) based on the ability of bacteria to inhibit linolenic acid oxidation, expressed in percentage. In addition, DPPH radical scavenging capacity of the isolates was verified using the method of Brand-Williams *et al.* (1995). An aliquot of 0.05 mL of cellular suspensions was transferred to test tubes with 2 mL of freshly prepared 60 μ mol/L DPPH methanolic solution. After 45 min, the mixture was centrifuged and the scavenging activity was measured spectrophotometrically by the decrease in absorbance at 517 nm. Likewise, blank value was determined by using 1.15 g/L KCl solution.

2.8. Screening for antimicrobial activity

Detection of antibacterial activity against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Salmonella* Typhimurium ATCC 14078, was performed by the agar spot test (Jacobsen et al., 1999). A 5 μ l volume of overnight cultures was spotted onto MRS agar plates and incubated anaerobically to develop colonies at 30°C for 24 h. Then, 10 ml of BHI soft agar (7.5 g/L) inoculated with indicator strain (10^7 CFU/mL) was poured onto plates and incubated aerobically at 37°C for 24 h. The inhibition results (mm) were calculated subtracting the diameter of the inhibition zone from the diameter of LAB colony.

The same agar spot method was further used to test the activity of cell free-neutralized supernatants, obtained from overnight cultures grown in MRS broth at 30°C. After

centrifuging the culture at 12,000 x g for 5 min at 4°C, the supernatants were neutralized with 5 mol/L NaOH and then heated for 5 min at 90°C to inactivate residual viable cells.

3. Results and discussion

3.1 Identification of lactic acid bacteria

A total of 12 lactobacilli isolates were considered in this study and molecular identification evidenced *Lactobacillus plantarum* as the predominant specie (7 strains), followed by *Lactobacillus brevis* (2 strains) and *Lactobacillus casei* (2 strains). These results agree with other published results related to ovine cheeses that also found similar proportion of these species (Angelis et al., 2001; Sanchez et al., 2006; Majhenic et al., 2007; Navidghasemizad et al., 2009).

Additionally, one strain was identified as *Lactobacillus parabuchneri*. This lactic acid bacterium is an obligatory heterofermentative occasionally isolated from cheeses (Coton et al., 2008; Gobbetti et al., 2002), unlike Sengül and Cakmakci (2003) and Sengül (2006) reported *L. parabuchneri* as a frequently isolated species from Civil cheese and the predominant specie in Tulum cheese samples, respectively.

3.2. Hemolysis

The determination of hemolytic activity is considered a safety aspect for the selection of probiotic strains (Joint FAO/WHO, 2002). Ruiz-Moyano et al. (2009) found *L. casei* strains isolated from human faeces with α -haemolysis and then discarded them for selection as potential probiotics. On the other hand, Maragkoudakis et al. (2009) consider strains that produced green-hued zones around the colonies (α -hemolysis) and absence of zones (γ -hemolysis) as non hemolytic. In this study, none of the *Lactobacillus* strains were positive for hemolytic reaction (all of them γ -hemolytic), indicating possible non-pathogenicity (Maragkoudakis et al., 2006).

3.3 Resistance to simulated gastric and intestine juices

According to the guidelines for the evaluation of probiotics in food reported by FAO/WHO working group (2002), resistance to gastric acidity and to bile salts are the two currently most used *in vitro* tests.

In respect to acid tolerance, Table 1 shows that *L. brevis* SM-B is the most resistant strain at pH 3.0 and pH 2.5 pepsin-containing simulated gastric juices (reduction of 0.3 and

2.0 log, respectively), followed by *L. plantarum* SM-I, LCN 35, SM-M and SM-C strains (a decrease range from 0.7 to 1 log at pH 3.0 and from 2.9 to 3.7 log at pH 2.5). In contrast, *L. brevis* SM-A exhibited the highest decrease in viable counts at pH 2.5. *L. parabuchneri*, *L. plantarum* SM-5 and *L. casei* isolates also showed significant loss of viability in both treatments.

None of the strains could survive at pH 2.0 for 3 h. Only *L. brevis* SM-B could be detected above detection limit (>1.7 CFU/mL) after 1 h (data not shown). In stomach, pH can be as low as 1.0, but can increase to 3-5 after eating, with a gastric emptying time normally ranging between 20 and 120 min, depending on the amount of liquids and on the composition, concentration and dimensions of solid food particles (Prasad et al., 1998; Zanoni et al., 2008). In most *in vitro* assays, pH 3.0 has been chosen, due to substantial decrease in the viability of strains at pH 2.0 or below (Prasad et al., 1998), what is confirmed in this work.

Our results also showed that acid tolerance is strain-specific and like described by Zanoni et al. (2008), it is a trait of individual strains and strongly affected by experimental conditions. Thus, a direct comparison with other studies is difficult to be established. However, similar studies evidenced, in a general manner, that lactobacilli had increased sensitivity at pH values below 3.0 (Vinderola e Reinheimer, 2003; Maragkoudakis et al., 2006; Ortu et al., 2007). Guo et al. (2009) emphasized that variation in the acid tolerance might be related to the difference in H⁺-ATPase activity in the analyzed strains. This enzyme acts controlling the H⁺ concentration between the exterior and interior of the cell, but requires ATP, thereby maintaining pH homeostasis and cell viability (Corcoran et al., 2005).

The presence of bile salts and pancreatin in small intestine is another biological barrier for probiotic bacteria survival and colonization. The transit time of food through the small intestine is generally between 1 and 4 h and pH around 8.0 (Huang and Adams, 2004). All strains showed little reduction in viability after 210 min in simulated pancreatic juice (Table 1). However, with the addition of 5 g/L of unconjugated bile salts (cholate and deoxycholate sodium salts) a more pronounced decrease was often observed, especially for *L. casei* SM-G (3.8 log orders). These results are in agreement with other studies for propionic bacteria (Huang and Adams, 2004) and lactobacilli (Maragkoudakis et al., 2006). In contrast, some reported strains are able to grow in presence of high concentration of bile salts (Vinderola and Reinheimer, 2003; Minelli et al., 2004; Ortu et al., 2007).

The relevant physiological concentrations of human bile range from 0.3 to 0.5%, composed mainly of bile salts. Bile salts concentration and bacteria properties are possible factors for the depressant effect of bile salts on the growth. Among them, cholic acid is one of

the most common free bile acids in the intestine and one mechanisms of bile salt resistance is the capacity of deconjugating bile salts (Vinderola and Reinheimer, 2003; Liong and Shah, 2005; Guglielmotti et al., 2007; Matahara et al., 2008). Quantity and physiological state of the bacterium have influence on the survival to the gastrointestinal transit. Likewise, when probiotic bacteria are delivered from a food, the buffering capacity of food matrix constitutes a major factor affecting pH of stomach and could enhance tolerance to gastric survival, as demonstrated by several studies (Shillinger et al., 2005, Pinto et al., 2006; Valerio et al., 2006; Guglielmotti et al., 2007; Meira et al., 2010).

3.4 Autoaggregation and hydrophobicity properties

The capability to autoaggregate together with hydrophobicity can be used to select potentially probiotic bacteria according to Collado *et al.* (2008), Del Re et al. (2000) and Xu et al. (2009).

Autoaggregation values increased along with the incubation time (Table 2). Although it not could denote clearly the behavior of strains in the first 2 h, it was better evidenced from 16 h until final incubation period. Most strains showed more than 50% of aggregation after 24 h, highlighting *L. casei* SM-H as the most autoaggregative strain (79.8%), which can suggest binding capabilities in the gastrointestinal tract.

The degree of hydrophobicity (Table 2) was high for *L. plantarum* isolates, except for LCN 35. *L. brevis* SM-A was the most hydrophobic (88%), while *L. casei* SM-G was the ovine cheese isolate showing lowest hydrophobicity (15.2%). Tamang et al. (2009) classified as hydrophobic bacteria those with a percentage of hydrophobicity greater than 70%, then only *L. plantarum* SM-5, SM-C and SM-I together with *L. brevis* SM-A and *L. fermentum* could be considered. Hydrophobicity could enable interaction with organic mucin layer of the gut (Matahara et al. 2008), confer a competitive advantage for bacterial maintenance in the gastrointestinal tract (Vinderola and Reinheimer, 2003) and imply a potential capacity to activate the gut immune response (Vinderola et al., 2008).

Sometimes, highly hydrophobic cell surfaces are associated to autoaggregation ability (Collado et al., 2008; Xu et al. 2009). Thus, the correlation between these properties was showed to SM-G, SM-L and SM-B isolates, which presented the minor values for both autoaggregation and hydrophobicity.

These two properties are likely to be correlated to adhesion ability to epithelial cells and mucosal surfaces (Del Re et al., 2000; Collado et al., 2008; Martins et al., 2009; Xu et al., 2009). However, lactobacilli adhesion is a complex phenomenon dependent not only on achievement an adequate mass through aggregation and physicochemical properties (like

hydrophobicity) but also on more specific mechanisms involving chemical composition of both intestinal and microbial cell surfaces (Schillinger et al., 2005; Collado et al., 2008; Martins et al., 2009).

3.5. β -gal activity

All strains tested exhibited β -gal activity. This enzyme is produced by most lactobacilli and the discovering of new stains producing high level of β -gal has gained importance for potential applications as probiotic cultures in dairy industry or as producers of the prebiotic ingredients galacto-oligosaccharides, considering both hydrolase and transglycosilase activities of the enzyme advantageous from technological and health point of views (Ibrahim and O'Sullivan, 2000; Ustok et al., 2010).

To determine the enzymatic activity, lactose was used as an inducer, replacing the glucose in MRS medium. Results revealed strains with different values of enzyme activity (Fig. 1), being the minor value observed for *L. casei* SM-H (47.7 Miller units) and maximum values observed for *L. fermentum* ATCC 9338 and *L. plantarum* SM-I (1941 and 2503 Miller units, respectively). Comparable results are described by Vinderola and Reinheimer (2003), with higher values obtained for the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* starter strain (2053 Miller units) and for *Lactobacillus acidophilus* probiotic strain (1301 Miller units), while low values or absence of β -gal were detected in *L. casei* strains. Cebeci and Gürakan (2003) also found strong variation among *L. plantarum* strains and Pinto et al. (2006) highlighted the highest specific activity of β -gal exhibited by *L. plantarum* ATCC 8014 (also used as reference strain in this study) in detriment of commercial probiotics *Lactobacillus johnsonii* LA and *Lactobacillus paracasei* BFE 675 (isolated from Actimel®).

3.6. Antioxidant activity

Linolenic acid oxidation assay was used to determine the capability of the strains to inhibit lipid peroxidation, which is a commonly *in vitro* trial to evaluate antioxidant effect (Zhang, 2010). The results are summarized in Fig. 2, indicating that all strains, except *L. parabucheni* SM-L, possess antioxidant ability ranged from 14.5% to 33.1%.

The same total antioxidant assay in different groups of intestinal lactobacilli revealed the highest values for obligate homofermentative lactobacilli, whereas for facultatively and obligate heterofermentative lactobacilli the activity was strain-specific (Annuk et al., 2003). Zanoni et al. (2008) described as exhibiting an effective antioxidant activity the intact cells of

Lactobacillus plantarum LP 1 and *Streptococcus thermophilus* Z 57, with 33.1 and 33.8% inhibition of linolenic acid oxidation, respectively. These values are similar to those observed for SM-B and SM-H, the most antioxidative strains of this study. But it is necessary to consider that cellular concentrations were different between these works.

The scavenging capacity of DPPH radical was not observed, considering that none of the strains could decrease the absorbance at a significant level when compared to control (data not shown). These results are not in agreement with other authors that found strains with both inhibition of linoleic acid peroxidation and scavenging ability of DPPH (Lin and Chang, 2000). Moreover, Wang et al. (2009) demonstrated *in vitro* scavenging capacity against the DPPH radical in a dose dependent manner by whole cells of a strain of *Lactobacillus fermentum* and further *in vivo* improvement in the antioxidant defense system for pigs fed with this bacterium.

Lactic acid bacteria possess different antioxidative mechanisms such as reduced glutathione, superoxide dismutase, NADH oxidase, NADH peroxidase, thiol compounds, metal ion chelating ability, scavenge of reactive oxygen species and reducing activity. These defensive capabilities lead the expression of antioxidant activity by some lactobacilli and potentially provide another dietary source of antioxidants or oxidative stress reducing probiotic bacteria (Lin and Yen, 1999; Kullisaar et al. 2002; Wang 2009; Zanoni et al. 2008). Then, whereas no DPPH scavenging ability was detected in our strains, they could inhibit linolenic acid peroxidation and further experiments are needed to substantiate antioxidant activity.

3.7 Antagonistic activity

The results of antibacterial activity demonstrated that all strains exhibit zones of inhibition against Gram positive and Gram negative bacteria (Table 3). In general, *L. plantarum* strains showed greater inhibitory zones against the most of pathogens. *L. casei* strains showed better inhibition of *E. coli*, in comparison to others. *L. parabuchneri* strain had little inhibitory effect.

When supernatants were assayed, no inhibition was observed, even when non-neutralized supernatants were analyzed. The inhibitory activity was weak to be determined by agar spot test, so microtitre plate assay was performed (Maragkoudakis et al., 2006) using LCN 35 and LCN 39 supernatants and only supernatants at pH about 4.0 could inhibit all the pathogens tested (data not shown). Therefore, the inhibitory activity observed (at least for these two strains) could be explained by the production of organic acids evidenced when

indicator strains were exposed directly to the acid, as was the case with the microtitre plate assay. This situation had already been described by Maragkoudakis et al. (2006), who found that none of the supernatants of 29 lactobacilli strains, at pH 6.5 or 4.5, inhibited the growth of *E. coli*, *S. Typhimurium* and *Helicobacter pylori*, using either the spot-on-lawn or the well diffusion assay, and just when microtitre plate assay was done, supernatants at pH 4.5 and a control of MRS at pH 4.5 could inhibit the pathogens.

Lash et al. (2005) reported a bacteriocin from *L. plantarum* ATCC 8014 that was not detected in this work, supporting that bacteriocin production depends on culture and experimental conditions. It is widely known that lactic acid bacteria may exert a barrier effect *in vitro* and *in vivo* in intestinal microflora by preventing colonization of pathogenic microorganisms. The antagonistic activity of lactobacilli has been found to be very variable and being more strain specific concerning both pathogens and lactobacilli (Jacobsen et al. 1999). Antimicrobial metabolites include certain organic acids (lactic and acetic acid), hydrogen peroxide, ethanol, carbon dioxide, diacetyl, acetaldehyde, reuterin, acetoin, fatty acids, other low molecular mass compounds and bacteriocins (Adams and Nicolaidis, 1997; De Vuyst and Leroy, 2007; Holzapfel et al., 1995). Moreover, competitive exclusion for nutrients and adhesion sites and stimulation or modulation of immune responses reinforces the antimicrobial activity (Servin, 2004).

In a special manner, production of organic acids, the most important and best characterized antimicrobials from LAB, is interesting because the ability to adequate acidification of the intestine is a beneficial property derived from probiotic lactobacilli to create a hostile environment for pathogens.

4. Conclusion

The results of this work suggest that ripened cheeses elaborated with raw ewe's milk in the Southern Brazil are interesting sources for isolation of bacterial strains with differentiated functional traits. Notably, probiotic characteristics are very variable among strains, even those belonging to the same species, and none of strains possess all the desired properties. However, isolates that demonstrate the greatest number of biological and functional attributes together are *L. brevis* SM-B, with the better acid tolerance and remarkable antioxidant activity, and *L. plantarum* SM-I, the highest β -gal producer and displaying higher autoaggregation, hydrophobicity and acid tolerance properties. Further research must be carried out before proposing them as probiotics.

5. References

- Adams, M.R., Nicolaidis, L. 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control* 8, 227-230.
- Angelis, M.D., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R., Gobbetti, M., 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2011-2020.
- Annuk, H., Shchepetova, J., Kullisaar, T., Songisepp, E., Zilmer, M., Mikelsaar M., 2003. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology* 94, 403-412.
- Begley, M., Hill, C., Gahan, C.G.M., 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1729-1738.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. And Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25-30.
- Cebeci, A., Gürakan, C., 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology* 20, 511–518.
- Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology* 226, 1065–1073.
- Corcoran, B.M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3060-3067.
- Coton, M., Berthier, F.; Coton, E., 2008. Rapid identification of the three major species of dairy obligate heterofermenters *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus parabuchneri* by species-specific duplex PCR. *FEMS Microbiology Letters* 284, 150-157.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona D., 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 31, 438-442
- De Vuyst, L.; Leroy, F., 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13, 194-199.
- Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food (2002). London, Ontario, Canada, April 30 and May 1.

- Gobbetti, M., Morea, M., Baruzzi, F., Corbo, M.R., Matarante, A., Considine, T., Di Cagno, R., Guinee, T., Fox, P.F., 2002. Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. *International Dairy Journal* 12, 511-523.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 10, 139-157.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., Faria, J. A. F., 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 292-302.
- Guglielmotti, D. M., Marcó, M. B., Golowczyc, M., Reinheimer, J. A., Quiberoni, L. Q., 2007. Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal* 17, 916-925.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X., 2009. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology* 42, 1640-1646.
- Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U., 1995. Ecological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.
- Ibrahim, S. A., O'Sullivan, D. J., 2000. Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade β -galactosidase overproducing mutants of bifidobacteria, lactobacilli and *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science* 83, 923-930.
- Jacobsen, C., Rosenfeldt, N., Hayford, A., Møller, P., Michaelsen, K., Pærregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., 1999. 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 Environmental Microbiology* 65, 4949-4956.
- Karasová, P., Spiwok, V., Malá, Š., Králová, B., Russell, N.J., 2002. Beta-galactosidase activity in psychrotrophic microorganisms and their potential use in food industry. *Czech J. Food Sci.* 20, 43-47.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T. Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A., 2002. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 72, 215-224.

- Lash, B. W., Mysliwicz, T. H., Gourama, H., 2005. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology* 22, 199–204.
- Lin, M., Chang, F., 2000. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive Diseases and Sciences* 45, 1617–1622.
- Liong, M.T., Shah, N.P. 2005. Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *Food Research International* 38, 135–142.
- Lisboa, M. P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J. A. P., Brandelli, A., 2006. Characterization of a bacteriocin- like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International Microbiology* 9, 111-118.
- Majhenic, A. C., Lorberg, P. M., Rogelj, I., 2007. Characterisation of the *Lactobacillus* community in traditional Karst ewe's cheese. *International Journal of Dairy Technology* 60, 182-190.
- Maragkoudakis, P. A., Mountzouris K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D., Tsakalidou, E., 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology* 130, 219-226.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E., 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16, 189-199.
- Martins, F. S., Silva, A. A., Vieira, A. T., Barbosa, F. H. F., Arantes, R. M. E., Teixeira, M. M., Nicoli, J. R., 2009. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Arch Microbiology* 191, 623-630.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Shin, H. K., Holzappel, W. H., 2008. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology* 126, 57–64.
- Meira, S.M.M., Helfer, V.E., Velho, R.V., Medina, L.F.C., Brandelli, A. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. *Brazilian Journal of Food Technology III SSA*, 75-80.

- Minelli, E.B., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., Hendriks, H., Dellaglio, F., 2004. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal* 14, 723-736.
- Navidghasemizad, S., Hesari, J., Saris, P., Nahaei, M. R., 2009. Isolation of lactic acid bacteria from Lighvan cheese, a semihard cheese made from raw sheep milk in Iran. *International Journal of Dairy Technology* 62, 260-264.
- Nespolo, C. R., Brandelli, A., 2010. Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 1009-1018.
- Ortu, S., Felis, G.E., Marzotto, M., Deriu, A., Molicotti, P., Sechi, L.A., Dellaglio, F., Zanetti, S., 2007. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *International Dairy Journal* 17, 1312-1320.
- Pan, X., Chen, F., Wua, T., Tang, H., Zhao, Z., 2009. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control* 20, 598-602.
- Parvez, S., Malik, K.A., Kang, S. A., Kim, H.-Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1171-1185.
- Pinto, M. G. V., Franz, C. M. A. P., Schillinger, U., Holzapel, W. H., 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology* 109, 205-214.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P. K., 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal* 8, 993-1002.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M. J., Casquete, R., Serradilla, M. J., Córdoba, M. G., 2009. Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science* 83, 460-467.
- Sánchez, I., Seseña, S., Poveda, J. M., Cabezas, L., Palop, L., 2006. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology* 107, 265-273.
- Schillinger, U., Guigas, C., Holzapel, W. H., 2005. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal* 15, 1289-1297.

- Sengül, M., Cakmakci, S., 2003. Characterization of natural isolates of lactic acid bacteria from Erzincan (Savak) Tulum cheese. *Milchwissenschaft* 58, 510-513.
- Sengül, M., 2006. Microbiological characterization of Civil cheese, a traditional Turkish cheese: microbiological quality, isolation and identification of its indigenous lactobacilli. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22, 613-618.
- Servin, A. L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 405-440.
- Tamang, J. P., Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C., Holzapfel, W. H., 2009. Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. *International Journal of Food Microbiology* 135, 28-33.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Ustok, F. I., Tari, C., Harsa, S., 2010. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food Chemistry* 119, 1114-1120.
- Wang, A.N., Yi, X.W., Yu, H.F., Dong, B., Qiao, S.Y., 2009. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* *in vitro* and its antioxidative effect on growing-finishing pigs. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1140-1148.
- Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36, 895-904.
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A. Reinheimer, J., 2008. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1678-1688.
- Valerio, F., Bellis, P.D., Lonigro, S. L., Morelli, L., Visconti, A., Lavermicocca, P., 2006. In vitro and in vivo survival and transit tolerance of potentially probiotic strains carried by artichokes in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3042-3045.
- Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2008. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18, 714-728.
- Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y., Ahn, J., 2009. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology* 49, 434-442.

- Zanoni, S., Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Rossi, M., Matteuzzi, D., 2008. Growth kinetics on oligo- and polysaccharides and promising features of three antioxidative potential probiotic strains. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1266-1276.
- Zhang, Y., Du, R., Wang, L., Zhang, H. 2010. The antioxidative effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on the hyperlipidemic rats. *European Food Research Technology* 231, 151-158.

Table 1. Resistance to biological barriers for *Lactobacillus* strains isolated from cheese of Southern Brazil and for the reference strains (mean \pm standard deviation).

Strains	Initial population ^a	Resistance to gastric juice ^b		Resistance to intestinal juice ^c	
		pH 3	pH 2.5	Without bile salts	With 0.5% bile salts
<i>L. plantarum</i>					
SM-5	8.8 \pm 0.3	6.0 \pm 0.3	2.9 \pm 0.1	8.8 \pm 0.3	8.1 \pm 0.3
SM-C	8.6 \pm 0.1	7.9 \pm 0.8	4.9 \pm 0.6	8.2 \pm 0.3	7.7 \pm 0.7
SM-I	8.9 \pm 0.3	8.1 \pm 0.4	6.1 \pm 0.5	8.4 \pm 0.3	7.8 \pm 0.4
SM-M	8.9 \pm 0.2	7.9 \pm 0.5	5.6 \pm 0.8	8.3 \pm 0.2	8.3 \pm 0.2
SM-N	9.1 \pm 0.4	7.2 \pm 0.6	4.9 \pm 0.2	8.0 \pm 0.2	7.9 \pm 0.6
LCN 35	8.8 \pm 0.4	7.9 \pm 0.5	5.9 \pm 0.7	8.9 \pm 0.4	8.8 \pm 0.1
LCN 39	8.9 \pm 0.1	7.1 \pm 0.4	3.7 \pm 0.8	8.9 \pm 0.2	8.9 \pm 0.4
ATCC 8014	8.8 \pm 0.3	7.5 \pm 0.2	5.0 \pm 0.7	8.2 \pm 0.1	7.8 \pm 0.3
<i>L. brevis</i>					
SM-A	8.6 \pm 0.1	5.4 \pm 0.5	< 1.7	8.4 \pm 0.1	8.2 \pm 0.3
SM-B	8.9 \pm 0.3	8.6 \pm 0.1	6.6 \pm 0.2	8.6 \pm 0.1	8.5 \pm 0.2
<i>L. casei</i>					
SM-G	8.9 \pm 0.3	6.4 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	8.9 \pm 0.1	5.1 \pm 0.7
SM-H	8.5 \pm 0.1	4.9 \pm 0.5	2.8 \pm 0.7	8.3 \pm 0.2	7.6 \pm 0.4
<i>L. parabuchneri</i>					
SM-L	8.9 \pm 0.2	5.3 \pm 0.3	2.5 \pm 0.3	8.3 \pm 0.7	7.7 \pm 0.2
<i>L. fermentum</i>					
ATCC 9338	8.4 \pm 0.1	6.3 \pm 0.3	5.3 \pm 0.4	8.4 \pm 0.1	7.1 \pm 0.7

^aMeans of viable cell counts (log orders CFU/ ml) at the initial time of the treatments.

^bViable cell counts (log orders CFU/ml) after exposure to low pH (3 and 2.5) solutions during 3 h at 37°C.

^cViable cell counts (log orders CFU/ml) after exposure to pancreatin solutions (with and without 0.5% bile salts) during 4 h at 37°C.

Table 2 - *In vitro* adhesion properties of *Lactobacillus* strains isolated from cheese of Southern Brazil and for the reference strains (mean \pm standard deviation).

Strains	Autoaggregation (%)				Hydrophobicity (%)
	2 h	16 h	20 h	24 h	
<i>L. plantarum</i>					
SM-5	21.7 \pm 1.8	45.7 \pm 0.5	51.1 \pm 1.0	55.4 \pm 2.5	70.6 \pm 6.7
SM-C	19.9 \pm 1.0	65.1 \pm 1.2	68.7 \pm 10	72.6 \pm 2.1	75.4 \pm 7.1
SM-I	16.7 \pm 3.5	66.1 \pm 1.0	71.9 \pm 2.3	74.7 \pm 3.6	76.5 \pm 4.0
SM-M	18.1 \pm 8.1	55.2 \pm 6.3	59.4 \pm 5.7	66.6 \pm 5.0	60.1 \pm 4.1
SM-N	16.4 \pm 2.5	36.4 \pm 2.2	40.0 \pm 1.4	45.1 \pm 3.1	62.2 \pm 1.5
LCN 35	28.6 \pm 3.0	59.0 \pm 0.4	62.2 \pm 0.9	67.0 \pm 1.6	33.6 \pm 1.2
LCN 39	22.6 \pm 0.8	50.9 \pm 3.1	53.2 \pm 4.0	56.3 \pm 1.2	69.3 \pm 3.4
ATCC 8014	19.8 \pm 2.7	49.7 \pm 4.6	51.0 \pm 5.8	56.2 \pm 5.4	34.9 \pm 7.5
<i>L. brevis</i>					
SM-A	18.4 \pm 2.6	38.9 \pm 4.6	45.2 \pm 2.4	52.3 \pm 5.0	88.0 \pm 2.1
SM-B	14.7 \pm 4.3	37.8 \pm 1.8	41.9 \pm 2.8	43.9 \pm 3.2	34.6 \pm 2.7
<i>L. casei</i>					
SM-G	15.7 \pm 4.0	35.4 \pm 2.9	39.3 \pm 3.2	43.3 \pm 4.4	15.2 \pm 7.0
SM-H	32.2 \pm 3.9	70.1 \pm 2.1	75.2 \pm 1.7	79.8 \pm 2.6	51.7 \pm 3.3
<i>L. parabuchneri</i>					
SM-L	11.3 \pm 3.6	29.0 \pm 3.4	31.9 \pm 3.2	36.3 \pm 0.6	29.4 \pm 5.8
<i>L. fermentum</i>					
ATCC 9338	28.6 \pm 6.8	58.2 \pm 2.5	60.9 \pm 4.9	66.9 \pm 6.1	75.1 \pm 5.1

Table 3 – Antagonistic activity by colonies of *Lactobacillus* strains.

Strains	Zone of inhibition (mm)				
	<i>Listeria</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Salmonella</i>
	<i>monocytogenes</i>	<i>cereus</i>	<i>aureus</i>	<i>coli</i>	Typhimurium
	ATCC 7644	ATCC 14579	ATCC 1901	ATCC 8739	ATCC 14078
<i>L. plantarum</i>					
SM-5	16.4±1.9	15.5±0.7	13.5±2.0	13.3±1.5	12.7±2.0
SM-C	14.4±0.5	13.3±2.4	12.4±1.4	11.7±1.5	15.3±1.3
SM-I	16.6±1.0	14.7±2.3	13.7±1.9	8.4±2.0	12.4±1.8
SM-M	16.2±1.9	17.1±2.0	14.0±2.0	9.0±1.7	12.9±2.0
SM-N	16.9±0.8	19.3±1.5	14.5±1.8	9.8±1.8	15.3±1.4
LCN 35	16.7±1.2	13.0±0.8	20.0±1.4	11.0±1.0	13.1±1.0
LCN 39	18.3±1.5	15.5±0.9	18.7±0.5	12.7±0.6	12.5±0.8
ATCC 8014	15.8±1.7	14.2±1.8	14.4±1.6	12.4±2	14.3±2.0
<i>L. brevis</i>					
SM-A	13.2±2.1	9.7±2.0	13.5±0.7	12±1.4	12.2±1.8
SM-B	14.0±1.9	13.6±1.9	13.9±1.2	11.2±1.7	17.3±1.3
<i>L. casei</i>					
SM-G	13.3±2.0	12.9±1.9	14.3±1.4	15.3±2.1	11.6±1.1
SM-H	11.4±2.0	10.5±2.2	13.3±0.5	13.7±2.2	11.1±2.0
<i>L. parabuchneri</i>					
SM-L	10±1.0	5.5±0.7	8.5±2.1	6±0.5	5.7±1.0
<i>L. fermentum</i>					
ATCC 9338	13.2±2.2	14.7±1.1	11.4±1.6	11.6±1.2	10.6±1.9

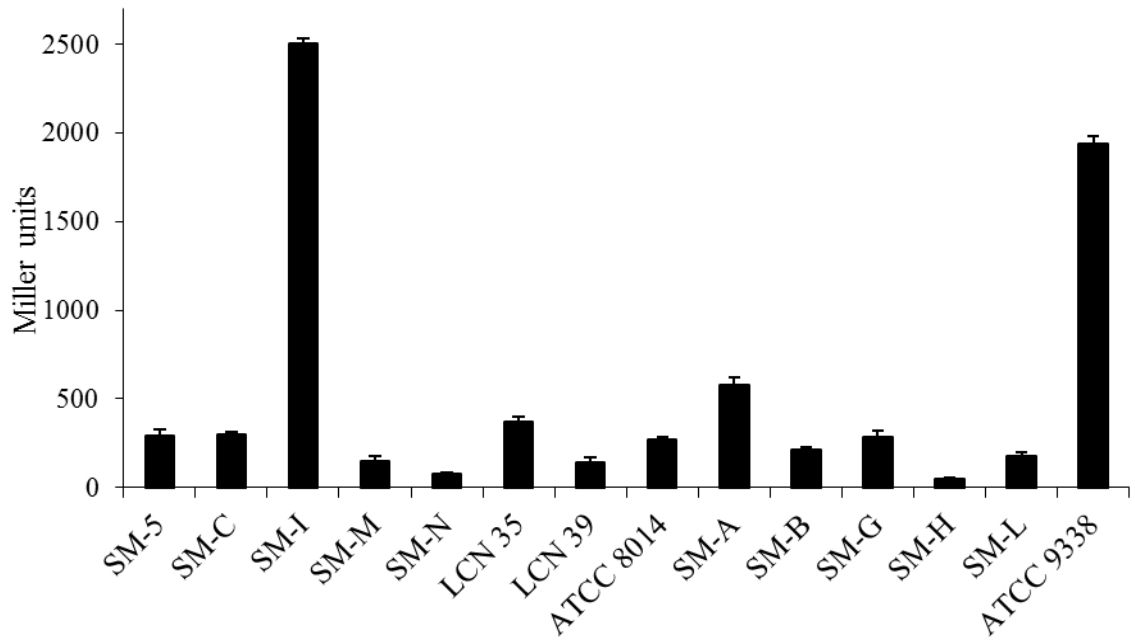


Fig 1. β -gal activity of lactobacilli isolated from ovine milk cheese and reference strains. Values are the means of three independent determinations \pm s.e.m.

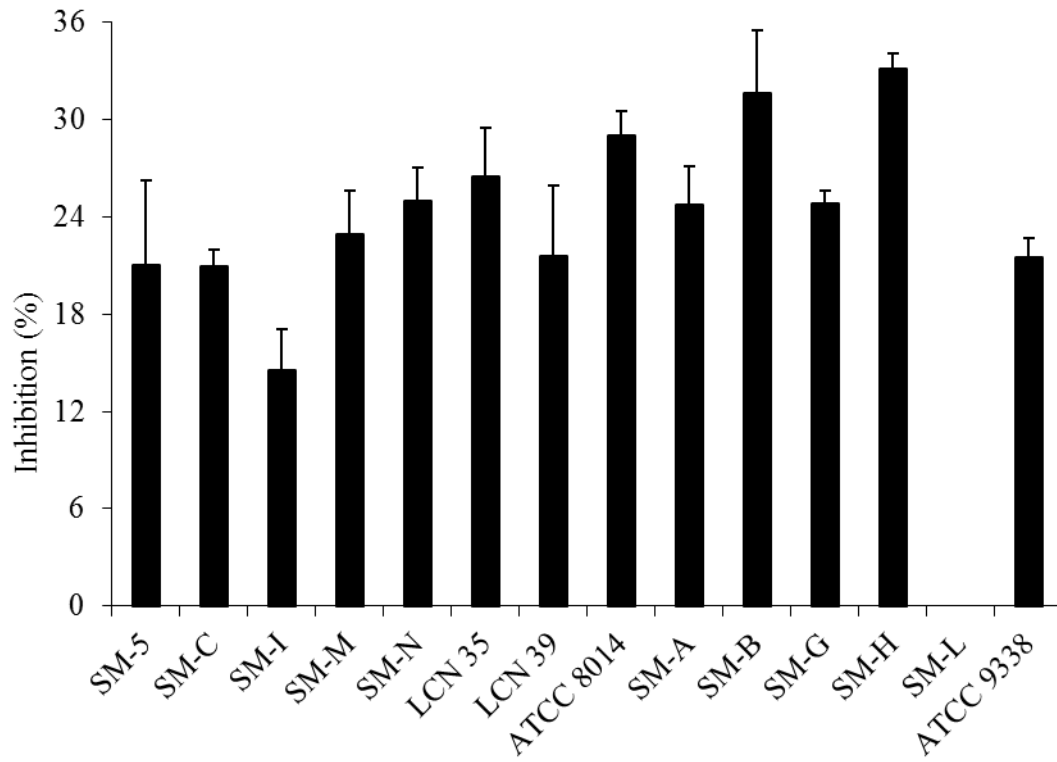


Fig 2. Inhibition of linolenic acid peroxidation by *Lactobacillus* strains. Values are the means of three independent determinations \pm s.e.m.

3.3 Bioactivities in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay

Stela Maris Meister Meira^a, Virginia Etges Helfer^a, Daniel Joner Daroit^a, Ana Paula Folmer Corrêa^a, Silvana Carro^b and Adriano Brandelli^{a,*}

^a Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, Brasil.

^bDepartamento de Ciencia y Tecnología de La Leche, Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.

* Corresponding author: ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brasil; fax +5551 3308 7048; e-mail: abrand@ufrgs.br

Abstract

Water soluble extracts of ewe's ripened cheeses produced in Rio Grande do Sul and Santa Catarina States (Brazil), and in Uruguay were evaluated with respect to biological activities *in vitro*. The varieties were Feta-type, Roquefort-type and Pecorino-type from Brazil and samples of Uruguay. Antioxidant properties of scavenging of the cation radical of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) and iron chelating activity were quite variable among water soluble extracts of the samples, whereas power reduction and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) analysis presented similarity for the major of the cheeses. The scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical was exhibited only for water soluble extract of Roquefort. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE) was elevated, in contrast to antibacterial activity that was not found for any sample under experimental conditions. Results suggest that these cheeses are sources of bioactive peptides with diverse modes of action. The protein pattern of water soluble extract corresponding to Roquefort was visualized by SDS-PAGE for being the sample that displayed the best bioactivities.

Key words: ovine cheeses, bioactive peptides, antioxidant activity, antihypertensive activity, antimicrobial activity

1. Introduction

Milk contains lysozyme, lactoferrin, immunoglobulins, hormones, cytokines and growth factors secreted in their active form by the mammary gland and exerting bioactivities (Schanbacher et al., 1997). Besides nutritional, physicochemical and sensory aspects, milk proteins received a renewed interest related to their physiological role in human organism and are currently the main source of a range of biologically active peptides (Gobbetti et al., 2004). Such peptides possess many activities, such as antithrombotic, hypocholesterolemic, antioxidant, antihypertensive, opioid, antimicrobial and immunoregulatory. Most of these peptides are encrypted within the primary structure of the native protein and may be released during gastrointestinal transit or during food processing (Silva and Malcata, 2005; Korhonen and Pihlanto, 2006).

Cheeses contain high amount of protein and may serve as natural source of milk protein-derived peptides, because of the diversity of the proteolytic systems in cheese ripening and the intensity of proteolysis during ripening (Park et al., 2007). Enzymes present in milk (plasmin), from rennet (pepsin or chymosin), or released by microorganisms, hydrolyze casein (α_{s1} -, α_{s2} -, β - and κ -caseins) and can enrich cheeses with bioactive peptides (Ong and Shah, 2008). In water-soluble extracts of a 8-month aged Manchego cheese, the most popular cheese variety in Spain and manufactured from sheep milk, 22 (Gómez-Ruiz et al., 2002) and 75 (Gómez-Ruiz et al., 2004) peptides with angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity were identified. Antibacterial peptides were obtained in water soluble extracts of Pecorino Romano, another cheese made from ovine milk (Rizello et al., 2005), whereas raw and sterilized ovine and caprine cheese-like systems, manufactured with proteases from *Cynara cardunculus*, were showed to be a source of peptides with ACE-inhibitory and antioxidant activities (Silva et al., 2006).

Also in dairy products derived from sheep milk, Papadimitriou et al. (2007) described peptides with ACE-inhibitory activity, most of them derived from β -casein, in water-soluble extracts of two sets of traditional Greek yoghurt. Moreover, peptides with antimicrobial and ACE-inhibitory activities were investigated in sodium caseinates prepared from sheep milk hydrolyzed by a partially purified proteinase of *Lactobacillus helveticus* PR4 (Minervini et al., 2003), while ovine casein hydrolyzed by pepsin, trypsin and chymotrypsin exerted antioxidant activity, especially peptides obtained ovine κ -casein (Goméz-Ruiz et al., 2008).

There are differences in physicochemical characteristics between goat, sheep and cow milks, meanwhile sequences of milk proteins among the different species have great

homology and it would be predictable that the peptides reported as bioactive agents and released from bovine proteins are also within sheep and goat proteins (Park et al., 2007). On the other hand, rapidly evolving genes that are proposed to have a common precursor, and posttranslational modifications, are related with a considerable variation in the primary sequences of the α_{s1} -, α_{s2} - and β -caseins across species (Ginger and Grigor, 1999; Minervini et al., 2003). So, high genetic variability in milk proteins among species suggests a great possibility to release bioactive peptides with various structures and functions (Benkerroum, 2010). In this sense, the aim of this study was to evaluate the antioxidative, antimicrobial and ACE-inhibitory properties of water-soluble extracts (WSE) of different types of ovine cheeses produced in Brazil and Uruguay markets.

2. Material and methods

2.1 Cheese samples

This study analysed twelve samples of ovine cheeses commercialized in Southern Brazil and Uruguay, differing mainly for starter, technological aspects and time of ripening (Table 1). The production of the ewe's cheese is recent in Brazil and located in the Southernmost regions – Santa Catarina and Rio Grande do Sul States, for climatic and geographic reasons (Nespolo and Brandelli, 2010). Two manufacturers of Rio Grande do Sul State (RS – A and B) produce different varieties of cheeses, Feta-type, Pecorino Toscano-type (180 and 270 days of ripening from different batches) and Roquefort-type. A sample of Pecorino Toscano-type made from raw ovine milk and with 60 days of ripened is not marketed. Another type of Pecorino cheese is commercialized by a manufacturer located in Santa Catarina State (SC). In Uruguay, cheese samples were collected from an experimental unit of Universidad de la Republica (A – three samples of the same type) and from a local market (B – two samples of the same type) with different days of ripening from independent batches.

2.2 Water-soluble extracts

Water-soluble extracts (WSE) of cheeses were prepared according to Rizzello et al. (2005). Briefly, 30 g of cheese was suspended in 90 mL of a 50 mM phosphate buffer pH 7.0, homogenized and kept at 40°C for 1 h under gentle stirring (150 rpm). After centrifugation, the upper fat layer was discarded and the water extract was filtered through Whatman no. 2 paper. The pH of the extract was adjusted to 4.6 using 1 M HCl. The precipitated casein was

recovered by centrifugation and the water-soluble extracts were lyophilized and kept at -18 °C until further analysis. Protein determination was carried out by suspending 50 mg of lyophilized sample per mL of water, according to the method of Lowry et al. (1951). The concentration of samples was 15 mg of lyophilized sample per mL of water for ABTS scavenging activity, reducing power and ACE-inhibitory activity, while for other determinations 50 mg/mL was used.

2.3 Scavenging activity of ABTS radical

The scavenging activity against the ABTS radical [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] was determined by the decolorization assay described by Re et al.(1999). The ABTS radical cation (ABTS^{•+}) solution was prepared by reacting 5 mL of ABTS solution (7 mM) with 88 µL of K₂SO₄ solution (140 mM) and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 12-16 h before use. For the assay, the ABTS^{•+} solution was diluted with 5 mM phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) to an absorbance of 0.7 (±0.02) at 743 nm. A 10 µL of sample was mixed with 1 mL of diluted ABTS^{•+} solution and absorbance (734 nm) was measured after 10 min. The percentage of inhibition at the specific time was calculated, and a standard curve employing 0.1 to 2.0 mM of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was performed. The results were expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).

2.4 Scavenging activity of DPPH radical

To assess the DPPH radical-scavenging activity of WSE, the method of Brand-Williams et al. (1995) was used. Briefly, an aliquot of 0.1 mL of samples was transferred to test tubes with 3.9 mL of freshly prepared 60 µM DPPH methanolic solution. After 45 min, the scavenging activity was measured spectrophotometrically by the decrease in absorbance at 517 nm. Likewise, blank value was determined by using distilled water. The results were expressed as: Scavenging rate (%) = $[1 - (A/A_0)] \times 100$, where A is the absorbance of the test and A₀ is the absorbance of the blank.

2.5 Reducing power

The reducing power of WSE was assessed according to the method of Duh et al. (1999). Samples in phosphate buffer (2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) were added to 2.5 mL of 1% potassium ferricyanide and the mixture was incubated at 50 °C for 20 min. TCA (2.5 mL, 10%) was added to the mixture, which was then centrifuged at 3000 g for 10 min. The supernatant (2.5

mL) was mixed with 2.5 mL distilled water and, after addition of 0.1% ferric chloride (0.5 mL), the absorbance was measured at 700 nm. Higher absorbances of the reaction mixture indicate greater reducing powers. BHT at the same concentration of samples was used as a positive control.

2.6 Iron(II) chelating activity assay

The ferrous ion chelating ability of WSE was determined according to Tang et al. (2002) with slight modifications. A volume of 1 mL of sample was mixed with 3.7 mL of distilled water, 0.1 mL of 2 mM FeSO₄ (Fe²⁺) and 0.2 mL of 5 mM ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine). After 10 min, the absorbance of the reaction mixture was read at 562 nm. Likewise, 1 mL of distilled water, instead of sample, was used as a control. EDTA (20 mg/mL) was used as standard. Chelating activity was calculated as follows: Chelating activity (%) = [1-(Absorbance of sample/Absorbance of control)] × 100.

2.7 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

The levels of TBARS, a measure of lipid peroxidation, were performed according to the methodology of Ohkawa et al. (1979). First, 100 µL of distilled water and 200µL of extra virgin olive oil were incubated for 10 min at 80 °C with 100 µM ferrous sulfate to induce oxidation. Sample was added (200 µL) with sodium lauryl sulfate solution (8.1%), acetic acid buffer (pH 3.4) and thiobarbituric acid solution (0.6%). The mixture was further incubated in a water bath at 80 °C for 1 hour. This acid-catalyzed nucleophilic-addition reaction yields a pinkish-red chromogen with an absorbance maximum at 532 nm. Results were expressed as percentage of inhibition based on the maximum oxidation value obtained when distilled water are added instead of sample.

2.8 Determination of ACE-inhibitory activity

The ACE inhibitory activity was measured in vitro by the method of Cushman and Cheung (1971) with some modifications. Samples of 20 µL were added to 200 µL of buffered substrate solution (5 mM hippuryl-histidyl-leucine in 50 mM HEPES-HCl buffer containing 300 mM NaCl, pH 8.3, 37 °C). The reaction was started by addition of 40 µL of ACE (0.1 U/mL, Sigma), carried out at 37 °C for 30 min, and was finished with 150 µL of 1 M HCl. Then, the hippuric acid released was extracted with 1 mL of ethyl acetate and organic phase was transferred to a glass tube to be heat-evaporated. The residue was dissolved with 800 µL of distilled water and measured spectrophotometrically at 228 nm. The ACE-inhibitory

activity (ACEI) was expressed as percentage using the formula: % Inhibitory Activity = $(A-B)/(A-C) \times 100$, where A is the absorbance without WSE, B is the absorbance without ACE and C is absorbance in the presence of both ACE and the WSE.

2.9 Antibacterial activity

Indicator microorganisms used to test WSE antibacterial activity were *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. A concentration of 10^8 UFC/mL of bacteria in saline solution (0.85%) was inoculated with a swab onto BHI agar plates and then aliquots of 15 μ L of samples were spotted (Motta and Brandelli, 2002). Plates were incubated at 37 °C for 24 h to verify possible inhibition zones.

2.10 Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

The molecular weight profile of WSE from Roquefort cheese was visualized by SDS-PAGE, performed in 16% resolving gels and 4% stacking gels as described by Laemmli (1970). After electrophoresis, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, and then destained. Approximate molecular masses in the WSE were determined by comparing with molecular weight standards (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen, USA).

3. Results and discussion

Ripened-type cheeses contain numerous peptides originated mainly from casein as a result of proteolysis (Ong et al., 2007). Proteolysis is affected by several factors including pH of the curd, plasmin, chymosin, proteases from starter and non-starter bacteria, salt-to-moisture ratio, storage time and temperatures, and humidity (Park and Jin, 1998). In this respect, different varieties of cheeses are likely to exhibit compounds with variable bioactivities. Therefore, to analyze peptides with biological activities (antioxidant, antihypertensive and antimicrobial) in ovine cheeses from Brazil and Uruguay, WSE were prepared. This fraction, besides peptides, also contains amino acids, mineral salts, organic acids, vitamins, lactose, and volatile compounds (Taborda et al., 2003). These substances differ among WSE of cheeses made in the same conditions but from milk of distinct species, proving to be interesting the study of bioactive peptides from ovine cheeses, which are poorly investigated so far.

Proteolysis in cheeses begin by coagulant activity retained in the curd and by plasmin (or other indigenous proteolytic enzymes) to a range of large and intermediate-sized peptides from caseins, which were then hydrolysed by proteinases and peptidases from starter or non-specific lactic bacteria, and finally secondary microbiota to shorter peptides and amino acids (Gupta et al., 2009). With this respect, soluble protein content of the cheese extracts were determined and values were between 6.5 mg/mL to 16.2 mg/mL, respectively for Feta from Brazilian manufacture A and for cheese with 80 days of ripening from Uruguayan manufacture B (Table 1). For the same variety of cheeses, it is expected that protein content increases with the time of cheese ripening, which occurred for Pecorino Toscano samples and for cheeses from Uruguayan manufacture B. Samples from Uruguayan manufacture A showed a reverse behavior since 160 d-old cheese displayed 11.9 mg/mL versus 16.0 mg/mL of soluble protein from 80 d-old cheese, which can be explained by variations in the different batches of production.

Oxidative reactions in the body are related to cellular damage and are associated with chronic diseases when any excessive amounts of reactive radicals are physiologically produced. In foodstuffs, lipid peroxidation negatively impacts flavor, texture, nutritive value and shelf life, and even produces toxins (Pihlanto, 2006; Dong et al., 2010; Sarmadi and Ismail, 2010). Peptides with antioxidant activity may be released from caseins and the antioxidative mechanisms involve metal-chelating, hydrogen/electron donating activity or inhibition of lipid peroxidation (Sarmadi and Ismail, 2010; Vastag et al., 2010). Thus, antioxidative properties of WSE of ewe's cheeses were evaluated by different methods – radical scavenging activity, reducing power, metal chelating ability and TBARS. These results are presented in Table 2.

ABTS radical scavenging activity of WSE denotes quite different values among cheeses, expressed both in percentage of inhibition and TEAC. Two Feta cheeses demonstrated the minor values of scavenging activities, while 270 d-old Pecorino Toscano, 120 d-old cheese from manufacture B (Uruguay) and Roquefort were the stronger ones. Cheeses manufactured from raw and sterilized ovine and caprine milk coagulated with enzymes from the plant *Cynara cardunculus* presented peptides with antioxidant activity in water-soluble extracts after fractionation by tandem chromatographic techniques (Silva et al., 2006). When DPPH scavenging assay was performed, just Roquefort could decrease the absorbance at a significant level when compared to control, with a percentage of scavenging rate of 22.81 ± 0.09 (mean of quadruplicate determination \pm standard deviation).

These results demonstrate different scavenging patterns for DPPH and ABTS radicals. The water-soluble pre-formed radical monocation of ABTS is generated by oxidation of ABTS with potassium persulphate and could be reduced in the presence of hydrogen-donating and of chain breaking antioxidants, while DPPH is an oil soluble free radical that accepts an electron or hydrogen to become a stable diamagnetic molecule (Zhu et al., 2008a; Phanturat et al., 2010). So, DPPH is predissolved in methanol and may not readily diffuse to target peptides that are in aqueous solution, whereas ABTS could readily reach peptides in the aqueous solution assay. Also, samples were employed in a higher concentration in DPPH assay, suggesting the ABTS scavenging as more sensible and appropriate method for measurement of antioxidant activity of water-soluble proteins and peptides in an aqueous solution. Thus, the different stoichiometry of reactions between target compounds in the extracts and radicals, stereoselectivity of radicals, solubility of the extracts in these distinct testing systems and different amino acids and peptide sequences could explain the capacity of cheese WSE to react and quench DPPH and ABTS radicals (Zhu et al., 2008b). Meanwhile, Gupta et al. (2009) showed that both DPPH and ABTS scavenging activities in WSE of Cheddar cheeses were dependent on proteolysis to a certain extent (the highest antioxidant activity during fourth month of ripening) and on the type of starter culture used.

Reducing power assay is based on reduction of Fe^{3+} from the ferricyanide complex to the ferrous form (Fe^{2+}), which involves one electron transfer, changing yellow color of the test solution to a green or blue color. The majority of WSEs reducing power ranged from 0.2 to 0.3 units of absorbance at 700 nm, suggesting they are source of protons and electrons to maintain such redox potential at a concentration of 15 mg/mL. Values out of this range were obtained for cheeses from Brazilian manufacturer A, with the lowest value for Feta (0.131) and the greatest reducing power for Roquefort (0.428). BHT exhibited a much higher absorbance of 1.578 at the same concentration of that employed for WSEs.

Iron (II) chelating ability revealed much distinct values for cheese samples. The Pecorino cheese varieties showed the best performance. WSE from Pecorino SC was able to chelate 50.73% of iron, and the chelating ability of 180 and 270 d-old Pecorino Toscano cheeses were 55.14% and 32.09%, respectively. Metal chelating activities can involve aromatic and hydrophobic amino acids and great amounts of histidine, the latter due to the presence of an imidazole ring (Pownall et al., 2010). Phosphoserine residues contain a polar and anionic domain that is favorable, in high concentration, for sequestering cationic metal ions, as described for caseinophosphopeptides (Kitts, 2005; Pihlanto, 2006). The positive control, EDTA, at the same concentration of samples (50 mg/mL) could chelate almost all

available iron (99.81%). Another types of cheeses, such as Feta, Roquefort and Pecorino Toscano with 60 days of ripening, demonstrated insignificant levels of metal binding.

Lipid peroxidation was measured by TBARS employing an olive oil model. Its percentage of inhibition was closer among WSE samples, between 38.49 and 51.84, except for Feta from manufacture B that demonstrated 25.95% of inhibition. In this assay, decomposition of the unstable peroxides derived from fatty acids results in the formation of malondialdehyde (MDA), resulting in a pink chromogen at low pH, following its reaction with thiobarbituric acid (Pihlanto, 2006). Transition metals as Fe^{2+} are well-known stimuli of lipid peroxidation and it was used to start oxidation of olive oil. Hence, the chelating ability of iron could be related with TBARS method, but WSE with no ability to chelate Fe^{2+} also showed potential to inhibit olive oil peroxidation.

In a special manner, Roquefort demonstrated the higher reducing power and the unique sample able to quench DPPH, suggesting the presence of high content of hydrophobic amino acids residues, since low polarity is important for these two properties. The highest ABTS scavenging activity as well as high percentage of lipid peroxidation inhibition as measured by TBARS, were achieved; however, poor metal chelating ability was observed for this variety. In general, correlations between results obtained for the different methods employed for antioxidant activity is difficult, indicating that WSE has a wide variety of peptides with different modes of action for inhibiting lipid oxidation. In this context, the amino acid composition and sequence, size, amount and configuration of peptides (exposure of the terminal amino groups) and concentration of free amino acids appeared to collectively contribute to the antioxidant activity (Zhu et al., 2008a; Phanturat et al., 2010), reinforcing the importance of evaluating this property by different methods (Gómez-Ruiz et al., 2008).

Antihypertensive properties of samples were estimated *in vitro* by inhibition of ACE activity. This enzyme raises blood pressure by converting angiotensin I, an inactive decapeptide, to the potent vasoconstrictor octapeptide angiotensin II, as well as inactivating bradykinin, a vasodilating nonapeptide (Pihlanto-Leppälä et al., 1998). Since hypertension has high prevalence and plays role in cardiovascular diseases, ACE-inhibitory peptides have been extensively studied and have been described in several types of cheeses (Meisel, 1997; Smacchi and Gobetti, 1998; Saito et al., 2000; Gómez-Ruiz et al., 2002; Gómez-Ruiz et al., 2006; Pripp et al. 2006; Silva et al., 2006; Ong et al. 2007; Bütikofer et al., 2008; Tonouchi et al., 2008; Lignitto et al., 2010). In this study, results depicted a common behavior of ACE-inhibitory activity among cheeses (Fig. 1). Regardless of differences of manufacturing and time of ripening, percentage of ACE-inhibition was elevated, means above 62%, for the most

samples of cheeses. Many studies related ACE-inhibitory activity to increased proteolysis, but only to a certain level. In this regard, Feta from manufacturer A – RS, showed the minor value of enzyme inhibitory activity (46.45%), which might be probably associated with the fact that this a fresh cheese. However, even if proteolysis was mild (lower protein content; Table 1), bioactive peptides with both ACE-inhibitory and antioxidant activities were liberated, as in the case of ripened Feta cheese from manufacturer B – RS. When analyzing cheeses from the same variety with different times of ripening (Pecorino Toscano and Uruguayan cheeses), ACE inhibition was not correlated with degree of proteolysis, but it was observed for ABTS scavenging activity, that denoted correlation with time of ripening. It is important to note that cheeses belong from different batches and this could explain the absence of correlation among different methods of antioxidant activity evaluation.

Bütikofer et al. (2008) reported that cheese made from raw milk showed greater ACE-inhibition than that from pasteurized milk. In the current study, two cheeses made from raw ovine milk (Pecorino Toscano – 60 d and Roquefort) were analyzed, showing high ACE-inhibition, but comparable to other ones. The latest authors also report wide variations in the concentrations of Val-Pro-Pro (VPP) and Ile-Pro-Pro (IPP), antihypertensive peptides present in commercial available fermented milks, within samples of Swiss cheeses of the same age from the same variety, underlying the fact that other factors besides ripening exerted influences. Milk pretreatment, cultures, scalding conditions, and ripening times were identified as important key factors. Thereafter, Meyer et al. (2009) observed large variations among Swiss cheese varieties as well as the individual loaves of the same variety.

None of the WSE from cheeses made with sheep milk could exert antibacterial activity against indicator strains at the experimental conditions employed. Rizello et al. (2005) found antimicrobial peptides in water-soluble extracts of different Italian cheese varieties, among them Pecorino Romano, but not in other cheeses made with sheep milk, Fossa and Canestrato Pugliese. However, the WSE of these cheeses were previously fractionated by reversed-phase fast protein liquid chromatography and the antimicrobial activity of each fraction was first assayed toward *Lactobacillus sakei* A15 by well-diffusion assay. These peptides showed activity against gram-positive and gram-negative bacteria.

The WSE of Roquefort cheese displayed, in general, the best antioxidant and antihypertensive properties. Related results for this variety were reported, demonstrating high DPPH radical scavenging and moderate ACE-inhibitory activities (Apostolidis et al., 2007). Nevertheless, the water extract preparation differed from the current study, and these activities were also attributed to fungal phenolics produced by *Penicillium* species.

Therefore, Roquefort WSE was selected to be submitted to a 16% SDS-PAGE for visualization of proteins and peptides separated according to relative molecular mass. Fig. 2 shows a major intensity band with a molecular weight (MW) about 12 kDa, followed by proteins with apparent MW of 10 kDa, 70 kDa and 80 kDa. Other four bands with poor intensity appeared between MW of 20 and 40 kDa. SDS-PAGE has been used widely to study casein hydrolysis and the type of proteolysis in cheeses (Park and Jin, 1998). It is predictable that proteins or peptides with MW below 10 kDa (not detectable in resolution range of this gel) are presented in the sample, due to intensity of proteolysis associated with this variety of cheese, evidenced by its soluble protein content of 13.2 mg/mL (Table 1) at a concentration of 50 mg of lyophilized WSE/mL of water. For example, some studies reported that low molecular peptides have stronger antioxidant activity (Zhu et al. 2008a; Dong et al. 2010). Thus, identification of peptides responsible for bioactivities encompassed in this cheese variety is under investigation.

4. Conclusion

Ewe's cheeses from Brazil and Uruguay, with different manufacturing conditions and distinct times of ripening, showed antioxidant and ACE-inhibitory activities when WSE preparations were assayed. Result suggest that these cheeses are sources of bioactive peptides with diverse modes of action. Further studies are now in progress to identify the peptides responsible for the jointly bioactivities observed in Roquefort cheese, aiming to elucidate structure-activity relationships of the peptides present in WSE of this variety.

5. References

- Apostolidis, E., Kwon, Y.-I., & Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 46–54.
- Benkerroum, N. (2010). Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 320-338.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. And Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant Activity. *Food Science and Technology - Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B., & Wechsler, D. (2008). Occurrence of the Angiotensin-Converting Enzyme–Inhibiting Tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in Different Cheese Varieties of Swiss Origin. *Journal of Dairy Science*, 91, 29–38.
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637–1648.
- Duh, P-D., Tu, Y-Y., & Yen, G-C. (1999). Antioxidant Activity of Water Extract of Harg Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32, 269-277.
- Ginger, M. R., & Grigor., M. R. (1999). Comparative aspects of milk caseins. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124, 133–145.
- Gobbetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 173-188.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M., & Recio, I. (2002). Angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12, 697–706.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1054, 269–277.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Tabora, G., Amigo, L., Ramos, M. (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 223, 595–601.
- Gómez-Ruiz, J. A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., & Recio, I. (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, 227, 1061-1067.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R. & Sangwan, R. B. (2009). Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 339-347.

- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309–1323.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.
- Laemmi F.G. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. F., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Meisel H., Goepfert A., & Gunther S. (1997). ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft*, 52, 307–311.
- Meyer, J., Bütikofer, U., Walther, B., Wechsler, D., Sieber, R. (2009). Hot Topic: Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides val-pro-pro and Ile-pro-pro during ripening of different Swiss cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 92, 826–836.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., & Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5297-5305.
- Motta, A. S., & Brandelli, A. (2002). Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 63-70.
- Ong, L., & Shah, N. P. (2008a). Release and identification of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 41, 1555–1566.
- Ong, L., Henriksson, A., & Shah, N. P. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Lait*, 87, 149–165.
- Ohkawa, H., Ohishi, H., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Papadimitriou, C. G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S. V., Gomes, A-M., Malcata, F. X., & Alichanidis, E. (2007). Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 105, 647–656.

- Park, Y.W., & Jin, Y.K. (1998). Proteolytic patterns of Caciotta and Monterey Jack hard goat milk cheeses as evaluated by SDS–PAGE and densitometric analyses. *Small Ruminant Research*, 28, 263–272.
- Park, Y. W.; Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88–113.
- Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Roytrakul, S. (2010). Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 86–97.
- Pihlanto-Leppälä, A.; Rokka, T.; & Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8, 325–331.
- Pihlanto, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. (2006). *International Dairy Journal*, 16, 1306–1314.
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4712–4718.
- Pripp, A. H., Sorensen, R., Stepaniak, L., & Sørhaug, T. (2006). Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 39, 677–683.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Panala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1998). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231 – 1237.
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88, 2348–2360.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (2000) Isolation and Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That Exist Naturally in Gouda Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434–1440.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31, 1949-1956.
- Schanbacher, F. L., Talhouk, R. S., & Murray, F.A. (1997). Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Production Science*, 50, 105-123.
- Silva, S. V. F., & Malcata, X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1–15.

- Silva, S. V., Pihlanto, A., & Malcata, F. X. (2006). Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy Science*, *89*, 3336-3344.
- Smacchi E., & Gobetti M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, *22*, 687–694.
- Taborda, G., Molina, E., Martiánez-Castro, I., Ramos, M., & Amigo, L. (2003). Composition of the Water-Soluble Fraction of Different Cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 270-276.
- Tang, S. Z., Kerry, J. P., Sheehan, D., & Buckley, D. J. (2002). Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. *Food Chemistry*, *76*, 45–51.
- Tonouchi, H., Suzuki, M., Uchida, M., & Oda, M. (2008). Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese. *Journal of Dairy Research*, *75*, 284–290.
- Vaštag, Z., Popovic, L., Popovic, S., Petrovic, L., Pericin, D. (2010). Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity in the water-soluble protein extract from Petrovac Sausage (Petrovská Kolbása). *Food Control*, *21*, 1298–1302.
- Zhu, L., Chen, J., Tang, X. & Xiong, Y. L. (2008a). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 2714–2721.
- Zhu, Y. P., Fan, J. F., Cheng, Y. Q., & Li, L. T. (2008b). Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control*, *19*, 654-661.

Table 1. Main characteristics of the ovine cheese varieties from Southern Brazil and Uruguay.

Cheese makers	Variety	Cheese milk	Starter	Rennet	Cooking	Ripening	Protein Content of WSE (mg/mL)
A – RS, Brazil	Feta-type	Pasteurized	Freeze-dried	Calf, liquid	40°C	None	6.5 ± 0.1
	Pecorino Toscano-type	Raw	None	Calf, liquid	40°C	60 d	15.0±0.1
		Pasteurized	Freeze-dried	Calf, liquid	40°C	180 d 270 d	10.8±0.2 12.8±0.1
B – RS, Brazil	Feta-type	Pasteurized	Freeze-dried	Microbial chymosin	31-33°C	60 d	10.3±0.3
	Roquefort-type	Raw	Freeze-dried	Microbial chymosin	31-33°C	90 d	13.2±0.2
SC, Brazil	Pecorino-type	Pasteurized	Freeze-dried	Calf, liquid or powder	39-42°C	30 d	10.1±0.4
A – Uruguay	-	Pasteurized	Freeze-dried	Microbial chymosin	40°C	80 d	16.0±0.2
						120 d	15.6±0.1
						160 d	11.9±0.1
B – Uruguay	-	-	-	-	-	90 d	12.7±0.2
						120 d	16.2±0.1

Table 2. Antioxidant properties of WSE obtained from ovine cheeses.

Cheese Samples	ABTS		Reducing power (Abs 700 nm)	Chelating activity (%)	TBARS (%)
	Scavenging rate (%)	TEAC (mM Trolox)			
A – RS, Brazil					
Feta	32.71±1.8	0.74±0.04	0.247	7.14±1.5	40.50±5.1
Pecorino Toscano					
60 d	67.21±0.1	1.55±0.02	0.261	0	38.49±4.3
180 d	56.55±1.4	1.30±0.03	0.202	55.14±1.3	49.09±1.9
270 d	79.36±0.3	1.83±0.01	0.221	32.09±1.5	47.21±3.7
B – RS, Brazil					
Feta	45.15±0.6	1.03±0.04	0.131	5.36±2.4	25.95±1.2
Roquefort	87.46±0.2	2.02±0.01	0.428	3.82±1.8	50.78±3.5
SC, Brazil					
Pecorino	59.71±0.4	1.37±0.01	0.296	50.73±7.1	39.72±5.2
A – Uruguay					
80 d	67.71±3.2	1.56±0.03	0.225	20.68±1.1	51.84±1.2
120 d	67.86±0.6	1.56±0.02	0.221	29.18±0.5	49.17±3.9
160 d	58.71±2.0	1.35±0.05	0.283	29.41±3.7	41.22±4.9
B – Uruguay					
90 d	74.96±1.6	1.73±0.04	0.214	25.0±3.2	50.74±1.1
120 d	81.90±0.5	1.89±0.01	0.306	19.04±0.3	47.28±2.9

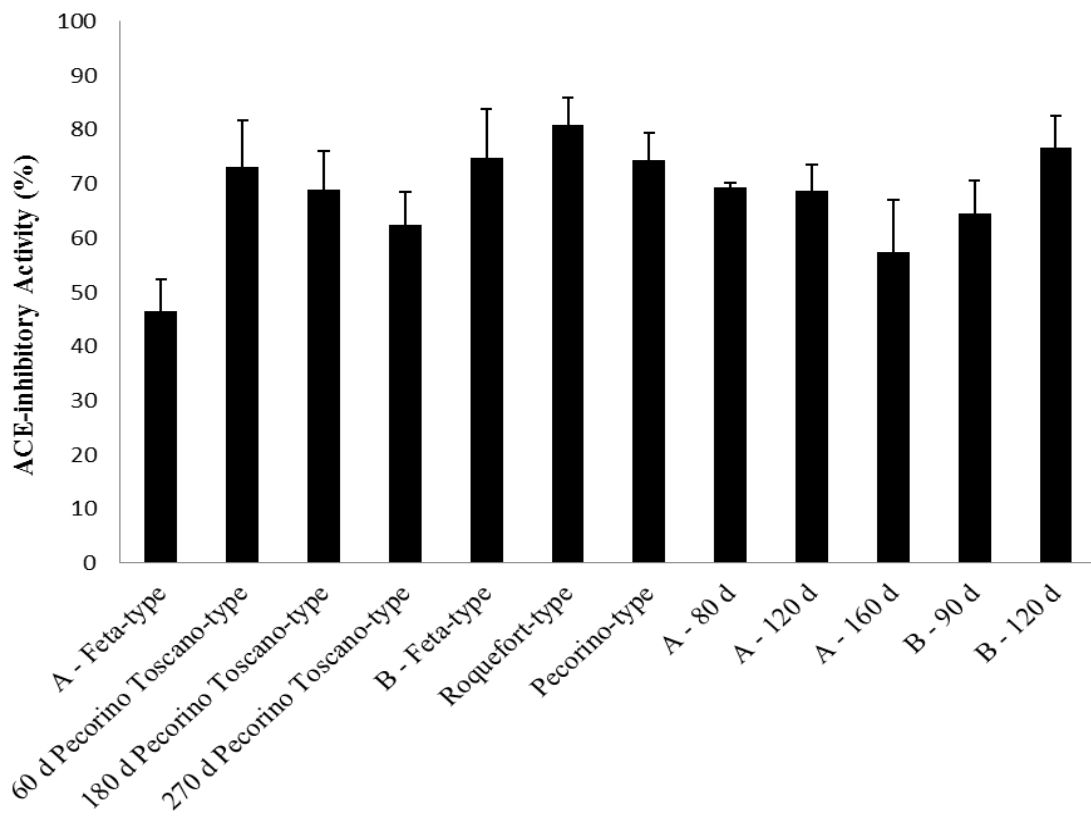


Fig 1. ACE inhibitory activity expressed in percentage for all samples. Cheeses are displayed in order of manufactures A and B of Rio Grande do Sul, from Santa Catarina and from Uruguay manufactures A and B. Values are the means of three independent determinations \pm s.e.m.

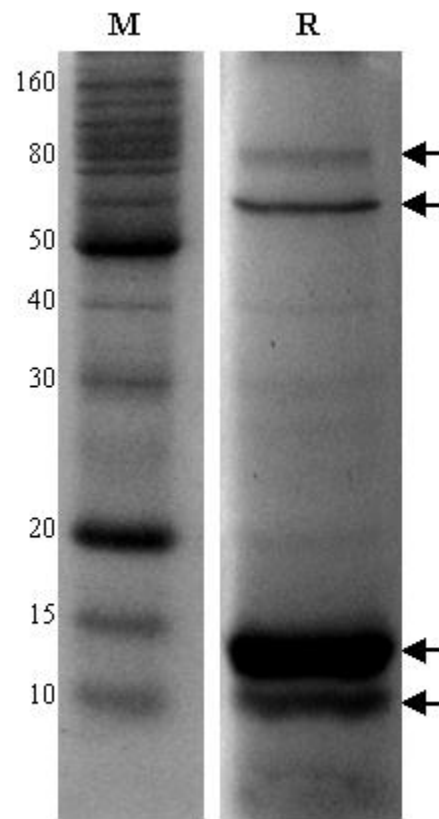


Fig. 2. SDS-PAGE profile of WSE of Roquefort. Lanes: M, molecular weight standards; R, sample of Roquefort cheese WSE.

4 CONCLUSÕES

Bactérias lácticas apresentam grande potencial de aplicação na indústria de alimentos e, recentemente, propriedades de promoção à saúde têm sido a elas atribuídas. A seleção de linhagens com este potencial, denominadas probióticas, a partir de nichos ainda não investigados, como leite e queijo de ovelha, foi o foco da presente pesquisa. Os isolados de *Lactobacillus*, a partir destas fontes alimentares, apresentaram interessantes características funcionais, tais como moderada tolerância *in vitro* a condições adversas presentes do trato gastrointestinal humano (acidez estomacal, pepsina, pancreatina, sais biliares e fenol). Há possibilidade de incremento da resistência a estas condições quando da aplicação das bactérias incorporadas a um alimento, devido ao efeito protetor exercido pela matriz alimentar. Além disso, análises relacionadas à capacidade de adesão, atividades antimicrobiana e antioxidante e produção da enzima β -galactosidase de 12 *Lactobacillus* evidenciaram diferenças entre as linhagens, resultando em interessantes perspectivas para o trabalho. De forma geral, os testes *in vitro* foram válidos para apontar duas linhagens como potenciais candidatas a aplicações probióticas, *L. brevis* SM-B and *L. plantarum* SM-I, necessitando a continuidade de pesquisas para substanciar os resultados iniciais obtidos.

Peptídeos bioativos originados de proteínas lácteas estão entre os mais estudados, principalmente oriundos de caseínas bovinas. Neste trabalho, queijos de ovelha maturados apresentaram habilidades de sequestro de radicais, atividade quelante de ferro, poder redutor, inibição da peroxidação lipídica medida por TBARS e atividade anti-hipertensiva pela inibição da ECA nos extratos aquosos das variedades em diferentes períodos de maturação, possivelmente pela liberação de peptídeos bioativos das caseínas presentes no leite ovino devido à proteólise durante o processamento e maturação dos queijos. A variedade do tipo Roquefort demonstrou atividades antioxidantes e anti-hipertensiva com maior intensidade em comparação aos demais e, desta forma, a pesquisa das sequências peptídicas responsáveis por estas bioatividades estão em curso.

5 PERSPECTIVAS

As perspectivas de novos estudos estão baseadas nos resultados deste trabalho e na possibilidade de aprofundamento em alguns temas:

- Melhor investigação do potencial probiótico das linhagens LCN 56, SM-B e SM-I, como critérios de segurança (resistência a antibióticos) e adesão *in vitro* a células Caco-2, para posteriormente realizar ensaios *in vivo*;
- Comprovação da atividade antioxidante das bactérias pela análise de extratos livres de células e ensaios *ex vivo* e *in vivo*;
- Otimização da produção da enzima β -galactosidase pelas linhagens altamente produtoras e avaliação, em paralelo, da possibilidade de produção de galacto-oligossacarídeos;
- Avaliação *in vitro* de assimilação de colesterol pelos lactobacilos;
- Identificação dos peptídeos responsáveis pelas atividades anti-hipertensiva e antioxidante dos queijos de ovelha.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.R., NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, v. 8, p. 227-230, 1997.

ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 403-412, 2003.

ARASOVÁP., SPIWOK V., MALÁ Š., KRÁLOVÁ B., RUSSELL N.J. Beta-galactosidase activity in psychrotrophic microorganisms and their potential use in food industry. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 20, p. 43–47, 2002.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.119-126, 2003.

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

BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, 63, 320-338, 2010.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho de 2008. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>

BERTAZZONI MINELLI, E.; BENINI, A.; MARZOTTO, M.; SBARBATI, A.; RUZZENENTE, O.; FERRARIO, R.; HENDRIKS, H.; DELLAGLIO, F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 723–736, 2004.

BORCHERS, A. T.; SELMI, C.; MEYER, F. J.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Probiotics and immunity. **Journal Gastroenterology**, v. 44, p. 26–46, 2009.

BRITO, M. A.; GONZÁLEZ, F. D.; RIBEIRO, L. A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P. R.; BERGMANN, G. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.942-948, 2006.

BROADBENT, J. R. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2 ed, p. 243-299. New York: Marcel Decker, 2001.

CARROLL, I. M.; ANDRUS J. M.; BRUNO-BÁRCENA, J. M.; KLAENHAMMER, T. R.; HASSAN, H. M.; THREADGILL, D. S. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v.293, p. G729–G738, 2007.

CLARE, D. A.; SWAISGOOD, H. E. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p.1187–1195, 2000.

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

CHOI; S.S.; KIM, Y.; HAN, K.S.; YOU, S.; OH, S.; KIM, S.H. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 452–458, 2006.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN S. *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. **Food Research International**, v. 40, p. 629–636, 2007.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1065–1073, 2008.

CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3060-3067, 2005.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n.11, p. 2804 –2816, 1998.

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

DEEGAN, L. H.; COTTERA, P. D.; HILL, C.; ROSS, PAUL. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v.16, p. 1058–1071, 2006.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, GP.; 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**, v. 38, suppl. 2, p. S248–S255, 2006.

DONG, X.-P.; ZHUINFFLA B.-W.; ZHAO, H.-X.; ZHOU, D.-Y.; WU, H.-T.; YANG, J.-F.; LI, D.-M.; MURATA, Y. Preparation and in vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from oyster (*Crassostrea talienwhannensis*) meat **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 978–984, 2010.

- EMBRAPA. (2008). EMBRAPA GADO DE LEITE. Estatísticas. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/>>. Acesso em 10 de novembro de 2010.
- FAO/WHO. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina. <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html>
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Meeting Report, London Ontario, Canada. <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/index.ht>
- FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A.; WALSH, D. J. Hypotensive peptides from milk proteins. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 980S-988S, 2004.
- GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C. G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, 2004.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.
- GÓMEZ-RUIZ, J. A.; TABORDA, G.; AMIGO, L.; RECIO, I.; RAMOS, M. Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. **European Food Research Technology**, v. 223, p- 595–601, 2006.
- GÓMEZ-RUIZ, J. A.; LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; PIHLANTO, A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 1061-1067, 2008.
- GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 292-302, 2010.
- GRANGETTE, C.; NUTTEN, S.; PALUMBO, E.; MORATH, S.; HERMANN, C.; DEWULF, J.; POT, B.; HARTUNG, T.; HOLS, P.; MERCENIER, A. Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. **PNAS**, v. 102, n. 29, p.10321–10326, 2005.
- HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **European Food Resesearch and Technology**, v. 227, p.7-15., 2008.
- HERNÁNDEZ, D.; CARDELL, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 77–84, 2005.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; MIRALLES, B.; AMIGO, L.; RAMOS, M.; RECIO, I. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p.1041–1048, 2005a.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; VALOS, A. D.; BARTOLOMEÄ, B.; AMIGO, L. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 588-593, 2005b.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; RECIO, I.; BARTOLOMEÄ, B. ACE-Inhibitory and Radical-Scavenging Activity of Peptides Derived from β -Lactoglobulin f(19-25). Interactions with Ascorbic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3392-3397, 2007.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Ecological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 343-362, 1995.

HONDA, H.; KATAOKA, F.; NAGAOKA, S.; KAWAI, Y.; KITAZAWA, H.; ITOH, H.; KIMURA, K.; TAKETOMO, N.; YAMAZAKI, Y.; TATENO, Y.; SAITO, T. β -Galactosidase, phospho- β -galactosidase and phospho- β -glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 461–466, 2007.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 253– 260, 2004.

HUGENHOLTZ, J. The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 466–475, 2008.

IQBAL, S.; NGUYEN, T-H.; NGUYEN, T. T.; MAISCHBERGER, T.; HALTRICH, D. β -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 1408–1416, 2010.

ISOLAURI, E.; KIRJAVAINEN, P.V.; SALMINEN, S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? **Gut**, v. 50, p. 54-59, 2002.

JAY, J.M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. New York: Springer, 2005.

JÄRVENPÄÄ, S.; TAHVONEN, R. L.; OUWEHAND, A. C.; SANDELL, M.; JÄRVENPÄÄ, E.; SALMINEN, S. A Probiotic, *Lactobacillus fermentum* ME-3, Has Antioxidative Capacity in Soft Cheese Spreads with Different Fats. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 3171–3177, 2007.

KIMOTO-NIRA, HIROMI; SUZUKI, CHISE; KOBAYASHI, MIHO; SASAKI, KEISUKE; MIZUMACHI, KOKO. Inhibition of leukotriene B4 production in murine macrophages by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 321–324, 2009.

KITTS, D.D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, 1309–1323, 2003.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-45, 1993.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945–960, 2006.

KUDOH, Y.; MATSUDA, S.; IGOSHI, K.; OKI, T. Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. **Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi**, 48, 44–55, 2001.

KÜHN, H.; O'DONNELL; V. B. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. **Progress in Lipid Research**, v. 45, p. 334–356, 2006.

KULLISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEM, T.; ANNUK, H.; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p. 215– 224, 2002.

KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; MIKELSAAR, M.; ZILMER, K.; VIHALEM, T.; ZILMER, M. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 90, p. 449–456, 2003.

LIGNITTO, L.; CAVATORTA, V.; BALZAN, S.; GABAI, G.; GALAVERNA, G., NOVELLI, E. SFORZO, S.; SEGATO, S. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevato cheese. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 11–17, 2010.

LIN, M-Y.; CHANG, F-J. Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive Diseases and Sciences**, V. 45, N. 8, p. 1617–1622, 2000.

LIN, W.-H.; HWANG, C.-F.; CHEN, L.-W.; TSEN, H.-Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.

LIONG, M.T.; SHAH, N.P. Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. **Food Research International**, v. 38, p. 135–142, 2005.

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal Bacteriology**, v. 189, p. 1199–1208, 2007.

MAMONE, G.; PICARIELLO, G.; CAIRA, S.; ADDEO, F.; FERRANTI, P. Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7130–7142, 2009.

MAPA. (2005). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Estatísticas. Rebanho ovino brasileiro - efetivo por estado. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 de novembro de 2009.

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**, v. 16, p. 189–199, 2006.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.

MÉNARD, S.; CANDALH, C.; BAMBOU, J. C.; TERPEND, K.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN, M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. **Gut**, n.53, p. 821–828, 2004.

MEYER, J.; BÜTIKOFER, U.; WALTHER, B.; WECHSLER, D.; SIEBER, R. Hot Topic: Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides val-pro-pro and Ile-pro-pro during ripening of different Swiss cheese varieties. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 826–836, 2009.

MIDDLETON, M. K.; RUBINSTEIN, T.; PURE, E. Cellular and Molecular Mechanisms of the Selective Regulation of IL-12 Production by 12/15-Lipoxygenase. **The Journal of Immunology**, p. 265-274, 2005.

MINERVINI, F.; ALGARON, F.; RIZZELLO, C. G.; FOX, P. F.; MONNET, V.; GOBETTI, M. Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5297–5305, 2003.

MÖLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, p. 171–182, 2008.

MUÑOZ-PROVENCIO, D.; LLOPIS, M.; ANTOLÍN, M.; TORRES, I.; GUARNER, F.; PÉREZ-MARTÍNEZ, G.; MONEDERO, V. Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 153–161, 2009.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 1, p. 13–126, 1999.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S. et al. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 70, n. 2, p. 113-128, 1996.

NIELSEN, M. S.; MARTINUSSEN, T.; FLAMBARD, B.; SØRENSEN, K. I.; OTTE, J. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 155–165, 2009.

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

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

PARK, Y.W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 88–113, 2007.

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**, v. 100, p. 1171–1185, 2006.

PFISTER, S. L.; SPITZBARTH, N.; NITHIPATIKOM, K.; EDGEMOND, W. S.; FALCK, J. R.; CAMPBELL, W. B. Identification of the 11,14,15- and 11,12,15-Trihydroxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-derived Relaxing Factors of Rabbit Aorta. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 47, p. 30879–30887, 1998.

PHANTURAT, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; ROYTRAKUL, S. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 86–97, 2010.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, N. M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 643–654, 2009.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1306–1314, 2006.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; Rokka, T.; Korhonen, H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 325–331, 1998.

PRIDMORE, R. D.; PITSET, A-C.; PRAPLAN, F.; CAVADINI, C. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC533 and its role in anti-*Salmonella* activity. **FEMS Microbiol Letters**, n. 283, p. 210–215, 2008.

PRIPP, A. H.; SØRENSEN, R.; STEPANIAK, L.; SØRHAUG, T. Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. **LWT**, v. 39, p. 677–683, 2006.

RIBEIRO, L. C.; PÉREZ, J. R. O.; CARVALHO, P. H. A.; SILVA, F. F.; MUNIZ, J. A.; JÚNIOR, G. M. O.; SOUZA, N. V. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.438-444, 2007.

RIVAL, S. G.; BOERIU, C. G.; WICHERS, H. J. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 295-302, 2001.

ROBINSON, R.K. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products. **Suid Afrikaanse Tydskrif Vir Suiwelkunde**, v. 19, p. 25-27, 1987.

ROCHAT, T.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.; GRATADOUX, J.-J.; FOURAGE, C.; HOEBLER, C.; CORTIER, G.; LANGELLA, P. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 22, p. 1-10, 2007.

ROHENKOHL, J. E.; CORRÊA, G. F.; AZAMBUJA, D. F.; FERREIRA, F. R. O Agronegócio de leite de ovinos e caprinos. Disponível em: <www.pucrs.br/eventos/eeg/trabalhos/62.doc>. Acesso em: 07 jan. 2011.

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

ROSS, R. P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1410–1417, 2005.

SAIDET, J. A. O.; GILLILAND, S. E. Antioxidative Activity of Lactobacilli Measured by Oxygen Radical Absorbance Capacity. **Journal Dairy Science**, v. 88, p. 1352–1357, 2005.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium: A way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1284–1289, 2007.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, 31, p. 1949-1956, 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**, v. 15, p. 1289–1297, 2005.

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

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 405–440, 2004.

SIEBER, R.; BÜTIKOFER, U.; EGGER, C.; PORTMANN, R.; WALTHER, B.; WECHSLER, D. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. **Dairy Science Technology**, v. 90, p. 47–73, 2010.

SILVA, S. V. F.; MALCATA, X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1–15, 2005.

SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. B.; DIMITROV, Z. H. P. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 692–701, 2009.

SINGH, V.; SINGH, K.; AMDEKAR, S.; SINGH, D. D.; TRIPATHI, P.; SHARMA, G. L.; YADAV, H. Innate and specific gut-associated immunity and microbial interference. **FEMS Immunology Med Microbiology**, v. 55, p. 6–12, 2009.

SONGISEPP, E.; KULLISAAR, T.; HÜTT, P.; ELIAS, P.; BRILENE, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. A New Probiotic Cheese with Antioxidative and Antimicrobial Activity. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 2017–2023, 2004.

SONGISEPP, E.; KALS, J.; KULLISAAR, T.; MÄNDAR, R.; HÜTT, P.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. **Nutrition Journal**, v. 4, n.22, p. 1-10, 2005.

SOUZA, A. C. K. O.; OSÓRIO, M. T. M.; OSÓRIO, J. C. S.; OLIVEIRA, N. M.; VAZ, C. M. S.; SOUZA, M.; CORRÊA, G. F. Produção, Composição Química e Características Físicas do Leite de Ovinos da Raça Corriedale. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11, n. 1, p. 73-77, jan-mar, 2005.

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

TERAHARA, M.; NISHIDE, S.; KANEKO, T. Preventive Effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the oxidation LDL. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 64, n. 9, p. 1868-1873, 2000.

TERAHARA, M.; KURAMA, S.; TAKEMOTO, N. Prevention by Lactic Acid Bacteria of the Oxidation of Human LDL. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 64, n. 8, p. 1864-1868, 2001.

TORRUCO-UCO, J. G.; DOMÍNGUEZ-MAGAÑA, M. A.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 6, n. 2, p. 158-168, 2008.

TSAI, Y-T.; CHENG, P-C.; FAN, C-K.; PAN, T-M. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 219–225, 2008.

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

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

VIRTANEN, T.; PIHLANTO, A.; AKKANEN, S.; KORHONEN H. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 106–115, 2007.

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

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

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

WANG, Y-C.; YU, R-C.; CHOU, C-C. Antioxidative activities of soymilkfermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 23, p. 128–135, 2006.

WILSON, A. R.; SIGEE, D.; EPTON, H. A. S. Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1516–1522, 2005.

WITTWER, J.; HERSBERGER, M. The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 67–77, 2007.

XUE,Z.; YU, W.; LIU, Z.; WU, M.; KOU, X.; WANG, J. Preparation and Antioxidative Properties of a Rapeseed (*Brassica napus*) Protein Hydrolysate and Three Peptide Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5287–5293, 2009.

ZHANG, L., LI, J., & ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**, v.101, p. 2084-2089, 2010.

ZHU,L.; CHEN, J.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of in Vitro Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 56, p. 2714–2721, 2008.