ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUANTO À RESISTÊNCIA AO PH ÁCIDO E PRESENÇA DE SAIS BILIARES DE CEPAS PROBIÓTICAS DE LEITES FERMENTADOS COMERCIAIS

Isolation, identification and characterization for resistance to acid pH and presence of bile salts of probiotic strains from commercial fermented milks

Diala URNAU[1]
Andréia CIROLINI[2]
Nelcindo Nascimento TERRA[3]
Carlos Pasqualin CAVALHEIRO[4]
Liana Inês Guidolin MILANI[5]
Leadir Lucy Martins FRIES[6]

SUMÁRIO

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar cepas de *Lactobacillus* e Bifidobactérias a partir de leites fermentados comerciais e analisar sua resistência ao pH ácido e sais biliares. Os microrganismos foram isolados de leites fermentados comerciais através da técnica 'spread-plate' em meio seletivo MRS suplementado com neomicina, paromomicina, ácido nalidíxico e cloreto de lítio. Posteriormente, as cepas foram caracterizadas conforme a coloração de Gram e a prova da catalase. Foi possível identificar através do kit comercial Api 20A os microrganismos *Actinomyces israelli, Actinomyces haeslundii, Lactobacillus acidophilus/ jensenii* e *Bifidobacterium spp* 2 e através do kit comercial Api 50CHL Medium foi possível identificar os microrganismos *Lactococcus lactis ssp lactis* 2 e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1. Foram realizados testes de resistência em pH de 3,0; 2,5 e 2,0 durante 3 e 6 horas e resistência aos sais biliares na concentração de 0,3%. Ambas as cepas foram resistentes ao pH de 3,0 durante 3 horas e 6 horas e aos sais biliares.

Termos para indexação: Bifidobactérias, *Lactobacillus*, probiótico, leites fermentados, isolamento.

1 INTRODUÇÃO

Diversos produtos lácteos com características probióticas, como queijos e sobremesas lácteas, estão disponíveis no mercado. Porém, produtos lácteos fermentados com bactérias ácido-láticas como o iogurte, são importantes carreadores de probióticos (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001). O uso de *Bifidobacterium* spp e/ou *Lactobacillus acidophilus* neste tipo de produto tornou-se popular no final da década de 70, como resultado dos avanços científicos na área de taxonomia e ecologia das bifidobactérias (GOMES & MALCATA, 1999).

1 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Brasil. dialaurnau@gmail.com.
2 Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Brasil. deiacirolini@yahoo.com.br.
3 Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Brasil. nelcindo@terra.com.br.
4 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Brasil. cavalheiro.carlos@hotmail.com.
5 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Brasil. lianamilani@yahoo.com.br.
6 Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Brasil. lucymicro@yahoo.com.br.

Recebido/ Received: 15/08/2011
Aprovado / Approved: 14/09/2011

Probióticos são microrganismos não patogênicos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, exercem algum benefício em quem os consome (FAO/WHO, 2006), pois promovem balanço da flora microbiana intestinal, sendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* as espécies mais utilizadas (FULLER, 1989). Esses efeitos estão direta e exclusivamente relacionados ao tipo da cepa utilizada (AGOSTINI *et al.*, 2004).

Para ser aplicada como probiótico, a bactéria precisa ter identificação internacionalmente conhecida (espécie e subespécie da cepa); resistir à acidez gástrica e à ação dos sais biliares; possuir efeitos benéficos ao hospedeiro demonstrados *in vivo* e *in vitro* por meio de uma dose conhecida; ter capacidade de adesão ao muco ou epitélio intestinal; apresentar segurança comprovada e possuir garantia da manutenção da viabilidade até o momento do consumo, seja na forma de cápsula, pó ou quando adicionada a produtos alimentícios (PINEIRO & STANTON, 2007; ZUCOTTI *et al.*, 2008).

Para garantir um efeito contínuo, os probióticos devem ser ingeridos diariamente. Efeitos benéficos na composição da microbiota intestinal foram observados com doses de 100 g de produto alimentício contendo 10^6 a 10^7 UFC g^{-1}, geralmente com a administração durante 15 dias (BLANCHETTE *et al.,* 1996; JELEN & LUTZ, 1998). Outros autores também sugerem níveis acima de 10^7 UFC por grama ou mililitros do produto para serem garantidos efeitos funcionais fisiológicos (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000). A legislação brasileira preconiza que a contagem de bactérias probióticas viáveis deve ser entre 10^8 e 10^9, mas contagens menores podem ser empregadas se comprovado o seu benefício (BRASIL, 2008).

O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar cepas probióticas de leites fermentados comerciais, bem como testar sua capacidade quanto à viabilidade probiótica e resistência ao pH ácido e sais biliares.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Método de Isolamento

Foram coletadas amostras de cinco diferentes leites fermentados comerciais, em triplicata. Para as bifidobactérias, 1 mL da amostra foi dissolvida em 9 mL de água peptonada tamponada (Oxoid, Madrid, Spain) e a partir desta, foram obtidas 10 diluições em série. As amostras foram semeadas em meio seletivo, MRS suplementado com neomicina, paromomicina, ácido nalidíxico e cloreto de lítio conforme ROY (2001), através da técnica 'spread-plate'. Todas as placas foram incubadas anaerobicamente a 37°C, por 72 horas. Subsequentemente, 14 colônias isoladas foram repicadas e purificadas em caldo MRS contendo HCl-cisteína (SYKES & SKINNER (1973). Cepas individuais foram confirmadas através da coloração de Gram, prova da catalase e identificadas pelo kit Api 20 A (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France).

Os *Lactobacillus* também foram isolados a partir de cinco diferentes leites fermentados, em ágar MRS pela técnica de semeadura em profundidade (SHAH *et al*., 1995). As placas permaneceram em estufa bacteriológica na temperatura de 37ºC, por 48 horas. Após período de incubação, a partir de cada amostra foram selecionadas e isoladas duas colônias (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1992). Posteriormente, cepas individuais foram confirmadas através da coloração de Gram, prova da catalase e identificadas pelo kit Api 50 CHL Medium (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France).

Tolerância ao pH ácido

Após o crescimento em caldo MRS a 37ºC por 24 horas, as colônias foram semeadas em de caldo MRS, ajustado ao pH de 2,0; 2,5 e 3,0 com HCl 3M. Após, foram incubadas por três e seis horas a 37ºC. Então foram feitas análises com células diluídas em tampão fosfato (0,1M e pH 6,2) visando neutralizar o ácido (HYRONIMUS *et al.*, 2000). Esta é uma técnica relativamente simples de simulação do trato digestivo quando comparada a outras técnicas que levam em consideração a uma acidificação gradual sob agitação (MARTEAU *et al.,* 1997; BLANQUET *et al.*, 2004).

Tolerância aos sais biliares

Para avaliar a tolerância à bile, as cepas das bactérias foram reativadas em caldo MRS e após 1 mL da última cultura (concentração superior a 9 UFC mL^{-1}) foi utilizado para inocular tubos com 9 mL de caldo MRS, adicionado de 0,3% de sais biliares e incubados por 4 horas a 37ºC. A tolerância a bile pelas cepas foi verificada em placas com ágar MRS depois da incubação em estufa por 48 horas a 37ºC (GILLILAND, STALEY & BUSH, 1984; VINDEROLA & REINHEIMER, 2003).

Análise Estatística

Os resultados da resistência ao pH foram analisados através da ANOVA e aplicado o teste de Tukey com 5% de probabilidade através do software estatístico SPSS 17.0 (Chicago, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar do número limitado de amostras de leites fermentados comerciais, estas foram sufi-

cientes para atingir o objetivo do trabalho de isolar e caracterizar as cepas probióticas presentes neste tipo de produto lácteo.

Todas as amostras de leites fermentados apresentaram contagens superiores a 10^7 UFC mL^{-1}, ou seja, todos os produtos analisados possuíam microrganismos viáveis. A viabilidade de cepas probióticas é considerada importante a fim de assegurar sua ótima funcionalidade. Após a ingestão, estas bactérias devem superar duas barreiras biológicas principais, o ambiente ácido do estômago e a secreção de bile no duodeno (LANKAPUTHRA & SHAH, 1995). GRAND, KÜFFER & BAUMGARTNER (2003) também realizaram contagens em leites fermentados e todos continham mais de 10^6 UFC g^{-1} de bifidobactérias. A Tabela 1 apresenta o resultado da coloração de Gram, da prova da catalase e dos kits utilizados para identificação.

Foi possível isolar uma maior quantidade de cepas de *Bifidobacterium spp 2* e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1, sendo então estas selecionadas para os testes de resistência ao pH ácido e sais biliares.

Para atingir o intestino e garantir sua funcionalidade, as bactérias probióticas devem possuir uma ou mais características, como resistência ao suco gástrico, à bile e às condições de processamento a que o alimento é submetido (MATILLA-SANDHOLM *et al.,* 2003). O pH do suco gástrico secretado no estômago é 0,9, porém a presença do alimento eleva o pH local para valores entre 2,5 e 3,5 (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002). Após a ingestão do alimento, o tempo para que o estômago esvazie é de 2 a 4 horas (GOLDIN & GORBACH, 1992).

Com a contagem inicial de 9,07 log UFC mL^{-1}, o *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 apresentou contagens inferiores a 10^6 UFC mL^{-1} em pH 2,0 (Tabela 2). Nas primeiras 3 horas de exposição, a contagem decresceu 37,93% e após 6 horas diminuiu 58,21%, passando a contagem final para 3,79 log UFC mL^{-1}. Segundo LIN *et al.* (2006), bactérias ácido lácticas são significativamente afetadas pela acidez. Células viáveis decresceram de 14,33 a 33,30% após 3 e 6 horas de incubação, respectivamente, em pH 2,5. Em pH 3,0, apresentou decréscimos menores que 11,35%.

Observa-se também que a cepa de *Bifidobacterium spp 2* (Tabela 2) apresentou contagem inicial de 9,40 log UFC mL^{-1}, perdeu sua viabilidade probiótica após exposição de 6 horas em pH de 2,0 e 2,5, apresentando redução da população inicial de 60,96% e 55,53%, respectivamente. No entanto, quando submetida ao pH 3,0 manteve contagens superiores a 10^6 UFC mL^{-1}, concordando com os resultados encontrados por ERKKILÃ & PETÃJÃ (2000) para cepas de

Tabela 1 – Identificação e número de Bifidobactérias e Lactobacilos encontrados nos leites fermentados, bem como suas características à coloração de Gram e catalase.

Cepas identificadas		Nº cepas	Gram	Catalase
Bifidobactérias*	*Actinomyces israelli*	**02**	+	-
	Actinomyces naeslundii	**01**	+	-
	Lactobacillus acidophilus/jensenii	**01**	+	-
	Bifidobacterium spp 2	**10**	+	-
Lactobacilos**	*Lactococcus lactis spp lactis 2*	**02**	+	-
	Lactobacillus paracasei spp paracasei 1	**08**	+	-

* Identificação através do kit Api 20 A (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France);

** Identificação através do kit Api 50 CHL Medium (Bio Merieux AS, Marcy L'Etoile, France).

Tabela 2 – Contagem de *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* e *Bifidobacterium* em Log UFC.ml^{-1} após exposição ao pH 2,0; 2,5; e 3,0 em meio MRS acidificado com HCl 3M, durante 3 e 6 horas.

Cepa	Horas	Contagem Inicial	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0
Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1	3	$9,07^{d}$	$5,63^{a}$	$7,77^{b}$	$8,59^{c}$
	6	$9,07^{d}$	$3,79^{a}$	$6,05^{b}$	$8,04^{c}$
Bifidobacterium spp 2	3	$9,40^{d}$	$6,64^{a}$	$7,68^{b}$	$8,04^{c}$
	3	$9,40^{d}$	$3,67^{a}$	$4,18^{b}$	$7,88^{c}$

Pediococcus acidilactici, *Lactobacillus curvatus* e *Pediococcus pentosaceus*.

A bile pode promover a morte de microrganismos, impedindo sua implantação no trato intestinal. Por isso, um microrganismo probiótico deve resistir à ação da bile para atingir porções distais do intestino e colonizá-lo (GIBSON & FULLER, 2000). A Tabela 3 mostra que as cepas analisadas apresentaram resistência aos sais biliares, onde cada uma diminuiu apenas um ciclo logaritmo após a exposição de 4 horas aos sais biliares na concentração de 0,3%, permanecendo com viabilidade probiótica. Segundo KLINGBERG *et al.* (2005), a cepa de *Lactobacillus paracasei* não sobreviveu ao pH 2,5, porém sobreviveu a 0,3% de sais biliares por 4 horas. No estudo feito por PENNACCHIA *et al.* (2004), 89,3% das cepas de *Lactobacillus* tiveram a capacidade de crescimento em ágar MRS contendo 4,0% de sais biliares.

Estes microrganismos isolados de leites fermentados comerciais podem ser utilizados como culturas iniciadoras em novos produtos com potencial probiótico. Diversos trabalhos têm sido realizados com o intuito de adicionar este tipo de bactéria a produtos cárneos fermentados (PENNACCHIA *et al.,* 2006; MUTHUKUMARASAMY & HOLLEY, 2007; RUIZ-MOYANO *et al.,* 2009), leite fermentado de soja (WANG *et al.*, 2006), *buttermilk* (ANTUNES *et al.,* 2007) e queijo (CICHOSKI *et al.*, 2008; VALDUGA *et al.,* 2009).

4 CONCLUSÕES

As cepas isoladas de leites fermentados comerciais foram *Actinomyces israelli*, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophylus/jensenii*, *Bifidobacterium spp 2*, *Lactococcus lactis ssp lactis* 2 e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 sendo que apresentaram contagens superiores a 10^7 UFC mL^{-1}.

As cepas *Bifidobacterium spp* 2 e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 apresentaram viabilidade probiótica após aprovação nos testes de resistência ao pH ácido e sais biliares.

Assim, os microrganismos isolados de leites fermentados comerciais possuem capacidade probiótica e podem ser utilizados pela indústria de alimentos como culturas probióticas em diversos produtos, tanto lácteos quanto cárneos.

SUMMARY

The aim of this study was to isolate and to characterize *Lactobacillus* and Bifidobacterias strains from fermented commercial milks and to analyze its resistance to acid pH and bile salts. The microorganisms were isolated from fermented commercial milks from 'spread-plate' technique in MRS selective medium supplemented with neomycin, paromomicin, nalidixic acid and lithium chloride. After, the strains were characterized as coloration de Gram and catalase test. Were possible to identify through the commercial kit Api 20A microorganisms like *Actinomyces israelli, Actinomyces haeslundii, Lactobacillus acidophilus/ jensenii* and *Bifidobacterium spp* 2 and through the commercial kit Api 50CHL Medium were possible to identify the microorganisms *Lactococcus lactis ssp lactis* 2 and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1. Were realized resistance tests in 3,0; 2,5 and 2,0 pH during 3 and 6 hours and resistance to bile salts in the concentra tion of 0,3%. Both the strains were resistant to 3,0 pH during 3 and 6 hours and to presence of bile salts.

Index terms: Bifidobacterias, *Lactobacillus*, probiotic, fermented milks, isolation.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, C. et al. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 365-374, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of food**, 3. ed. Washington: APHA, 1992.

ANTUNES, A. E. C. et al. Desenvolvimento de *buttermilk* probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 83-90, 2007.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.;

Tabela 3 – Contagem de *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* e *Bifidobacterium spp 2* (em Log UCF.ml^{-1}) isolados de produtos lácteos fermentados frente à ausência e presença de 0,3% de sais biliares, no período de 4 horas.

Cepa	0% de sais biliares	0,3% de sais biliares
Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1	7,96	6,91
Bifidobacterium spp 2	8,72	7,30

GAUTHIER, S.F. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobactéria. **Journal of Dairy Science,** Champaign, v. 79, n. 1, p. 8-15, 1996.

BLANQUET, S. et al. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 21, n. 4, p. 585-591, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, Brasil, julho de 2008.

CICHOSKI, A. J. et al. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 214-219, 2008.

ERKKILA, S.; PETÃJÃ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, Champaign, v. 55, p. 297-300, 2000.

FAO/WHO. Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. In: FAO Food and Nutrition Paper 85, Roma, 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 365-278, 1989.

GILLILAND, S. E., STALEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 12, p. 3045-3051, 1984.

GOLDIN, B.; GORBACH, S. Probiotics for humans**.** In: FULLER, R.: **Probiotics – the scientific basis**. London: Chapman and Hall, 1992. p. 355-376.

GOMES, A. M. P. & MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus:* biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends In Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 10, n. 4/5, p. 139-157, 1999.

GRAND, M.; KÜFEER, M.; BAUMGARTNER, A. Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 217, p. 90-92, 2003.

GIBSON, G. R. & FULLER, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition,** Bethesda, v. 130, Suppl. 2S, p. 391S-395S, 2000.

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

HYRONIMUS, B. et al. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 2-3, p.193-197, 2000.

JELEN, P. & LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G. (Ed.). **Functional foods:** biochemical and processing aspects. Lancaster: Technomic Publishing, 1998. p. 357-381.

KLINGBERG, T. D.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K.; ELSSER, D.; BUDDE, B. B. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 419-431, 2005.

LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacterium spp. in the presence of acid and bile salts. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v. 30, n. 3, p. 2-7, 1995.

LIN, W. H. et al. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.

LOURENS-HATTINGH, A. & VILJOEN, B.C.; Review: yoghurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

MARTEAU, P. et al. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 6, p. 1031-1037, 1997.

MATILLA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International**

Dairy Journal, Amsterdam, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2003.

MUTHUKUMARASAMY, P. & HOLLEY, R. A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermentes sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 1, p. 82-88, 2007.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, Champaign, v. 67, n. 2, p. 309-317, 2004.

PENNACCHIA, C.; VAUGHAN, E. E.; VILLANI, F. Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. **Meat Science**, Champaign, v. 73, n. 1, p. 90-101, 2006.

PINEIRO, M. & STANTON, C. Probiotic bacteria: legislative framework – requirements to evidence basis. **Journal of Nutrition,** Bethesda, v. 137, p. 850-853, 2007.

ROY, D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 167-182, 2001.

RUIZ-MOYANO, S. et al. Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausage. **Meat Science**, Champaign, v. 83, n. 3, p. 460-467, 2009.

SHAH, N. P. et al Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 5, n. 5, p. 515-521, 1995.

SYKES, G. & SKINNER, F. A. Techniques for the isolation and characterization of Actinomyces and bifidobacterium species, report of a panel discussion. **Society for Applied Bacteriology Symposium Series,** Oxford, v. 2, p. 327-333, 1973.

VALDUGA, E. et al. Efeito da adição de probiótico (*Lactobacillus rhamnosus*), fibra de trigo e gelatin nas características sensoriais do queijo prato *light* durante a maturação. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 2, p. 261-270, 2009.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

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**, Ottawa, v. 36, n. 9-10, p. 895-904, 2003.

WANG, Y. C.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobactéria. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 2, p. 128-135, 2006.

ZUCOTTI, G. V. et al. Probiotics in clinical practice: an overview. **The Journal of International Medical Research**, Worthing, v. 36, p. 1A-53A, 2008.